



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**Estudio de las interacciones genéticas de las proteínas de arquitectura  
dCTCF y Mod(mdg4) con dAdd1 y dXNP en *Drosophila melanogaster*.**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Biol. Mauro de Jesús Magaña Acosta

TUTOR PRINCIPAL:

Dra. Viviana del Carmen Valadez Graham  
[Instituto de Biotecnología](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dra. Svetlana Shishkova – [Instituto de Biotecnología](#)  
Dra. Hilda María Lomelí Buyoli – [Instituto de Biotecnología](#)

Cuernavaca, Morelos. Noviembre, 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.

## **JURADO**

**PRESIDENTE: Dr. Joseph Dubrovsky**

**SECRETARIO: Dr. Enrique Alejandro Reynaud Garza**

**VOCAL: Dra. Patricia León Mejía**

**VOCAL: Dr. David René Romero Camarena**

**VOCAL: Dr. Víctor Julián Valdés Rodríguez**



## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y al instituto de Biotecnología (IBT) por permitirme realizar mis estudios de Maestría en Ciencias.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme la beca que me permitió realizar mis estudios de maestría (No. de beca 925658). Así como el donativo de CONACyT No. A1S-8239, con cuyo financiamiento se desarrolló parte del proyecto.

Para este trabajo de igual forma se contó con financiamiento de proyecto DGAPA-PAPIIT/UNAM No. IN-200118

A mis padres José y Teresa por su apoyo incondicional en todos los aspectos a lo largo de estos dos años, por su cariño y sus consejos durante este periodo de tiempo, los cuales me han permitido seguir formándome no solo como profesional, sino como persona.

A la Dra. Viviana Valadez por recibirme en el laboratorio con los brazos abiertos y aceptar ser mi tutora de maestría, así como por su paciencia en cuestiones de mi formación académica y su disponibilidad para la resolución de dudas y problemas.

Al Dr. Mario Zurita por permitirme realizar mis trabajos en su laboratorio, además de sus valiosas observaciones durante los seminarios de grupo.

A las doctoras Svetlana Shishkova e Hilda Lomelí por aceptar formar parte de mi comité tutor y contribuir con sus valiosas observaciones en los tutorales.

A los miembros de mi jurado de examen, por sus consejos y sugerencias que enriquecieron este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio: Miguel, Alberto, Silvia, Aldo, Pilar, Eduardo, Andrea y Maritere por hacer más llevadera mi estancia en el laboratorio y ayudarme cuando lo necesité.

A mis amigos y compañeros de generación: Estefanía, Roberto, Arihel, Arlen, Jimmy, Humberto, Rubén, Wendy, Fer. Por su amistad y ayuda a lo largo de la maestría en las tediosas sesiones de trabajo, así como en la preparación de defensas de proyecto, y cualquier cosa que se ofreciera. Además de las divertidas reuniones en la pecera, las celebraciones y salidas en general.

A mis amigos de CDMX: Alby, Gloria, Ana Elena, Victoria, Erik, Julier y Sophie: Por brindarme su apoyo durante este tiempo en los momentos duros y motivarme a seguir adelante.

A Sara por todo su apoyo durante este último año y sus palabras de aliento, nos vemos en Europa.

A Zyan por su compañía a lo largo de este viaje, apoyo en mis trabajos, así como soportar mi carga excesiva de trabajo durante estos último meses siendo comprensiva en todo momento y una excelente persona.

## Resumen

El DNA nuclear eucarionte está organizado de manera jerárquica en un complejo con conformación tridimensional de DNA-proteínas conocida como cromatina. En primera instancia, para la regulación de la organización 3D de la cromatina se encuentran las proteínas de arquitectura (PA), las cuales pueden tener diversas actividades como el bloqueo de enhancer, pueden delimitar regiones de heterocromatina y eucromatina y median la formación de loops de la cromatina, lo cual permite el contacto entre elementos reguladores y promotores generando una regulación fina de la transcripción.

En vertebrados, existe una PA conocida como CTCF, la cual ha sido descrita como una proteína esencial para la formación de los loops de la cromatina y se ha encontrado mediante ensayos de captura de conformación de la cromatina, que existe un enriquecimiento de sitios de unión de CTCF en la mayoría de los límites de los TADs. Por otro lado, en *Drosophila melanogaster* existe el ortólogo dCTCF que a pesar de poder reconocer las mismas secuencias que CTCF en vertebrados, no es esencial en la formación de los loops de la cromatina. Por otro lado, se ha sugerido que respecto a la organización global del genoma de *Drosophila* podrían estar participando complejos de otras PA que son exclusivas de la mosca como CP190 y Mod(Mdg4). Adicionalmente, datos recientes han mostrado que las PA pueden tener una actividad conjunta con complejos remodeladores de la cromatina (CRCs). Lo que indica que estas proteínas en conjunto pueden tener una actividad regulando la arquitectura de la cromatina lo cual impacta en la transcripción de los locus donde se encuentran.

La proteína ATRX de humano (que es parte de un CRC), y cuya falta de función ha sido asociada al síndrome ATRX, defectos en la reparación de DNA en telómeros y una expresión anormal en algunos tipos de cánceres, es una proteína que se encuentra altamente conservada en la evolución y posee dos dominios importantes para su funcionalidad: un dominio ADD y un dominio ATPasa/Helicasa. En el caso de *D. melanogaster*, se ha encontrado que el dominio ADD y los dominios ATPasa/Helicasa están separados y son codificados por dos genes diferentes. Por un lado, el gen *dAdd1* que codifica 3 isoformas proteínas que contienen el dominio ADD. Y por otro, el gen *dxnp* codifica para dos isoformas que solo contienen los dominios ATPasa/Helicasa.

Datos de ChIP-seq no publicados del laboratorio, han mostrado que las proteínas dAdd1 co-localizan sobre algunas regiones del genoma (incluyendo regiones regulatorias) con algunas proteínas de arquitectura (PA) como Mod(mdg4), Su(Hw), CP190 y dCTCF. Adicionalmente existen datos no publicados de ensayos de doble híbrido los cuales muestran que la proteína dXNP<sub>L</sub> interactúa directamente con la isoforma de Mod(mdg4) de 67.2 kDa lo que indica que dAdd1, dXNP y Mod(mdg4)-67.2 kDa podrían estar formando un complejo que pudiese regular la arquitectura de la cromatina.

Resultados en este trabajo han mostrado que existe una interacción genética entre las proteínas dAdd1, dXNP y Mod(Mdg4) lo cual fue determinado mediante el uso de dos genes reporteros: *y* y *ct*. Adicionalmente se ha observado que las proteínas dAdd1 y dXNP actúan como reguladores negativos de la actividad de bloqueo de enhancer mediada por el retrotransposón *Gypsy* y que actúan en la misma vía. Finalmente, se ha observado que las proteínas dAdd1, dXNP y Mod(mdg4) están involucradas en la deposición de pigmento en el abdomen en hembras, ya que organismos mutantes muestran cambios en el patrón de coloración en la cutícula de los abdómenes, donde las hembras adquieren un patrón parecido al de los machos sugiriendo un papel de estas proteínas en la regulación sexo-específico de la deposición de pigmentación.

## Abstract

Nuclear DNA in eukaryotes is organized hierarchically in a protein-DNA 3D complex known as chromatin. In the first instance, for the regulation of the 3D organization of chromatin are involved architectural proteins (APs), which can have diverse activities such as enhancer blocking, insulation of heterochromatic and euchromatic regions, and chromatin looping, which allows chromatin contacts between regulatory elements and promoters generating a fine regulation of transcription.

In vertebrates, there is an AP known as CTCF, which has been described as an essential protein for chromatin looping. Through chromatin conformation capture approaches has been found that there is an enrichment of CTCF binding sites at most TAD limits. On the other hand, in *Drosophila melanogaster* there is an ortholog called dCTCF that despite being able to recognize the same sequences as CTCF in vertebrates, is not essential for chromatin looping. Therefore, has been suggested concerning global genome organization in *Drosophila*, which could be participating in other APs found in flies such as CP190 and Mod(mdg4). Additionally, recent data have shown that APs can have joint activity with chromatin remodeling complexes (CRCs). This indicates that these proteins may have an activity regulating chromatin architecture, directly impacting the transcription of the loci where they are found.

The human ATRX protein (which is a component of a CRC) and whose loss of function has been associated with ATRX syndrome, defects in telomeric DNA repair and, an abnormal expression in some cancer types, is a protein that is highly conserved in evolution which possesses two important domains for its functionality: An ADD domain and an ATPase/Helicase domain. In *D. melanogaster* has been found that both ADD and ATPase/Helicase domains are separated and coded by two different genes. On the one hand, *dAdd1* gene codes for three proteic isoforms that contains the ADD domain. On the other hand, *dxnp* gene codes for two isoforms that only possess the ATPase/Helicase domains.

Unpublished CHIP-seq data from our laboratory has shown that dAdd1 proteins co-localize on some regions of the genome (including regulatory regions) with some APs such as Mod(mdg4), Su(Hw), CP190, and dCTCF. Additionally, there are unpublished data from yeast-two-hybrid assays that suggests that dXNP<sub>L</sub> isoform directly interacts with Mod(mdg4)-67.2 kDa. Thus, these data indicate that dAdd1, dXNP, and Mod(mdg4) could be forming a complex that may regulate chromatin architecture.

Results in this work have shown that there is a genetic interaction between dAdd1, dXNP and Mod(mdg4) proteins, which was determined by using two reporter genes; *y* and *ct*. Moreover, has been observed that dAdd1, and dXNP proteins act as negative regulators of the *Gypsy* retrotransposon mediated enhancer blocking activity and participate in the same pathway. Finally, has been observed that dAdd1, dXNP, and Mod(mdg4) proteins participate in the deposition of pigments in the abdomen in females since mutant organisms display changes in coloration patterns in the cuticle of abdomens, where females acquire a pattern similar to males, suggesting a role for these proteins into sex-specific regulation of pigmentation deposition.

## Índice

1.- Introducción.....	1
1.1.- Estructura de la cromatina .....	3
1.2.- Modificaciones en la estructura de la cromatina.....	6
1.2.1.- Modificaciones post-traduccionales en las histonas .....	6
1.2.2.- Variantes de histonas.....	8
1.2.3.- Complejos remodeladores de la cromatina .....	9
1.3.1.- ATRX en <i>Drosophila melanogaster</i> .....	12
1.4.- Proteínas de arquitectura.....	14
1.4.1- CTCF (CCCTC-binding factor).....	15
1.4.2.- dCTCF.....	17
1.4.3.- Modifier of mdg4 (Mod(mdg4)).....	18
2.- Antecedentes .....	22
2.1.- Interacciones de las proteínas dAdd1 con proteínas de arquitectura .....	22
2.2.- Interacción de CTCF con otras proteínas de arquitectura.....	23
2.3.- Interacción de Mod(mdg4) con otras proteínas de arquitectura.....	23
3.- Hipótesis.....	24
4.- Justificación.....	24
5.- Objetivos .....	24
5.1.- Objetivo general .....	24
5.2.- Objetivos particulares.....	24
6.- Metodología.....	25
6.1.- Interacción genética entre <i>dxnp</i> , <i>dAdd1</i> , <i>dCTCF</i> y <i>Mod(mdg4)</i> . .....	25
6.2.- Mantenimiento de líneas mutantes de <i>Drosophila</i> .....	25
6.3.- Cruzas genéticas .....	25
6.3.1.- Control wt .....	25
6.3.2.- Controles de alelos mutantes.....	26
6.3.3.- Combinaciones de alelos mutantes .....	26
6.3.4.- Análisis de supervivencia .....	27
6.3.5.- Análisis de los fenotipos.....	27
6.3.6.- Análisis morfométrico de alas .....	29
7.- Resultados y discusión .....	33
7.1.- Interacción genética entre <i>dAdd1</i> , <i>dxnp</i> y <i>dCTCF</i> .....	33
7.2 Interacción genética entre <i>dAdd1</i> y <i>Mod(mdg4)</i> .....	37
7.3 Interacción genética entre <i>dxnp</i> y <i>Mod(mdg4)</i> .....	41



7.4 Interacción genética entre <i>dAdd1</i> , <i>dxnp</i> y <i>Mod(mdg4)</i> (Triple-mutantes).....	44
7.5.- Análisis de coloración de cutículas de organismos mutantes. ....	48
7.6.- Análisis morfométrico (AM) en alas de individuos triple-mutantes. ....	50
7.6.1.- wt vs $y^2w^1ct^6$ ; +/-; <i>Mod(mdg4)<sup>u1</sup>/+</i> .....	51
7.6.2.- $y^2w^1ct^6$ ; +/-; <i>Mod(mdg4)<sup>u1</sup></i> vs $y^2w^1ct^6$ ; +/-; <i>dAdd1<sup>2</sup>/+</i> ; <i>Mod(mdg4)<sup>u1</sup>/dxnp<sup>2</sup></i> .....	52
7.6.3.- $y^2w^1ct^6$ ; +/-; <i>Mod(mdg4)<sup>u1</sup></i> vs $y^2w^1ct^6$ ; +/-; <i>dAdd1<sup>2</sup>/+</i> ; <i>Mod(mdg4)<sup>u1</sup>/dxnp<sup>3</sup></i> .....	53
7.6.4.- $y^2w^1ct^6$ ; <i>dAdd1<sup>2</sup>/+</i> ; <i>Mod(mdg4)<sup>u1</sup>/dxnp<sup>2</sup></i> vs $y^2w^1ct^6$ ; <i>dAdd1<sup>2</sup>/+</i> ; <i>Mod(mdg4)<sup>u1</sup>/dxnp<sup>3</sup></i> .....	54
7.6.5.- Validación estadística de análisis morfométrico .....	55
7.7.- Evaluación de actividad de insulador mediante el desarrollo de sensilias mecanosensoras en el borde del ala. ....	56
7.8.- Efecto sobre la actividad de insulador en el alelo reportero $y^2$ .....	59
7.9.- Efecto de <i>dAdd1</i> , <i>dXNP</i> y <i>Mod(mdg4)</i> sobre la pigmentación del abdomen en hembras ...	61
8.- Conclusiones.....	64
9.- Perspectivas.....	65
10.- Referencias .....	66
Anexo 1.- Alelos mutantes utilizados para los ensayos de interacción genética.....	77
Anexo 2 Cruzas genéticas .....	80

<b>Figura 1:</b> Territorios cromosómicos y compartimentos. ....	2
<b>Figura 2:</b> Organización de la cromatina en un cromosoma en interfase. ....	2
<b>Figura 3:</b> Estructura del nucleosoma.....	3
<b>Figura 4:</b> Empaquetamiento de la cromatina .....	4
<b>Figura 5:</b> Heterocromatina y eucromatina.....	5
<b>Figura 6:</b> Modificaciones post-traduccionales de histonas. ....	7
<b>Figura 7:</b> Histonas canónicas y sus variantes. ....	8
<b>Figura 8:</b> Gen hATRX.....	10
<b>Figura 9:</b> Isoformas de hATRX en humano.....	10
<b>Figura 10:</b> Estructura del dominio ADD de ATRX.....	11
<b>Figura 11:</b> Conservación en la evolución de la proteína ATRX. ....	12
<b>Figura 12:</b> ATRX en <i>D. melanogaster</i> .....	13
<b>Figura 13:</b> Estructura 3D de CTCF.....	15
<b>Figura 14:</b> Modelo de loop extrusion.....	16
<b>Figura 15:</b> dCTCF.....	17
<b>Figura 16:</b> Mod(mdg4)-67.2 kDa. ....	18
<b>Figura 17:</b> Interacción de Mod(mdg4)-67.2 con Su(Hw) y CP190 .....	19
<b>Figura 18:</b> Actividad de bloqueo de enhancer sobre <i>y</i> .....	20
<b>Figura 19:</b> Actividad de bloqueo de enhancer sobre <i>ct</i> .....	21
<b>Figura 20:</b> Masas melanóticas. ....	27
<b>Figura 21:</b> Fenotipos generados en adultos <i>dCTCF<sup>0</sup></i> .....	28
<b>Figura 22:</b> Modulación de la actividad de bloqueo de enhancer del complejo Su(Hw)/CP190/Mod(mdg4). ....	29
<b>Figura 23:</b> Montaje de alas en portaobjetos.....	29
<b>Figura 24:</b> Ejes de referencia para el análisis morfométrico.....	30
<b>Figura 25:</b> Establecimiento de los “landmarks” para análisis morfométrico. ....	30
<b>Figura 26:</b> Porcentaje de supervivencia en triple-mutantes para dAdd1, dxnp y dCTCF.....	33
<b>Figura 27:</b> Fenotipos generados en machos adultos triple-mutantes para dAdd1, dxnp y dCTCF. ....	35
<b>Figura 28:</b> Fenotipos generados en hembras adultas triple-mutantes para dAdd1, dxnp y dCTCF .....	36
<b>Figura 29:</b> Porcentaje de supervivencia en doble-mutantes para dAdd1 y Mod(mdg4).....	37
<b>Figura 30:</b> Fenotipos obtenidos en machos adultos doble-mutantes para dAdd1 y Mod(Mdg4) ....	39
<b>Figura 31:</b> Fenotipos en alas de individuos doble-mutantes para dAdd1 y Mod(mdg4).....	40
<b>Figura 32:</b> Porcentaje de supervivencia en doble-mutantes para dXNP y Mod(mdg4).....	41
<b>Figura 33:</b> Fenotipos observados en machos adultos doble-mutantes para dXNP y Mod(mdg4). .	42
<b>Figura 34:</b> Fenotipos en alas de de individuos doble-mutantes para dXNP y Mod(Mdg4).....	43
<b>Figura 35:</b> Porcentaje de supervivencia en triple-mutantes para dAdd1, dXNP y Mod(mdg4). ....	44
<b>Figura 36:</b> Fenotipos observados en machos adultos triple-mutantes dAdd1, dXNP y Mod(mdg4).. .....	46
<b>Figura 37:</b> Análisis de coloración de cutículas de todos los genotipos mutantes generados.....	49
<b>Figura 38:</b> PCA de datos de individuos wt vs $y^2w^1ct^6$ ; +/+; <i>Mod(mdg4)<sup>u1</sup>/+</i> .....	51
<b>Figura 39:</b> Variación en la forma del ala entre wt vs $y^2w^1ct^6$ ; +/+; <i>Mod(mdg4)<sup>u1</sup>/+</i> .....	51
<b>Figura 40:</b> PCA de datos de individuos $y^2w^1ct^6$ ; +/+; <i>Mod(mdg4)<sup>u1</sup>/+</i> vs $y^2w^1ct^6$ ; <i>dAdd1<sup>2</sup>/+</i> ; <i>Mod(mdg4)<sup>u1</sup>/dxnp<sup>2</sup></i> .....	52
<b>Figura 41:</b> Variación en la forma del ala entre $y^2w^1ct^6$ ; <i>Mod(mdg4)<sup>u1</sup>/+</i> vs $y^2w^1ct^6$ ; <i>dAdd1<sup>2</sup>/+</i> ; <i>Mod(mdg4)<sup>u1</sup>/dxnp<sup>2</sup></i> .....	52
<b>Figura 42:</b> PCA de datos de individuos $y^2w^1ct^6$ ; +/+; <i>Mod(mdg4)<sup>u1</sup>/+</i> vs $y^2w^1ct^6$ ; <i>dAdd1<sup>2</sup>/+</i> ; <i>Mod(mdg4)<sup>u1</sup>/dxnp<sup>3</sup></i> .....	53

<b>Figura 43:</b> Variación en la forma del ala entre $y^2w^1ct^6; +/+; Mod(mdg4)^{u1}/+$ vs $y^2w^1ct^6; +/+; dAdd1^2/+; Mod(mdg4)^{u1}/dxnp^3$ .....	53
<b>Figura 44:</b> PCA de datos de individuos $y^2w^1ct^6; dAdd1^2/+; Mod(mdg4)^{u1}/dxnp^2$ vs $y^2w^1ct^6; dAdd1^2/+; Mod(mdg4)^{u1}/dxnp^3$ .....	54
<b>Figura 45:</b> Variación en la forma del ala entre $y^2w^1ct^6; dAdd1^2/+; Mod(mdg4)^{u1}/dxnp^2$ vs $y^2w^1ct^6; +/+; dAdd1^2/+; Mod(mdg4)^{u1}/dxnp^3$ .....	54
<b>Figura 46:</b> Distribución y número de sensilias mecanosensoras en organismos mutantes. ....	57
<b>Figura 47:</b> Promedio de número de sensilias mecanosensoras por genotipo .....	58
<b>Figura 48:</b> Porcentaje de supervivencia en organismos $y^2; dAdd1^2/+$ y $y^2; +/+; dxnp^2$ .....	59
<b>Figura 49:</b> Fenotipos obtenidos en machos adultos de genotipo $y^2; dAdd1^2/+$ y $y^2; +/+; dxnp^2/+$ ..	60
<b>Figura 50:</b> Cambio de en el patrón de coloración en la cutícula en el abdomen de hembras triple-mutantes para dAdd1, dXNP, Mod(mdg4). ....	61

## Índice de tablas

<b>Tabla 1:</b> Disposición de “landmarks” en el ala .....	31
<b>Tabla 2:</b> Interacción genética entre dAdd1, dxnp y dCTCF .....	34
<b>Tabla 3:</b> Interacción genética entre dAdd1 y Mod(Mdg4) en organismos doble-mutantes.....	38
<b>Tabla 4:</b> Interacción genética entre dXNP y Mod(Mdg4) en organismos doble-mutantes.....	41
<b>Tabla 5:</b> Interacción genética entre dAdd1, dxnp y Mod(mdg4) en organismos triple-mutantes.....	45
<b>Tabla 6:</b> Validación estadística del análisis morfométrico .....	55
<b>Tabla 7:</b> Efecto de dAdd1 y dXNP sobre el alelo reportero $y^2$ .....	59

## Lista de abreviaturas

**3C:** Chromosome Conformation Capture

**ADD:** ATRX-DMNT3b-DMNT3L Domain

**ALT:** Alternative Lengthening of Telomeres

**ATRX:** Alpha-Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-linked

**BEAF-32:** Boundary Element Associated Factor of 32 kDa

**BTB/POZ:** bric-a-brac, tramtrack and broad complex/poxvirus and zinc finger

**CHD:** Chromodomain Helicase-DNA

**CHIA-PET:** Chromatin Interaction Analysis by Paired-End Tag sequencing

**ChIP-ChIP:** Chromatin immunoprecipitation followed by microarray hybridization

**ChIP-qPCR:** Chromatin immunoprecipitation quantitative Polymerase Chain Reaction

**ChIP-seq:** Chromatin Immunoprecipitation Sequencing

**CRC:** Complejo Remodelador de la Cromatina

**CP190:** Centrosome-Associated zinc finger protein CP190

**Cryo-EM:** Criomicroscopía electrónica

**Ct:** Cut

**CTCF:** CCCTC binding-factor

**DAXX:** Death Domain Associated Protein

**DSB:** Double Strand Breaks

***dxnp:*** *Drosophila* X-linked Nuclear Protein

**ERVs:** Endogenous Retroviral Elements

**H3K9me3:** Trimetilación de la lisina 9 en la histona H3

**H3K27me3:** Trimetilación de la lisina 27 en la histona H3

**HATs:** Acetiltransferasas de histonas

**Hi-C:** High Throughput Chromosome Conformation Capture

**HP1:** Heterochromatin Protein 1

**HMTs:** Metiltransferasas de histonas

**INO80:** Inositol Requiring 80

**ISWI:** Imitation SWItch

**LTRs:** Long Terminal Repeats

**MADF:** myb-SANT-like domain in Adf1

**mESC:** Mouse Embryonic Stem Cell

**Mod(mdg4):** Modifier of mdg4

**MYC:** Myc Proto-oncogene, bHLH transcription factor

**NIPBL:** Nipped B-like Protein

**Non-LTR:** Non-Long Terminal Repeats

**PAs:** Proteínas de arquitectura

**PHD:** Plant Homeodomain

**PML-Bodies:** Promyelocytic Leukaemia bodies

**Rad21:** Double-strand Break repair protein rad21 homolog

**RT-PCR:** Real Time Polymerase Chain Reaction

**RT-qPCR:** Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction

**SAXS:** Small Angle X-Ray Scattering

**SID:** Suppressor of Hairy Wing Interacting Domain

**SMC:** Structural Maintenance of Chromosomes

**SNF2:** Sucrose Non-Fermenting 2

**SOP:** Sensory Organ Precursor

**Su(Hw):** Suppressor of Hairy Wing

**SWI/SNF:** SWItch/Sucrose Non-Fermenting

**TADs:** Topologically Associating Domains

**TCs:** Territorios cromosómicos

**y:** Yellow

**ZNF:** Zinc Finger Genes.

## 1.- Introducción

El DNA nuclear eucarionte está organizado en múltiples niveles de compactación de manera jerárquica, y para ello involucra una gran cantidad de proteínas que son necesarias para estabilizar todo el complejo en una interacción tridimensional de DNA-proteínas conocida como cromatina (Van Bortle y Corces, 2012).

La cromatina, por un lado, se encarga de mantener una organización global del genoma, y por otro, hace que ciertas regiones de DNA sean accesibles o estén compactadas correctamente para que se lleven a cabo gran variedad de procesos entre los que destacan la proliferación celular y la supervivencia (Bassett *et al.*, 2009; Van Bortle y Corces 2012; Pombo y Dillon, 2015). Por citar un ejemplo, existen regiones centroméricas que son necesarias para la correcta segregación de los cromosomas durante la división celular, así como regiones teloméricas que son estructuras que están relacionadas con la estabilidad cromosómica y la senescencia celular (Deng y Chang, 2007).

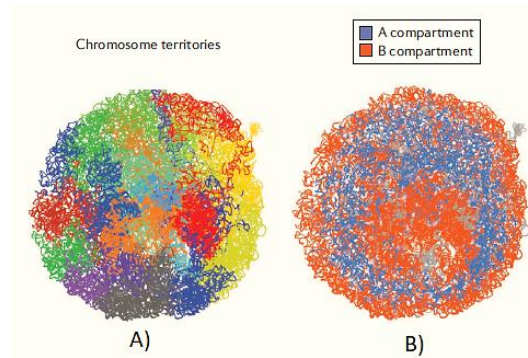
La cromatina presenta gran dinamismo y está sujeta a reestructuraciones que propician o impiden la expresión de ciertos genes de manera altamente regulada, donde una organización más laxa favorece de manera coordinada la accesibilidad de proteínas a sus secuencias blanco (Felsenfeld y Groudine, 2003). Por ello, el complejo experimenta intensos cambios a lo largo del ciclo celular y su remodelaje contribuye al desarrollo de múltiples funciones en la célula (Pombo y Dillon, 2015). Todo el material genético eucarionte contenido en el núcleo se encuentra en forma de cromosomas, que son estructuras que durante la interfase se organizan en regiones específicas denominadas como territorios cromosómicos (Figura 1A, Figura 2), los cuales pueden definir si un locus del genoma está en un entorno nuclear activo o represivo (Fraser *et al.*, 2015; Buchwalter *et al.*, 2019).

La localización los territorios cromosómicos (TCs) varía con el tipo celular, generalmente los cromosomas que contienen una gran cantidad de genes se encuentran en la parte central del núcleo, mientras que los cromosomas con una menor cantidad de genes se encuentran en la periferia interactuando con componentes de la envoltura nuclear, aunque hay que destacar que no siempre ocurre de esta manera (Fraser *et al.*, 2015; Buchwalter *et al.*, 2019).

Los territorios cromosómicos a su vez están formados por una serie de compartimentos que se clasifican en abiertos (A) o cerrados (B) (Figura 1B) dependiendo si la estructura de la cromatina en esas regiones se encuentra compactada o laxa, y de esa manera pueda o no, permitir la entrada de la maquinaria de transcripción en esas regiones (Fraser *et al.*, 2015; Buchwalter *et al.*, 2019). Sin embargo, cabe destacar que en un compartimento de tipo A también existen regiones que se encuentran silenciadas y que poseen enriquecimientos de marcas de histonas como la H3K9me3 o H3K27me3, así como en los compartimentos de tipo B también existen genes que son transcripcionalmente activos (Fraser *et al.*, 2015; Buchwalter *et al.*, 2019).

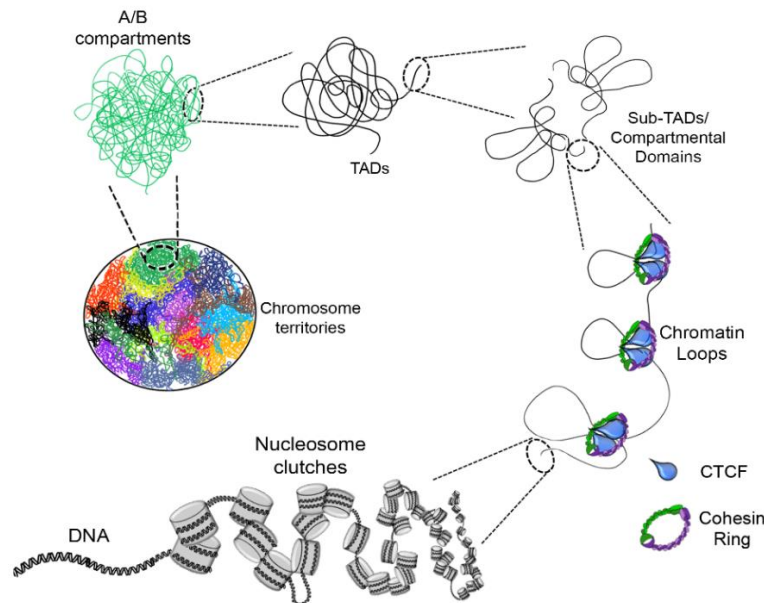
Avances más recientes en el estudio de la organización de la cromatina mediante técnicas moleculares asistidas por computación como Hi-C o ChIA-PET han mostrado que los compartimentos a su vez están formados por los llamados dominios topológicamente asociados (TADs por sus siglas en inglés) (Figura 2) (Rowley y Corces, 2018).

Se ha propuesto que los TADs son relevantes en la regulación transcripcional (Narendra *et al.*, 2016; Arzate-Mejía *et al.*, 2020) ya que se caracterizan por tener límites bien definidos que están enriquecidos con proteínas de arquitectura (PA). Dichos límites, separan unos TADs de otros y tal delimitación hace que haya una alta interacción de elementos dentro de cada TAD, y poca o nula interacción entre elementos de TADs diferentes, generando dominios transcripcionalmente independientes unos de otros (Figura 2) (Rowley y Corces., 2018).



**Figura 1:** Territorios cromosómicos y compartimentos A) TCs en interfase donde se muestra cada cromosoma en color diferente. B) Compartimentos abiertos (azul) o cerrados (naranja) (Tomado de Buchwalter *et al.*, 2019).

Diversos estudios indican que los TADs a su vez están formados por los denominados loops de la cromatina, los cuales propician una regulación más fina de la transcripción ya que pueden mediar el contacto a grandes distancias entre elementos reguladores como; Enhancer - Promotor, Enhancer - Silencer o Insulator – Insulator. Finalmente, los loops de la cromatina se forman a partir de clusters de nucleosomas, los cuales tienen un arreglo y densidad heterogénea, y han sido denominados como clutches de nucleosomas (Figura 2) (Ricci *et al.*, 2015; Fraser *et al.*, 2015; Rowley y Corces, 2018).



**Figura 2:** Organización de la cromatina en un cromosoma en interfase (Tomado de Magaña-Acosta y Valadez-Graham, 2020).

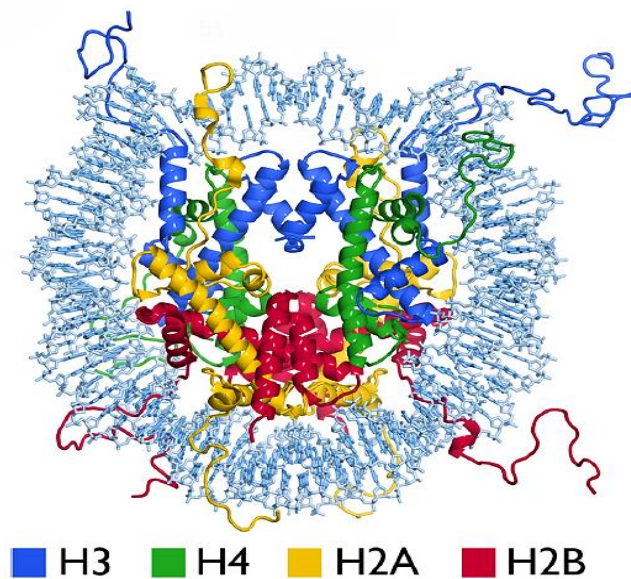
## 1.1.- Estructura de la cromatina

Para entender cómo se forman los dominios derivados de la organización jerárquica de la cromatina, primero es necesario visualizar la manera en que el DNA se encuentra interactuando junto a diversas proteínas. Debido a que en eucariontes el DNA por célula tiene una longitud que varía entre los dos a cuatro metros y se encuentra empaquetado en un núcleo que mide entre 10 y 20 micrómetros ( $\mu\text{m}$ ) de diámetro, es obvio que existe un empaquetamiento dentro del reducido espacio nuclear (Felsenfeld y Groudine, 2003; McGinty y Tan, 2015).

La unidad fundamental de la cromatina es el nucleosoma, que está formado por proteínas básicas llamadas histonas, las cuales forman un octámero donde 146 pares de bases (pb) de DNA se enrollan en 1.6 vueltas alrededor de ellas (Felsenfeld y Groudine, 2003; McGinty y Tan, 2015). Las histonas albergan una gran cantidad de residuos de arginina en su dominio globular denominado "core". Además, sus extremos N-terminal son ricos en residuos de lisina, esto genera una carga neta positiva que interacciona con la carga negativa del DNA estabilizando la unión en el enrollamiento del DNA (Workman y Kingston, 1998; McGinty y Tan, 2015).

El nucleosoma tiene un diámetro de 6.5 nanómetros (nm) y canónicamente está formado por un tetrámero que contiene dos heterodímeros de las histonas H3 y H4, que se encuentran flanqueadas por dos heterodímeros de las histonas H2A y H2B. Adicionalmente, cada uno de estos heterodímeros se conecta por tres  $\alpha$ -hélices conocidas formando una región denominada como "histone fold domain" (McGinty y Tan, 2015).

Del octámero de histonas sobresalen en locaciones definidas ocho extremos N-terminal provenientes de cada histona, los cuales son susceptibles a gran cantidad de modificaciones postraduccionales, donde algunas de ellas pueden ser reconocidas por proteínas involucradas en la remodelación y el mantenimiento de la cromatina. Además, sobresalen dos extremos C-terminal que provienen de las dos histonas H2A (Figura 3) (McGinty y Tan, 2015).



**Figura 3:** Estructura del nucleosoma con el octámero de histonas (Tomado de McGinty y Tan, 2015).

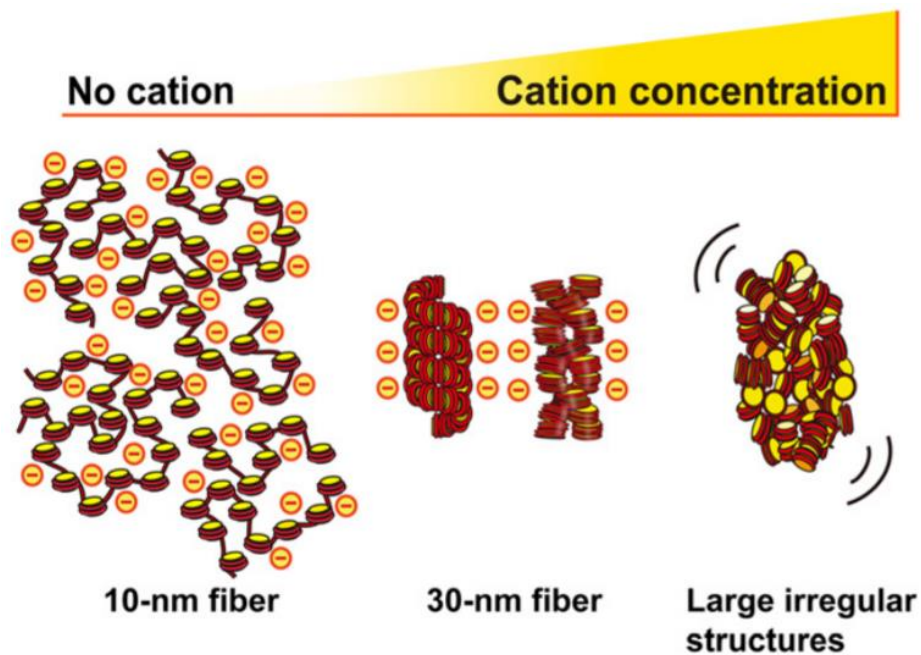


Los nucleosomas se posicionan uno tras otro formando una cadena conocida como fibra de **10 nm** (Figura 4) (McGinty y Tan, 2015). En ella, los nucleosomas se conectan unos a otros mediante un segmento de DNA de ~20 pb (variable entre diferentes organismos) conocido como “linker DNA” que a menudo se enlaza a una quinta histona denominada H1 (o su variante H5) formando una estructura de ~165 pb que es conocida como cromatosoma (Widom, 1998).

Se sabe que la histona H1 está involucrada en la regulación transcripcional debido a que tiene un estado de intercambio activo, por lo que no siempre está unida al DNA. Cuando está ausente, se impide un empaquetamiento mayor de la cromatina lo que genera una estructura más laxa permitiendo mayor accesibilidad al DNA (Workman y Kingston, 1998).

Anteriormente se había reportado la existencia de un siguiente nivel de agregación de la cromatina, el cual era conocido como fibra de 30 nm. Sin embargo, existen argumentos que indican que esta estructura no se forma en condiciones fisiológicas debido a que en los ensayos donde se ha observado fueron hechos en condiciones que no emulan a las que hay dentro de la célula (Prieto & Maeshima, 2019).

Se ha demostrado que al aumentar la concentración de cationes se disminuye la repulsión entre la cromatina permitiendo a los nucleosomas agregarse en cantidades mayores y llegar a formar estructuras de un tamaño similar a las fibras de 30 nm. Además, se ha observado que a concentraciones más altas de sal los nucleosomas pueden llegar a interdigitarse formando estructuras globulares irregulares. Sin embargo, la manera en que se va a dar la compactación depende entre otras cosas, de la longitud del DNA, donde una cromatina de mayor longitud necesitaría una menor cantidad de cationes (Prieto & Maeshima, 2019) (Figura 4).



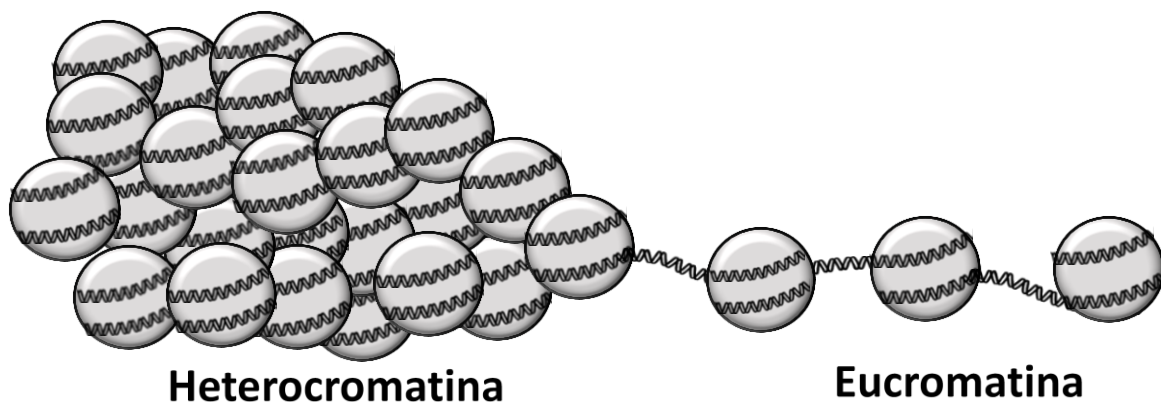
**Figura 4:** Empaquetamiento de la cromatina que pueden generarse de acuerdo con la concentración de cationes circundantes en el medio que la rodea (Tomado de Prieto y Maeshima, 2019).

Anteriormente, se había propuesto que la fibra de 30 nm debía de tener una estructura en forma de solenoide para dotarla de estabilidad. Sin embargo, esta no ha sido observada en cromosomas en interfase ni metafásicos utilizando acercamientos como crio-microscopía electrónica (cryo-EM), que permiten conservar la estructura de la cromatina de una forma muy parecida al estado nativo. No obstante, utilizando una combinación de imagen de espectroscopía electrónica en combinación con tomografías electrónicas se ha observado que tanto la eucromatina como la heterocromatina están formadas de fibras de 10 nm (Fussner *et al.*, 2012).

Lo anterior se complementa con datos obtenidos mediante una técnica denominada como Small Angle X-Ray Scattering (SAXS), la cual es capaz de determinar estructuras periódicas de muestras biológicas en solución, donde tampoco se encontró la fibra de 30 nm y solo se observaron estructuras de cromatina de un tamaño de entre 6 nm y 11 nm (Nishino *et al.*, 2012). Todo lo anterior indica que la fibra de 30 nm está ausente *in vivo* y la cromatina está compuesta de fibras de 10 nm con arreglos irregulares e interdigitadas (Figura 4). Debido a lo anterior, se ha sugerido que las fibras de 30 nm sólo se forman *In vitro* en condiciones iónicas bajas (Maeshima *et al.*, 2016; Maeshima *et al.*, 2019).

A pesar de los múltiples niveles de empaquetamiento que puede presentar la cromatina, queda claro que no es una estructura cuya conformación es homogénea, además, se ha clasificado a la cromatina en dos configuraciones distintas; por un lado, está la eucromatina (Figura 5) que se caracteriza por presentar una baja densidad de nucleosomas lo que genera una estructura más laxa que favorece la entrada de la maquinaria de transcripción a sus secuencias de DNA (Allis *et al.*, 2007).

Y por otro, la heterocromatina (Figura 5) que se caracteriza por poseer una alta densidad de nucleosomas ya que los genes que se encuentran dentro de regiones heterocromáticas generalmente están silenciados o se replican tardíamente. Además, la heterocromatina se localiza principalmente en regiones centroméricas y subteloméricas se la ha correlacionado con una función estructural (Allis *et al.*, 2007).



**Figura 5:** Heterocromatina y eucromatina

La heterocromatina a su vez puede subclasificarse como constitutiva, la cual se localiza en regiones centroméricas y teloméricas. Tiene la característica de que la mayoría del tiempo está compactada y contiene secuencias repetitivas, posee pocos genes que generalmente están silenciados y rara vez son expresados (Allis *et al.*, 2007). El otro tipo de heterocromatina es la facultativa, que puede transitar entre un estado de gran compactación a uno más relajado dependiendo de la actividad transcripcional. Hay que señalar que este cambio en la compactación va a variar entre los distintos tipos celulares y las diferentes etapas del desarrollo (Allis *et al.*, 2007).

## **1.2.- Modificaciones en la estructura de la cromatina**

La cromatina puede transitar entre eucromatina y heterocromatina con la finalidad de regular diversas actividades necesarias para la supervivencia de la célula (Li *et al.*, 2007). Sin embargo, hay que aclarar que todas las maneras conocidas en que la cromatina puede remodelarse son a nivel del nucleosoma, y únicamente se han descrito tres mecanismos de los que se hará una breve descripción:

### **1.2.1.- Modificaciones post-traduccionales en las histonas**

El DNA en el octámero de histonas es parcialmente accesible para proteínas reguladoras, aunque aumenta su accesibilidad cuando los extremos N-terminal de las histonas son modificados por vía enzimática, haciendo que el DNA se separe un poco del octámero y generando así un cambio local en la estructura de la cromatina (Felsenfeld y Groudine, 2003).

Las modificaciones post-traduccionales de las histonas generalmente ocurren en los extremos N-terminal y se deben a la acción de enzimas especializadas como las acetiltransferasas de histonas (HATs) (Marmorstein y Zhou, 2014). Mientras que en la metilación actúan las metiltransferasas de histonas (HMTs) y la fosforilación está dada por diferentes cinasas (Iizuka y Smith, 2003).

La acción de estas enzimas que genera cambios en la carga neta de los extremos N-terminal de las histonas que son inducidos por la presencia o la ausencia de los distintos grupos funcionales anteriormente mencionados, los cuales provocan una alteración entre la interacción DNA-histonas y, por consiguiente, un cambio local en la cromatina (McGinty y Tan, 2015).

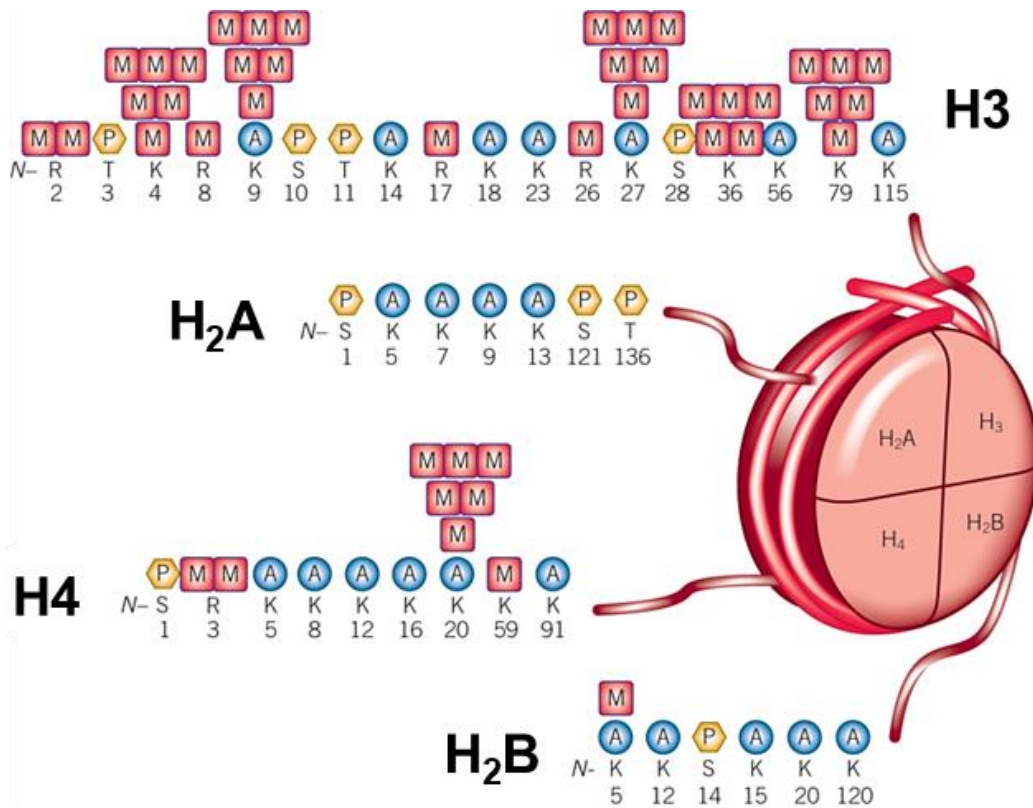
Además, los grupos funcionales presentes en algunos residuos de las histonas también pueden servir como sitios de reconocimiento y anclaje para que diversos elementos como los remodeladores de la cromatina, por ejemplo, puedan unirse y llevar a cabo sus funciones sobre esos sitios (Cairns *et al.*, 2009; Alekseyenko *et al.*, 2014).

Por mencionar un ejemplo, entre la gama de posibles modificaciones que pueden presentarse en las histonas (Figura 6), se sabe que las marcas de histonas H3K9ac y H3K14ac de la histona H3, así como en la H4K5ac tiene que ver con un estado transcripcionalmente activo, mientras que la desacetilación de esos mismos residuos propicia un estado transcripcionalmente inactivo (Fischle *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2007).

En años más recientes se han descrito otro tipo de modificaciones postraduccionales como la ubiquitinación, que pueden tener roles en la represión en la transcripción (Zhou *et al.*, 2008) o en vías de reparación de DNA (Fradet-Turcotte *et al.*, 2013). Por otro lado, la crotonilación en la K9 de la histona H3 (H3K9cr) se asocia con una activación transcripcional (Andrews *et al.*, 2016). Finalmente, se ha encontrado que la serotonilación de ciertos residuos como la H3Q5ser está involucrada en la activación transcripcional (Farrelli *et al.*, 2019).

Por último, en los dominios globulares se han descrito diversos tipos de modificaciones postraduccionales, donde se pueden encontrar residuos de K metilados, acetilados o ubiquitinados, residuos de R metilados, o residuos de S fosforilados que también contribuyen al remodelaje de la cromatina y tienen un papel en la regulación de la expresión génica (Suganuma y Workman, 2011) (Figura 6). Esta serie de modificaciones sobre algunos residuos de las histonas también pueden ser reconocidas por diversas proteínas que pueden ser activadoras o represoras de los genes (Canzio *et al.*, 2011).

Todas las modificaciones específicas en los residuos de aminoácidos en las histonas se han propuesto como un “código de histonas”, el cual tiene implicaciones biológicas relevantes, ya que pueden tener efecto en regiones donde se encuentran promotores o enhancers, a un nivel de dominio que puede estar compuesto por un grupo de genes e incluso a un nivel cromosómico como en el caso del silenciamiento del cromosoma X (Jenuwein y Allis, 2001; Fischle *et al.*, 2003).



**Figura 6:** Diferentes modificaciones post-traduccionales en las histonas H2A,H2B, H3 y H4 (sólo se muestran las descritas en las colas de las histonas). (Modificado de Salazar-Montes *et al.*, 2016).

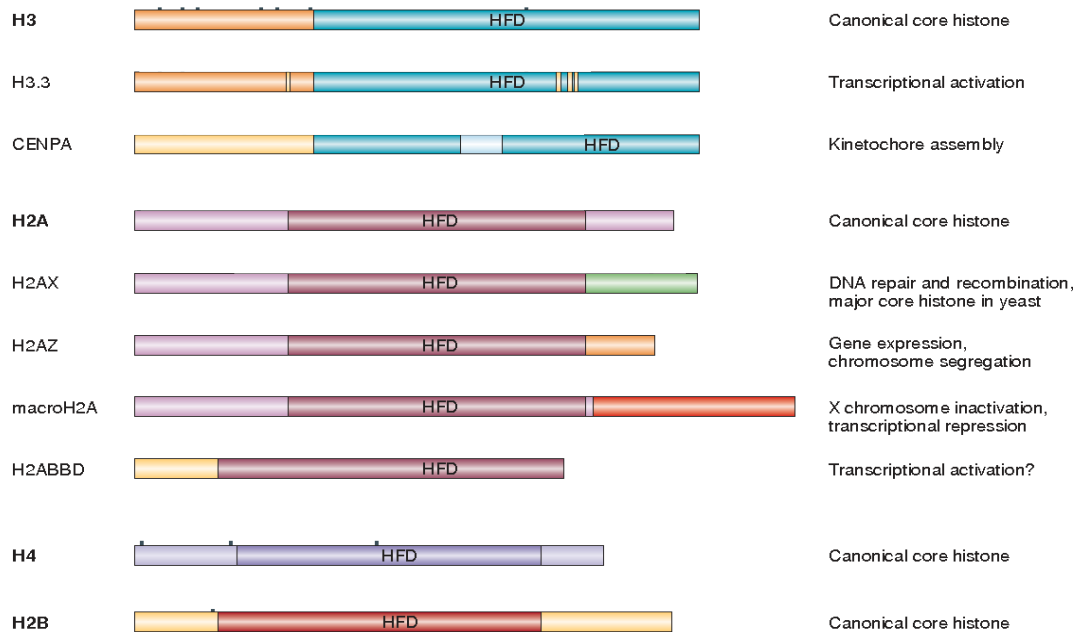
### 1.2.2.- Variantes de histonas

Las histonas H2A, H2B, H3 y H4 son conocidas como histonas canónicas y pueden ser sustituidas por variantes que pueden tener ciertos residuos diferentes o contar con dominios extras, por lo que la presencia de estas variantes en un nucleosoma puede desencadenar una función especializada (Figura 7) (Ahmad y Henikoff, 2002; Iizuka y Smith, 2003).

Mediante el posicionamiento de estas variantes en regiones específicas del genoma se pueden desencadenar y/o favorecer procesos entre los que destacan la replicación, el silenciamiento y la reparación (Figura 7). Debido a ello, las variantes de histonas tienen consecuencias importantes en distintos eventos a nivel celular (Ahmad y Henikoff, 2002).

Generalmente las histonas canónicas se sintetizan *de novo* en la fase S del ciclo celular y son depositadas durante la replicación del DNA. Sin embargo, hay histonas que son sintetizadas fuera de la fase S. Entre ellas, se encuentran las variantes de la histona H3 de *Drosophila* conocidas como H3.3 y CENPA (Lorch *et al.*, 1999).

La variante H3.3, por ejemplo, participa en promover un estado de activación transcripcional (Figura 7) cuando se asocia con regiones promotoras y con enhancers. Y, por otro lado, se ha demostrado que es depositada en regiones heterocromáticas gracias a un complejo formado por la chaperona DAXX y el factor ATRX (del que se hablará más adelante) y así favoreciendo su transcripción (Lewis *et al.*, 2010). Además, hay que destacar que la variante H3.3 puede albergar la marca H3K9me3 que, como se mencionó anteriormente, es una marca que contribuye al silenciamiento en las regiones donde la histona se deposita, lo cual es esencial para el mantenimiento de un estado heterocromático, así como la estabilidad de los telómeros (Udugama *et al.*, 2015).



**Figura 7:** Histonas canónicas y sus variantes con sus respectivas actividades asociadas. "HDF": histone folding domain (Modificado de Sarma y Reinberg, 2005).

### 1.2.3.- Complejos remodeladores de la cromatina

Los complejos remodeladores de la cromatina (CRC) pueden ser descritos como maquinarias multiproteicas especializadas que permiten el acceso al DNA, alterando la estructura, posición o composición de los nucleosomas de manera temporal. Los CRC están involucrados en la activación transcripcional al modificar la arquitectura de la cromatina mediante la remodelación de los nucleosomas localizados en regiones donde están presentes promotores o enhancers, los cuales regulan el inicio de la transcripción de un gen e incrementan sus niveles de transcripción respectivamente (Cairns *et al.*, 2009).

Debido a lo anterior, los CRC contribuyen a la activación o represión de genes controlando y alternando entre los estados de la eucromatina y heterocromatina, lo cual a su vez permite una alta regulación en la expresión génica (como la que ocurre en tejidos específicos o en algún momento concreto del desarrollo) (Cairns *et al.*, 2009).

Los CRC son dependientes de la hidrólisis de ATP, por esa razón todos cuentan con una subunidad que posee un dominio ATPasa que es altamente conservado en eucariontes. Además, los CRC han sido clasificados en familias de acuerdo con sus funciones principales, así como el grado de conservación de sus dominios ATPasa (Saha *et al.*, 2006).

En eucariontes se han descrito 4 familias de CRC, los cuales median un gran número de procesos biológicos entre los que destacan la activación y regulación de la RNAPol II (Hirschhorn *et al.*, 1992; Armstrong *et al.*, 2002), el intercambio de histonas o el silenciamiento y la represión transcripcional (Wade *et al.*, 1999).

Entre las familias de remodeladores de la cromatina se puede mencionar a (I) INO80 cuyos miembros participan en la reparación, la transcripción del DNA y la recombinación homóloga (Downs *et al.*, 2004; Morrison *et al.*, 2004; van Attikum *et al.*, 2004; Tsukuda *et al.*, 2005; Saha *et al.*, 2006; Clapier and Cairns, 2009).

(II) la familia ISWI cuyos elementos ayudan a conducir el ensamblaje y la organización de la cromatina porque ayudan a mantener el espaciamiento que existe entre los cromosomas (Längst *et al.*, 1999). Además, están involucrados en el intercambio de dímeros de histonas en los nucleosomas (Clapier *et al.*, 2017) y actúan sobre nucleosomas que no están acetilados en regiones que no son activas transcripcionalmente (Corona *et al.*, 2002).

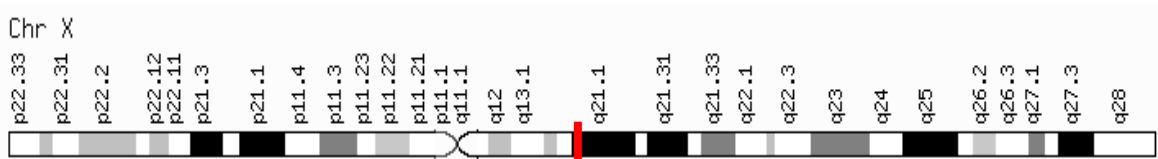
(III) los miembros de la familia CHD están involucrados en diversos procesos como la elongación de la transcripción y la maduración de los nucleosomas (Clapier *et al.*, 2017), mientras que algunos miembros presentan roles represivos ya que poseen actividad de desacetilasa de histonas (Denslow and Wade, 2007; Clapier and Cairns, 2009).

Por último, (IV) los miembros de la familia SWI/SNF pueden deslizar o expulsar los nucleosomas con respecto a la molécula de DNA para así dejar al material genético más accesible (Whitehouse *et al.*, 1999). Además, la función de esta familia también se ha correlacionado con una activación de la transcripción, intercambio de histonas, recombinación homóloga y reparación del DNA (Whitehouse *et al.*, 1999; Saha *et al.*, 2006; Clapier and Cairns, 2009; Juhász *et al.*, 2018; Lovejoy *et al.*, 2020).

### 1.3.- ATRX

Se sabe que en humanos las mutaciones o defectos que afectan a los CRC, así como a otros factores involucrados en la remodelación de la cromatina pueden derivar en diferentes patologías y síndromes, como es el caso de mutaciones presentes en una proteína denominada como ATRX (Gibbons *et al.*, 1995).

El gen *ATRX*, (conocido en humano como *hATRX*) se encuentra en el cromosoma X localizado en la banda citogenética Xq21.1 (Figura 8) en las coordenadas genómicas; X: 77,504,877 - 77,786,268 (OMIM, 2018; NCBI, 2018). *hATRX* tiene una longitud de aproximadamente 300 kilobases (kb) de DNA (Gibbons *et al.*, 1995), contiene 36 exones y al ser transcrito codifica al menos para dos isoformas; una de 280 kilodalton (kDa) y otra de 180 kDa (Figura 9) (GeneCards, 2018).



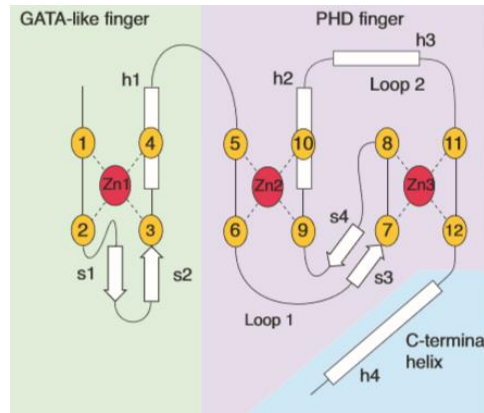
**Figura 8:** Localización del gen *hATRX* (rojo) en el cromosoma X de humano, en la banda citogenética q21.1 (Tomado de GeneCards, 2018).

La isoforma de 280 kDa contiene dos dominios altamente conservados; En su extremo C-terminal presenta un dominio ATPasa/Helicasa que es característico de la familia de remodeladores de la cromatina SWI/SNF (Figura 9A) (Argentaro *et al.*, 2007). Mientras que su extremo N-terminal posee un dominio denominado ADD, el cual está compuesto de un dedo de Zinc (Zn) del tipo PHD y un dedo de Zn de tipo GATA (Figura 10). Esta región también es conocida como ATRX-DNMT3b-DNMT3L debido a su homología con un dominio presente en las DNA metil-transferasas que no se encuentra en ninguna otra proteína, aunque hay que recalcar que ATRX no presenta actividad de metil-transferasa (Argentaro *et al.*, 2007).

Por otro lado, la isoforma de 180 kDa es conocida como *hATRX<sub>t</sub>*, la cual es generada por splicing alternativo en donde el intrón 11 es retenido generando un codón de paro prematuro lo que provoca la formación de un polipéptido que carece del dominio C-terminal incluyendo el dominio ATPasa/Helicasa (Figura 9B) (Garrick *et al.*, 2004).



**Figura 9:** Isoformas de *hATRX* conocidas en humano (Modificado de Bérubé *et al.*, 2011).



**Figura 10:** Estructura del dominio ADD de la proteína hATRX (Tomado de Argentaro *et al.*, 2007).

Entre las funciones en las que está implicada (al menos la isoforma de 280 kDa de hATRX) están; 1) La deposición de la histona H3.3 en regiones teloméricas, pericentroméricas y en zonas ricas en secuencias repetidas (Lewis *et al.*, 2010), 2) Silenciamiento de retrotransposones del tipo ERVs (He *et al.*, 2015), 3) Mantenimiento de la estabilidad del genoma en los genes ZNF (Zinc Finger Genes) preservando la marca H3K9me3 (Valle-García *et al.*, 2016), 4) Supresión de la vía ALT (Alternative telomere lengthening) (Clynes *et al.*, 2015) y 5) Reparación de *double strand breaks* (DSBs) en telómeros (Lovejoy *et al.*, 2020).

En cuanto a las implicaciones funcionales de los dominios conservados, se sabe que el dominio ADD reconoce la H3K9me3 (Dhayalan *et al.*, 2011). De este modo, hATRX puede dirigir la chaperona DAXX a telómeros y heterocromatina pericentromérica y contribuir con la deposición de la histona H3.3 (Lewis *et al.*, 2010, Goldberg *et al.*, 2010). Debido a lo anterior, hATRX está involucrada en la correcta replicación de regiones teloméricas y pericentroméricas (Sadik *et al.*, 2015).

De acuerdo con el grado de conservación del dominio ATPasa/Helicasa con otras proteínas de la familia SWI/SNF de remodeladores de la cromatina, así como la actividad ATPasa que tiene, ATRX es reconocido como un componente de un CRC (Argentaro *et al.*, 2007). Además, este dominio es responsable de dirigir la proteína hacia los PML-bodies (promyelocytic Leukaemia Bodies) los cuales actúan como reguladores epigenéticos secuestrando, degradando o remodelando proteínas (Bérubé *et al.*, 2008).

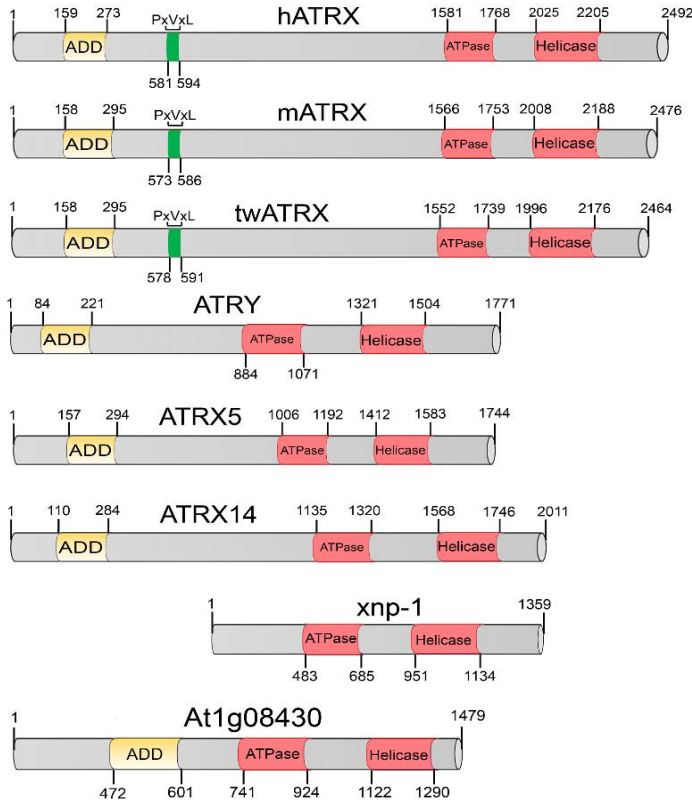
Diversos estudios han demostrado que *hATRX* puede presentar un gran número de mutaciones, las cuales ocurren mayoritariamente en el dominio ADD o en el dominio ATPasa/Helicasa. Dichas mutaciones pueden desencadenar un cambio en la funcionalidad de la proteína teniendo efectos negativos en las vías en las que participa (Gibbons *et al.*, 1997; Argentaro *et al.*, 2007).

Cabe destacar que la proteína ATRX recibe su nombre debido a que diversas mutaciones en el dominio ADD o ATPasa/Helicasa pueden desencadenar el síndrome de Alfa-Talasemia con Retraso mental ligado al cromosoma X (Alpha-Talasemia/Mental Retardation, X-linked) (ATR-X) (Gibbons *et al.*, 1995). Síndrome que afecta únicamente a hombres los cuales muestran entre otras cosas, un retraso mental en diferentes grados, dimorfismos craneofaciales, presencia de inclusiones HbH en sangre, malformaciones esqueléticas y urogenitales (Gibbons, 2006).



### 1.3.1.- ATRX en *Drosophila melanogaster*

ATRX es una proteína que se encuentra muy conservada en la evolución, teniendo ortólogos en ratón (Picketts *et al.*, 1998), marsupiales (Park *et al.*, 2004, Park *et al.*, 2005), pez cebra (Ibarra-Morales, 2014), *Drosophila* (Basset *et al.*, 2008, López-Falcón *et al.*, 2014), *Caenorhabditis elegans* (Bender *et al.*, 2004) y *Arabidopsis thaliana* (Duc *et al.*, 2017) (Figura 11), por mencionar algunos ejemplos.



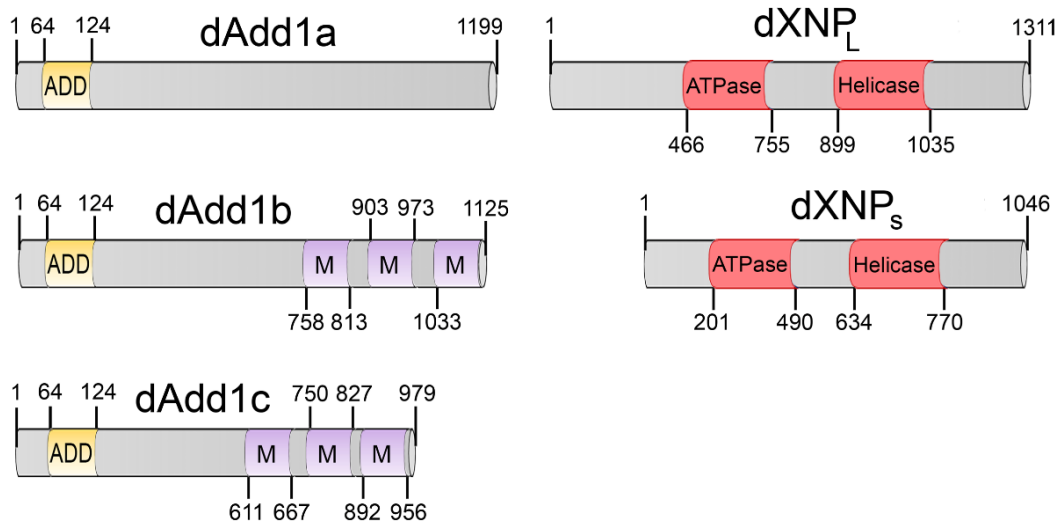
**Figura 11:** Conservación en la evolución de la proteína ATRX. ATRX tiene como característica principal un dominio ADD cercano al extremo N-terminal (Excepto en *C. elegans*) y un dominio ATPasa/Helicasa cercano al extremo C-terminal. hATRX (humano), mATRX (ratón), twATRX (tammar wallaby), ATRY: corresponde a un ortólogo de ATRX encontrado hasta la fecha únicamente en marsupiales cuyo gen se encuentra en el cromosoma Y. ATRX5 y ATRX14 son dos homólogos encontrados en pez cebra cuyos genes se encuentran en el cromosoma 5 y 14 respectivamente. Xnp-1 es el ortólogo de ATRX en *C. elegans*, el cual contiene únicamente el dominio ATPasa/Helicasa, pero carece de un dominio ADD. At1g08430 es un ortólogo de ATRX descrito en *A. thaliana*.

A pesar del grado de conservación que existe en el dominio ADD y ATPasa/Helicasa en eucariontes, anteriormente se había reportado que los ortólogos de esta proteína en *D. melanogaster* o *C. elegans* carecían de un dominio ADD (Argentaro *et al.*, 2007). Sin embargo, se ha demostrado que el ancestro común de los eucariontes superiores poseía la proteína ATRX la cual contenía el dominio ATPasa/Helicasa y el dominio ADD. En el caso de la clase *Insecta*, se ha sugerido que probablemente por medio de un evento de fisión, estos dominios quedaron separados y ahora cada uno es codificado por un gen diferente (López-Falcón *et al.*, 2014).

El primer gen ortólogo de hATRX en *D. melanogaster* que se identificó fue *dxnp* (*Drosophila* X-linked Nuclear Protein), el cual codifica para dos isoformas diferentes (Figura 12). (I) Una isoforma larga denominada  $dxnp_L$  de 148.2 kDa que se localiza en regiones heterocromáticas y el cromocentro de cromosomas politénicos. (II) una isoforma corta que es conocida como  $dxnp_s$  de 119 kDa la cual se produce por un sitio de inicio alternativo de la traducción y se sabe que se localiza en regiones de eucromatina (Bassett *et al.*, 2008). Tanto  $dxnp_L$  como  $dxnp_s$  se caracterizan por presentar en el extremo C-terminal el dominio Helicasa/ATPasa del tipo SNF2 (Sucrose Non-Fermenting 2) pero carecen de un dominio ADD en el extremo N-terminal (Figura 12) (López-Falcón *et al.*, 2014).

En cuanto a las funciones de estas isoformas, se ha reportado que en *D. melanogaster* dXNP y HIRA (que es una chaperona involucrada en la deposición de la histona H3.3) co-localizan en regiones menos compactadas del genoma, lo que sugiere que ambas proteínas actúan de manera conjunta y tienen un papel regulatorio (Schneiderman *et al.*, 2012).

El segundo gen ortólogo de ATRX en *D. melanogaster* es *dAdd1*, el cual codifica para al menos tres isoformas denominadas como; dAdd1a (130 kDa), dAdd1b (127 kDa) y dAdd1c (112 kDa) (Figura 12), las cuales se generan por splicing alternativo y contienen un dominio ADD en el extremo N-terminal, pero carecen del dominio ATPasa/Helicasa en su C-terminal (López-Falcón *et al.*, 2014). Además, las isoformas b y c presentan en su extremo C-terminal un dominio extra de tipo MADF (myb-SANT-like domain in Adf1) que putativamente puede reconocer secuencias repetitivas de DNA y que parece solo estar presente en la clase *Insecta* (Alekseyenko *et al.*, 2014; López-Falcón *et al.*, 2014).



**Figura 12:** ATRX en *D. melanogaster*. El dominio ADD es codificado por un gen conocido con el mismo nombre el cual genera 3 isoformas (dAdd1a, dAdd1b y dAdd1c). (M= MADF domain). Mientras el dominio ATPasa/Helicasa es codificado por el gen *dxnp* el cual genera dos isoformas (dXNP<sub>L</sub> y dXNP<sub>S</sub>) (Modificado de Bassett *et al.*, 2008 y López-Falcón *et al.*, 2014).

Se ha demostrado con ensayos de pull-down que las tres isoformas de dAdd1 tienen una región común con la que interactúan con el extremo N-terminal de dXNP<sub>L</sub>. Cabe destacar que dAdd1 y dXNP no siempre se encuentran unidas lo que sugiere pueden tener funciones independientes (López-Falcón *et al.*, 2014).

Además, se sabe que pueden tener actividades en conjunto ya que la isoforma dAdd1a junto a dXNP<sub>L</sub> son necesarias para el mantenimiento telomérico porque dirigen a la proteína HP1a hacia esas regiones (Chávez *et al.*, 2017). Debido a lo anterior, se sugiere que en conjunto dAdd1 y dXNP<sub>L</sub> mantienen el estado de heterocromatina en algunas regiones y actúan como supresores de un efecto de variegación (Alekseyenko *et al.*, 2014; López-Falcón *et al.*, 2014).

Por otro lado, existen datos de nuestro grupo de trabajo obtenidos mediante experimentos de ChIP-seq en donde se ha determinado los sitios de unión en la cromatina de dAdd1 y se ha encontrado que esta proteína co-localiza en muchas regiones donde también existe la unión de proteínas de arquitectura sugiriendo otro tipo de actividades (Datos no publicados).

#### 1.4.- Proteínas de arquitectura

A las proteínas de arquitectura (PA) inicialmente les fue adjudicada la capacidad de bloquear el contacto entre promotores y enhancers mediante una actividad de bloqueo de enhancer. Además, las PA pueden delimitar regiones de heterocromatina y eucromatina ya que han demostrado tener una actividad de insulador (Bell y Felsenfeld 2000).

Por otro lado, las PA pueden mediar interacciones intra- e intercromosomales al promover contactos entre elementos reguladores mediante la formación de loops de la cromatina (Figura 1), tienen un rol en la organización y arquitectura de la cromatina (de ahí que se llamen proteínas de arquitectura) (Van Bortle y Corces, 2012; Maksimenko y Georgiev, 2014). Además, se ha demostrado que las PA contribuyen al establecimiento de los TADs ya que se sabe que están enriquecidas en las fronteras entre estos dominios, generando una delimitación entre TADs diferentes (Valadez-Graham *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2012).

En humanos, se han identificado varias PA, pero hasta el momento sólo una proteína conocida como CTCF se ha reportado que es esencial para la formación de los loops de la cromatina (Van Bortle y Corces, 2012; Gómez-Díaz y Corces, 2014).

Por otro lado, en *D. melanogaster* se han identificado un total de 15 PA diferentes, donde aparentemente CTCF no es esencial para la formación de los loops de la cromatina, sino que, para ello, intervienen otras PA (Bushey *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2012; Van Bortle *et al.*, 2014; Cubeñas-Potts y Corces, 2015; Maksimenko *et al.*, 2015).

Basándose en sus propiedades bioquímicas y funcionales, las PA pueden dividirse en tres grupos. El primero, corresponde a proteínas de unión a secuencias específicas del DNA como; CCCTF-binding factor (CTCF), Supresor of Hairy-wing (Su(Hw)), Centrosomal Protein 190 (CP190), Boundary Associated Element Factor 32 (BEAF-32), Zinc Finger Interaction with CP190 (ZIPIC), Insulator Binding Factor I y II (Ibf1 e Ibf2) y pita (Bushey *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2012; Cuartero *et al.*, 2014; Maksimenko *et al.*, 2015).

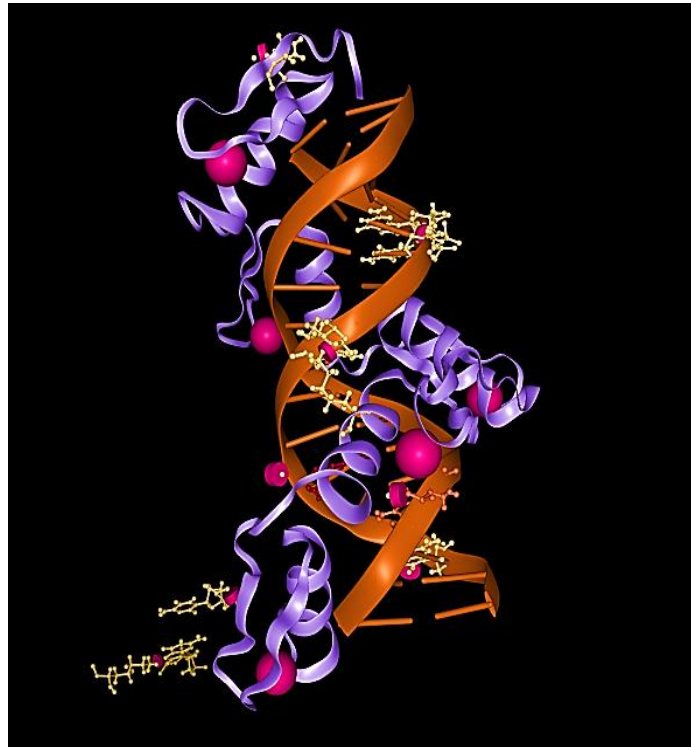
El segundo grupo está integrado por proteínas que no pueden unirse directamente al DNA, aunque sí pueden mediar interacciones con otras PA debido a varios dominios que poseen, en este grupo se incluye a Modifier of mdg4 (Mod(mdg4)), Rad-21 y Cap-H2 (Espinàs *et al.*, 1999; Van-Bortle *et al.*, 2012).

Y en el tercer grupo se encuentran proteínas bioquímicamente diversas como; Elba1, Elba 2, Elba 3 y Shep, las cuales pueden modular el contacto entre enhancers con sus secuencias blanco por medio de otros insuladores, actuando principalmente en etapas concretas del desarrollo o en tejidos específicos (Aoki *et al.*, 2012; Matzat *et al.*, 2012).

Adicionalmente, existe evidencia que indica que las PA actúan como complejos y están presentes a lo largo de la cromatina en diferentes combinaciones y así regulan la expresión génica, por lo que es de especial interés encontrar cómo actúan en conjunto para llevar a cabo sus funciones (Vogelmann *et al.*, 2014).

### 1.4.1- CTCF (CCCTC-binding factor)

CTCF es una proteína con una expresión ubicua (Chen *et al.*, 2012) que posee un dominio central compuesto por 11 dedos de zinc (Figura 13) (Klenova *et al.*, 1993). Además, se sabe que es una proteína muy conservada en vertebrados ya que muestra >93% de identidad de aminoácidos entre el humano y el pollo (Filippova *et al.*, 1996). Sin embargo, está ausente en varios grupos taxonómicos como levaduras, plantas y *C. elegans* (Heger *et al.*, 2012).



**Figura 13:** Estructura 3D de CTCF de humano obtenida mediante difracción de rayos X (resolución 1.744 Å). Se muestra la proteína (morado) y siete átomos de Zn (esferas rosas) interactuando con los surcos mayores de la molécula de DNA (naranja) (Tomado de <http://www.rcsb.org/3d-view/5T00>).

Respecto a sus funciones, CTCF inicialmente fue identificado como un represor capaz de unirse a los promotores de los genes *MYC* de aves y mamíferos (Filippova *et al.*, 1996), y posteriormente se demostró que tenía una función de insulador porque regula indirectamente la expresión de genes previniendo la unión entre promotores y enhancers o silencers cercanos, evitando así la inapropiada activación o silenciamiento de ciertos genes (Bell y Felsenfeld 2000; Hark *et al.*, 2000).

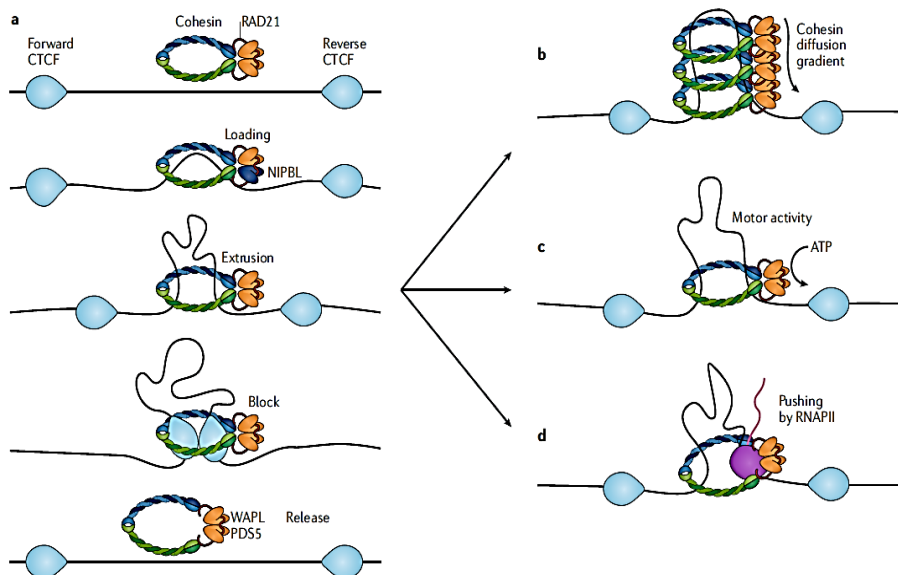
Por otra parte, se ha reportado que CTCF en vertebrados está involucrado en determinar la estructura de la cromatina, ya que se ha encontrado mediante análisis de Hi-C que mayoritariamente en los límites de los TADs existe un enriquecimiento de sitios de unión a CTCF, aunque hay que aclarar que no todos los TADs están flanqueados por esta proteína (Dixon *et al.*, 2012).

Análisis computacionales que se han hecho utilizando diferentes algoritmos como por ejemplo “Arrowhead” han identificado que dentro de los TADs existen múltiples interacciones entre secuencias de DNA, las cuales se mantienen cercanas a la par que existe un enriquecimiento de CTCF en esos sitios. Lo anterior significa que las interacciones entre secuencias de DNA que se encuentran distantes entre sí son producto de la formación de loops de la cromatina, los cuales están mediados por la presencia de CTCF, por lo que en mamíferos CTCF ha sido reconocida como la única proteína esencial para la formación de esos loops (Rao *et al.*, 2014).

Observaciones experimentales han indicado que existen motivos en una orientación convergente (Forward-Reverse) los cuales sirven como una especie de ancla para que CTCF se una al DNA de una manera que facilite su posicionamiento en un espacio 3D muy restringido (Figura 14a) (Rao *et al.*, 2014; Fudenberg *et al.*, 2016; Rowley y Corces, 2018).

Si bien no se sabe exactamente como es que se forman los loops de la cromatina con la ayuda de CTCF, se ha propuesto el modelo del “loop extrusion” (Figura 14), el cual sugiere que la cohesina la cual está compuesta de las proteínas SMC (structural maintenance of chromosomes) y RAD 21 son dirigidas a la cromatina con la ayuda de la proteína NIPBL (Nipped B-like Protein) y juntas “jalan” la hebra de DNA hasta el momento en que el anillo de cohesinas se atasca con CTCF que se encontraría previamente posicionado sobre su secuencia blanco (Figura 14a).

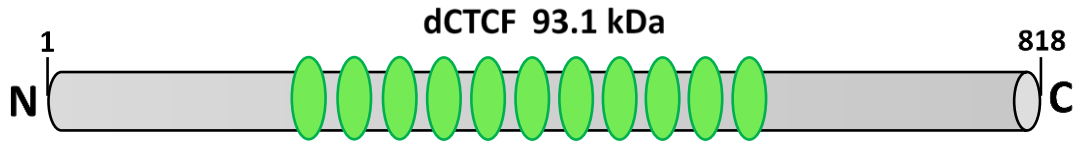
La forma en que las cohesinas jalan la fibra de cromatina aún es una incógnita, pero se han propuesto tres diferentes mecanismos: En el primero la extrusión del DNA sería producto de un gradiente de difusión generado por la misma cohesina (Figura 14b) (Brackley *et al.*, 2017). Una segunda posibilidad sería que la cohesina mediante la hidrólisis de ATP funcione como un motor que jale la fibra de cromatina (Terakawa *et al.*, 2017) (Figura 14c). Y la tercera posibilidad sería que la extrusión se genere por mediante la actividad de la RNAPol II la cual actuaría jalando la hebra de DNA (Stigler *et al.*, 2016) (Figura 14d).



**Figura 14:** Modelo de loop extrusion mediado por CTCF y el complejo de cohesinas (Tomado de Rowley y Corces, 2018).

### 1.4.2.- dCTCF

CTCF es un gen que tiene un solo ortólogo en casi todos los metazoarios con simetría bilateral (Heger *et al.*, 2012). Por otro lado, en *Drosophila* este gen es conocido como *dCTCF* y codifica para una proteína con el mismo nombre, la cual tiene un peso molecular de 93.1 kDa (Figura 15).



**Figura 15:** Modelo lineal de dCTCF 93.1 kDa, mostrando sus 11 dedos de zinc en verde. (Modificado de <sup>1</sup>FlyBase, 2018).

Se sabe que tanto CTCF de humano como de *Drosophila* tienen dominios muy similares y una función conservada, lo que indica que la actividad de insulador de esta proteína está preservada por lo menos desde *Drosophila* hasta el humano (Moon *et al.*, 2005).

En diferentes estudios se ha encontrado que CTCF está presente en decenas de miles de sitios independientes dentro del genoma tanto en humano como en *D. melanogaster* (Bushey *et al.*, 2009; Cuddapah *et al.*, 2009).

Además, otros grupos de trabajo han demostrado que dCTCF es capaz de funcionar como un delimitador de eucromatina y heterocromatina, y puede evitar la heterocromatinización en regiones de eucromatina adyacentes, por lo que, de igual manera a la proteína de humano, presenta una actividad de insulador (Bartkuhn *et al.*, 2009).

En *D. melanogaster*, dCTCF y CP190 co-localizan en las fronteras de muchos dominios que presentan un enriquecimiento de la marca H3K27me3, donde la eliminación de dCTCF resulta en un esparcimiento del efecto de la heterocromatina, sugiriendo que la estructura de la cromatina en esos dominios está mediada por la presencia de dCTCF (Bartkuhn *et al.*, 2009).

Además, el patrón de distribución de dCTCF a lo largo del genoma, sugiere que esta proteína puede jugar un rol tanto en la regulación individual de genes, así como en la organización global del genoma de la mosca (Barthkuhn *et al.*, 2009).

En cuanto al papel de dCTCF en la organización del genoma, existen dos diferencias con respecto a CTCF; la primera es que en *Drosophila* dCTCF no es esencial en la formación de los loops de la cromatina (Van Bortle y Corces, 2012; Ong y Corces, 2014). La segunda diferencia es que en *D. melanogaster* se ha observado que el complejo de cohesinas se localiza de manera independiente de dCTCF en genes que son transcripcionalmente activos (Misulovin *et al.*, 2008). Por ello, en vez de cohesinas dCTCF posiblemente forme complejos con otras PA que son exclusivas de la mosca como CP190 o Mod(mdg4) (Van Bortle y Corces, 2012) y de esta manera tener un papel en la regulación de la expresión génica y en la organización global del genoma de *Drosophila*.

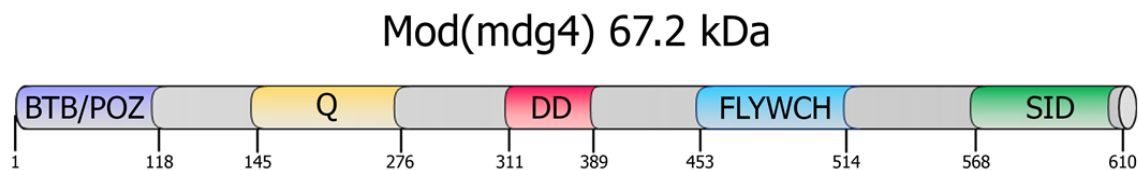
### 1.4.3.- Modifier of mdg4 (Mod(mdg4))

El gen *Evar3-93D* que actualmente es conocido como *Mod(mdg4)* (Gerasimova *et al.*, 1995) está localizado en el cromosoma 3R de *D. melanogaster*, en las coordenadas genómicas 3R: 21,350,846 – 21,377,401 y tiene un tamaño aproximado de 30 kb. Este gen codifica para al menos 36 isoformas proteicas (FlyBase<sup>2</sup>, 2018) que se generan principalmente por transplicing (Gao *et al.*, 2015).

Es importante señalar que todas las isoformas de Mod(mdg4) poseen una región común de 402 aminoácidos en el extremo N-terminal la cual es codificada por los primeros cuatro exones del transcrito, pero todas difieren en el extremo C-terminal (Gao *et al.*, 2015). Debido a lo anterior, todas las isoformas de Mod(mdg4) que se conocen actualmente contienen un dominio BTB/POZ, una región que es rica en glutamina y un dominio de dimerización (Figura 16) (Golovnin *et al.*, 2007).

Anteriormente se creía que únicamente la isoforma de Mod(mdg4) de 67.2 kDa (Figura 16) era la única que podría tener contar con una actividad asociada con múltiples proteínas de arquitectura como lo es Su(Hw) (Golovnin *et al.*, 2007). Ya que esta isoforma en su extremo C-terminal posee un dominio de unión a Su(Hw). Sin embargo, estudios más recientes han encontrado que Mod(mdg4) de 67.2 kDa también interactúa con Su(Hw) mediante su región rica en glutamina (Melnikova *et al.*, 2017) lo que sugiere que todas las isoformas podrían asociarse a Su(Hw).

Mod(mdg4) de 67.2 kDa posee en su extremo N-terminal el dominio BTB/POZ (bric-a-brac, tramtrack and broad complex/poxvirus and zinc finger) seguido de una región rica en glutamina (Q) y un dominio de dimerización (DD). Sin embargo, es la única isoforma de Mod(mdg4) que contiene un dominio denominado como FLYWCH (nombrado así por su secuencia aminoacídica), así como el dominio de interacción con Su(Hw) conocido como SID (Supresor of Hairy Wing Interacting Domain)\_(Figura 16).



**Figura 16:** Modelo lineal de Mod(mdg4) 67.2 kDa, mostrando en el extremo N-terminal el dominio de tipo BTB/POZ en morado, una región rica en glutamina (amarillo), un dominio de dimerización (rojo), una región denominada FLYWCH (azul) y un dominio de interacción con la proteína de arquitectura Su(Hw) (SID) (verde) en el C-terminal (Modificado de Melnikova *et al.*, 2017).

El dominio BTB/POZ es un motivo conservado en muchas proteínas el cual está involucrado en formar interacciones proteína-proteína (Stoggios *et al.*, 2005). Este dominio pertenece a una gran familia de proteínas que están presentes desde levaduras hasta el humano, donde en general todas presentan una gran similitud entre los eucariontes (Stoggios *et al.*, 2005). Además de que este dominio pertenece al grupo de proteínas ttk (tramtrack) el cual contiene secuencias altamente conservadas que no se encuentran en otros dominios BTB (Bonchuk *et al.*, 2011).

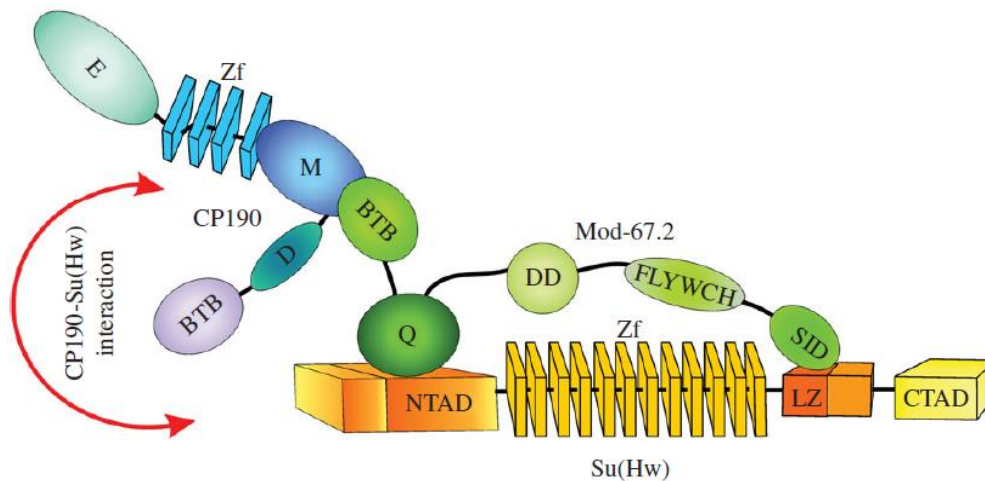
Se han identificado una gran variedad de roles funcionales para proteínas que contienen el dominio BTB/POZ, como la represión de la transcripción, regulación del citoesqueleto, apertura de canales iónicos, y en la ubiquitinación y degradación de proteínas (Melnick *et al.*, 2000; Stogios *et al.*, 2005).

Por otro lado, se ha reportado que el dominio BTB/POZ está presente en proteínas que son reguladoras de la transcripción génica y actualmente hay evidencia que indica que algunas proteínas que contienen este dominio también están involucradas en el control de la estructura de la cromatina (Bonchuk *et al.*, 2011).

Cabe señalar que las proteínas que contienen un motivo del tipo BTB/POZ generalmente contienen dedos de zinc o algún otro dominio que pueda unirse al DNA. Sin embargo, Mod(mdg4) no posee ninguno, debido a eso se ha propuesto que realiza sus funciones a través de otras proteínas mediante una unión directa proteína-proteína (Gerasimova *et al.*, 1995; Stogios *et al.*, 2005; Bonchuk *et al.*, 2011).

Existen estudios que sugieren que la isoforma de 67.2 kDa de Mod(mdg4) tiene un rol general en el establecimiento de la estructura de la cromatina en regiones heterocromáticas, además de regular la expresión de ciertos genes que son necesarios para el desarrollo de *D. melanogaster* (Savitsky *et al.*, 2016).

Por otro lado, el dominio BTB/POZ de cualquier isoforma de Mod(mdg4) se sabe que puede interactuar con otras PA como CP190. Mientras que Mod(mdg4)-67.2 kDa puede interactuar con Su(Hw) a través de su dominio SID y de su región rica en glutamina. Además, se ha propuesto que la región FLYWCH de esta isoforma sirve para el reclutamiento hacia Su(Hw) (Figura 17) (Melnikova *et al.*, 2017).



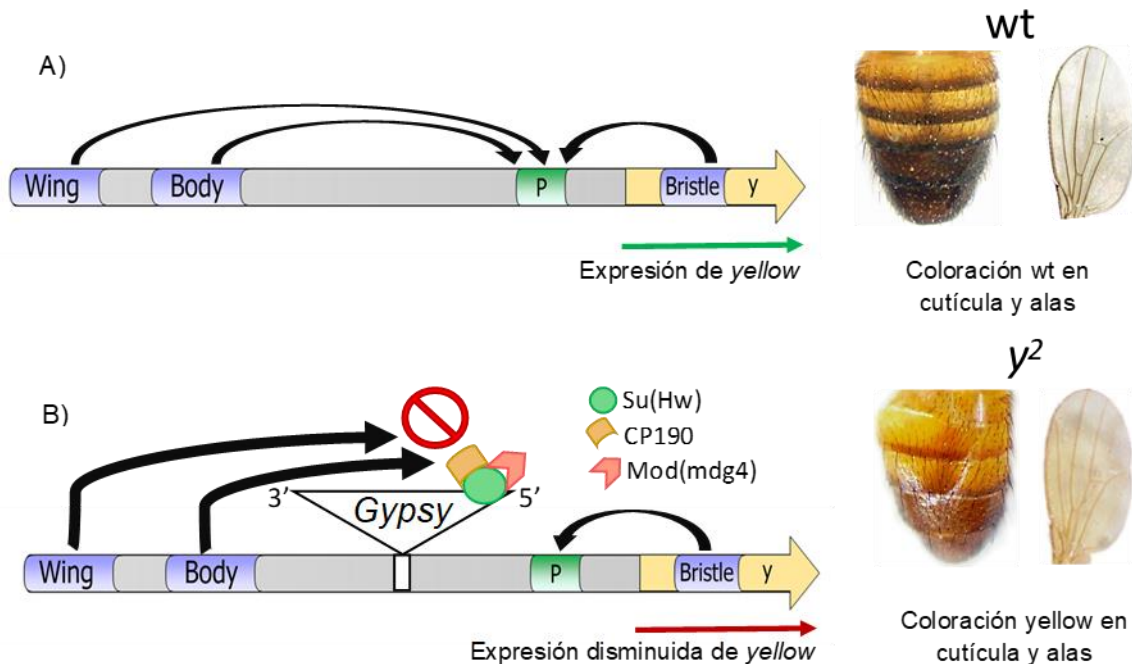
**Figura 17:** Representación esquemática de los dominios de interacción proteína-proteína de Mod(mdg4) de 67.2, con otras PA como Su(Hw) y CP190 entre los que se puede observar la participación de los dominios BTB/POZ, la región rica en glutamina (Q) y el dominio de interacción con Su(Hw) (SID). CP190 posee una región rica en ácido glutámico (E), cuatro dedos de Zn (Zf) un dominio de localización centrosómica (M), una región rica en ácido glutámico (D). Su(Hw) contiene un extremo N-terminal ácido (NTAD) y carboxilo ácido (CTAD) así como un zipper de leucina (LZ) (Tomado de Melnikova *et al.*, 2017).



El complejo que puede formarse entre Su(Hw), CP190 y Mod(mdg4) puede funcionar como un insulador disminuyendo la expresión de ciertos genes. Sin embargo, se sabe que estas proteínas no siempre están juntas en un mismo complejo, ya que se ha postulado que la unión de ellas en algunos sitios podría depender de la interacción de otras proteínas que puedan reconocer secuencias de DNA o alguna modificación postraduccional en las histonas (Melnikova *et al.*, 2017).

Uno de los insulador mejor caracterizados en *D. melanogaster* es el que funciona modulando la coloración de la cutícula, alas, y apéndices bucales. Este insulador comprende el gen *yellow* (*y*), el cual tiene 3 enhancer que son tejido-específicos. En una condición wt cada uno de estos enhancers dirige la expresión de *y* cuya proteína participa en una intrincada red de regulación generando una coloración wt en dichas estructuras (Figura 18A).

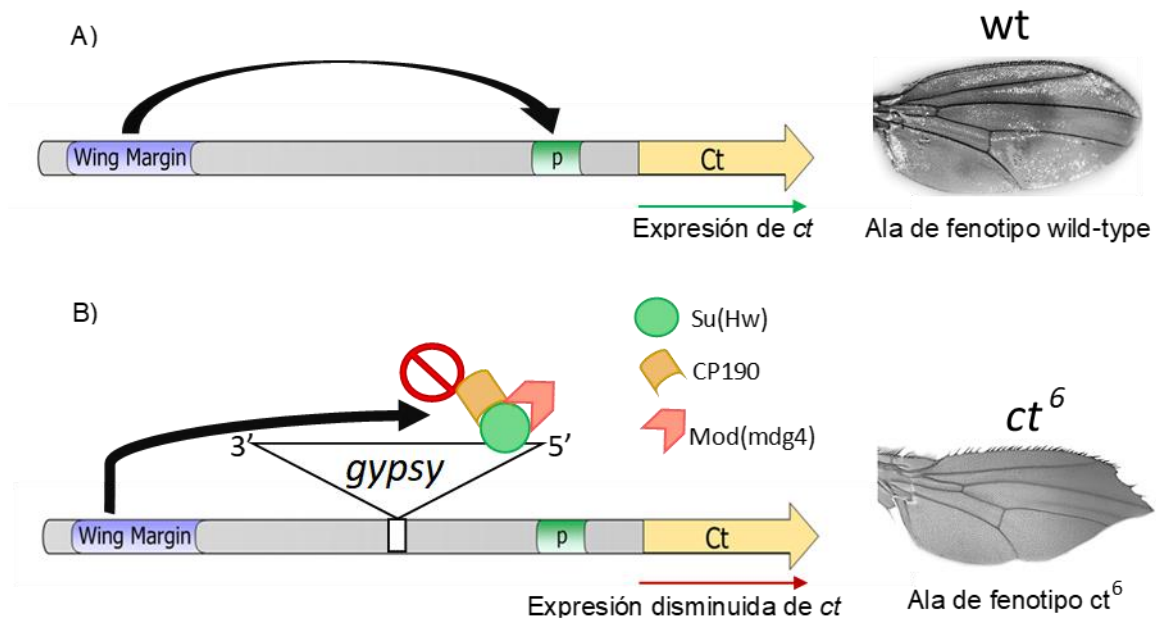
Existen diversos alelos para *y* como es el caso del alelo  $y^2$  (Figura 18B) el cual tiene como característica la inserción de un retrotransposón de 7.3 kb conocido como *Gypsy* (Stacey *et al.*, 1986) entre *yellow* y los enhancers que dirigen su expresión en el cuerpo y las alas. *Gypsy* cercano a su extremo 5' contiene 12 sitios de unión de Su(Hw) el cual a su vez recluta a CP190 y Mod(mdg4). El complejo Su(Hw)/CP190/Mod(mdg4) forma un insulador con actividad de bloqueo de enhancer que disminuye la expresión de *y* tanto en la cutícula como en las alas, lo que desencadena que los individuos portadores del alelo  $y^2$  tengan la cutícula y las alas de color amarillo.



**Figura 18:** A) Esquema (no a escala) del gen *y* siendo activado por sus enhancers específicos generando cutícula y alas de coloración wt. B) Esquema (no a escala) del alelo  $y^2$  con una inserción de *Gypsy* entre los enhancers de ala y cuerpo y el promotor (P) de *y*. *Gypsy* recluta el complejo Su(Hw)/CP190/Mod(mdg4) el cual tiene actividad de bloqueo de enhancer, y no permite la expresión de *y* lo cual genera que las moscas adultas presenten la cutícula amarilla, así como una coloración menos oscura en los últimos dos segmentos y alas de tonalidad amarilla.

Otro de los insulador mejor caracterizados en *D. melanogaster* es el que funciona modulando la determinación del borde del ala. En este caso, en una condición wt el gen *cut* (*ct*) es activado por un enhancer específico de margen de ala, cuya expresión desencadena una vía de señalización y diferenciación celular que da lugar a un contorno redondeado del ala (Figura 19A).

Sin embargo, existen alelos de *ct*, como es el caso de *ct<sup>6</sup>*, el cual tiene como característica la inserción de *Gypsy* entre el enhancer del margen del ala y *ct*. Al igual que ocurre en el alelo *y<sup>2</sup>*, *Gypsy* en este alelo también recluta el complejo Su(Hw)/CP190/Mod(mdg4) que tiene actividad de insulador. Este complejo una vez formado, impide la correcta expresión de *ct* debido a que interfiere en la interacción entre su región promotora y su enhancer específico, lo cual desencadena que no haya una correcta expresión de este gen y que el borde del ala adquiera un fenotipo “cortado”.



**Figura 19:** A) Esquema (no a escala) del gen *ct* siendo activado por su enhancer específico generando alas redondeadas con fenotipo wt. B) Esquema (no a escala) del alelo *ct<sup>6</sup>* con una inserción de *Gypsy* entre el enhancer y el promotor de *ct*, *Gypsy* es capaz de reclutar a Su(Hw) y esta a su vez a Mod(mdg4) formando un complejo con actividad de insulador que no permite la correcta expresión de *ct*, lo cual genera que las moscas adultas desarrollen un contorno del ala con forma recortada.

## 2.- Antecedentes

### 2.1.- Interacciones de las proteínas dAdd1 con proteínas de arquitectura

Nuestro grupo de trabajo en colaboración con el grupo del doctor Víctor Corces, realizó un análisis de ChIP-seq en células Kc167 de *Drosophila* (las cuales son embrionarias), para conocer los sitios del genoma donde se localizan las proteínas dAdd1 y se encontró que en *D. melanogaster* dAdd1 está presente en alrededor de 700 sitios diferentes (Datos no publicados).

Los resultados obtenidos se compararon con datos obtenidos a partir de otros ChIP-Seq hechos para diferentes PA y se encontró que de los 700 sitios donde estaba presente dAdd1 en el 70% de ellos existía una co-localización con algunas PA como dCTCF, Su(Hw), CP190 y Mod(mdg4) sobre secuencias regulatorias de algunos genes como por ejemplo *Abd-B* el cual es un gen homeótico encargado entre otras cosas de generar la identidad de los 3 últimos segmentos del individuo (Datos no publicados), sugiriendo así, un papel de estas proteínas la expresión de algunos genes involucrados en el desarrollo de *D. melanogaster*.

Además, el hecho de que existan picos de co-localización entre las proteínas dAdd1 y algunas PA sobre ciertas regiones regulatorias, podría sugerir que todas estas proteínas de alguna manera participan en la organización del genoma, contribuyendo ya sea a mantener los TADs separados o ayudando a estabilizar la formación de los loops de la cromatina, lo cual permitiría que estos dominios mantengan su identidad transcripcional de manera independiente (Cubebñas y Corces, 2015; Rowley y Corces, 2018).

Adicionalmente, a nuestro grupo le interesó saber si había una dependencia en la localización entre dAdd1 y las PA, por ello, se hicieron inmunotinciones de cromosomas politénicos de moscas homocigas nulas para dAdd1 y se encontró que la pérdida de dAdd1 provoca la disminución en más del 50% de dCTCF en los sitios que ocupaba (Datos no publicados).

Lo anterior, indica que dCTCF no sólo co-localiza con dAdd1 en múltiples sitios a lo largo del genoma, sino que además depende de las proteínas dAdd1 para unirse a la cromatina en ciertos sitios, por es razón en *D. melanogaster* la pérdida de dAdd1 podría afectar la formación de dominios sobre genes específicos, así como la unión de algunas de las PA.

Esta idea es apoyada porque se ha encontrado que CTCF puede unirse al mismo locus en diferentes tipos celulares y puede actuar como insulador en un tipo celular en específico, pero en otros no (Cuddapah *et al.*, 2009). Por todo lo anterior sugiere que al menos en *Drosophila* la unión de dCTCF por sí sola no es suficiente para mediar una función de insulador, y por esa razón las funciones de esta proteína podrían depender en gran medida de la interacción con otras proteínas como dAdd1 o alguna otra PA.

## 2.2.- Interacción de CTCF con otras proteínas de arquitectura.

En *D. melanogaster*, se ha encontrado que dCTCF co-localiza con CP190 en las fronteras de muchos dominios que contienen la marca H3K27me3, y la eliminación ya sea de dCTCF o CP190 resulta en un esparcimiento de las regiones de heterocromatina, lo que sugiere que la estructura de la cromatina en las fronteras de esos dominios está determinada por la actividad de insulador de esas dos proteínas (Bartkuhn *et al.*, 2009).

Por otro lado, existen estudios donde se hizo un mapeo de la localización de proteínas de arquitectura mediante un ensayo de ChIP-ChIP y se ha encontrado que dCTCF es capaz de reclutar proteínas que contienen un dominio BTB como es el caso de Mod(mdg4) y CP190, las cuales se ha demostrado son necesarias para su actividad de insulador (Gerasimova *et al.*, 2007).

## 2.3.- Interacción de Mod(mdg4) con otras proteínas de arquitectura.

Nuestro grupo de trabajo, por medio de ensayos de inmuno-precipitación encontró la posible interacción entre diferentes PA como Mod(mdg4) y DREF con dXNP. Además, en el mismo estudio se encontró por medio de ensayos de doble híbrido y por GST-pull down que dXNP interacciona a través de su dominio N-terminal con una región conservada de DREF denominada CR3 localizada en el C-terminal. (Valadez-Graham *et al.*, 2012 y datos no publicados). Sin embargo, no se ha reportado si existe una interacción específica entre Mod(mdg4) y dXNP por cual resulta necesario hacer una caracterización de estas interacciones.

Se sabe que la isoforma de 67.2 kDa de Mod(mdg4) puede facilitar la formación de homodímeros y heterodímeros gracias a su extremo N-terminal que contiene al dominio BTB (Espinàs *et al.*, 1999; Stogios *et al.*, 2005). Además, se ha determinado que el dominio BTB puede unirse a una proteína conocida como GAGA factor, la cual está involucrada en la regulación global de la expresión génica (Tsai *et al.*, 2016) por lo cual, las proteínas Mod(mdg4) podría estar involucrada en la regulación transcripcional de la cromatina (Espinàs *et al.*, 1999).

Como ya se mencionó anteriormente, la isoforma de Mod(mdg4)-67.2 kDa mediante su región rica en glutamina y su dominio SID puede interactuar con Su(Hw). Además, la misma isoforma de Mod(mdg4) mediante su dominio BTB puede interactuar con CP190 en un complejo que tiene actividad de bloqueo de enhancer (Melnikova *et al.*, 2018).

Por último, hay estudios que muestran que dentro del bithorax complex de *D. melanogaster* (que son una serie de genes homeóticos localizados en el cromosoma 3R, y que son importantes en el desarrollo de la mosca) dCTCF y Mod(mdg4) co-localizan y podrían promover la expresión del gen *Abd-B* el cual se encarga del correcto desarrollo de los tres segmentos más posteriores en el abdomen de la mosca (Savitsky *et al.*, 2016).

Lo anterior es un indicador de que dCTCF y Mod(mdg4) pudiesen interactuar directamente en ciertas regiones del genoma, y que además serían necesarios para la regulación y la expresión de algunos genes en momentos concretos del desarrollo.

### **3.- Hipótesis**

De acuerdo con los antecedentes, en este trabajo se plantea que en *D. melanogaster* existe una interacción entre dAdd1, dXNP, dCTCF y Mod(mdg4) para formar un complejo que podría ayudar a mantener una adecuada estructura de la cromatina en algunas regiones del genoma, lo que a su vez desencadenaría la correcta expresión de ciertos genes importantes para el desarrollo.

### **4.- Justificación**

Por todo lo anterior, sería importante determinar la interacción genética entre dAdd1, dXNP, dCTCF y Mod(mdg4), ya que esto ayudaría a tener una visión más amplia de cómo estas proteínas pueden regular la expresión génica a la vez que mantienen la estructura de la cromatina.

### **5.- Objetivos**

#### **5.1.- Objetivo general**

- Determinar las interacciones genéticas entre las proteínas dAdd1 y dXNP con dCTCF y Mod(mdg4), así como su participación en el desarrollo de *D. melanogaster*.

#### **5.2.- Objetivos particulares**

- Establecer si hay una interacción genética entre dAdd1, dXNP, dCTCF y Mod(mdg4).
- Evaluar si se afecta la viabilidad en organismos mutantes para dAdd1, dXNP, dCTCF y Mod(mdg4)
- Determinar si mutaciones en dAdd1 y dXNP alteran la actividad de bloqueo de enhancer del insulator *Gypsy*

## 6.- Metodología

### 6.1.- Interacción genética entre *dxnp*, *dAdd1*, *dCTCF* y *Mod(mdg4)*.

Para determinar si existe una interacción genética entre los genes que codifican para las cuatro proteínas de interés, se harán cruza genéticas entre moscas que contengan distintos alelos mutantes para estos genes (Anexo 1). Esto permitirá la evaluación de la interacción genética por medio de la aparición de fenotipos en la progenie, que serían derivados de estas combinaciones de alelos.

#### 6.1.1.- Alelos mutantes

El alelo *dAdd1*<sup>2</sup> es nulo debido a que presenta una delección de casi la totalidad del gen de *dAdd1* por lo que afecta a las 3 isoformas de *dAdd1* (ver Anexo 1 para más información). El alelo *dxnp*<sup>2</sup> de la misma manera se considera nulo debido a que presenta una delección de la región promotora de *dxnp*. Adicionalmente en este trabajo se utilizó el alelo *dxnp*<sup>3</sup> el cual solo afecta a la isoforma larga de *dXNP* (ver Anexo 1 para más información). El alelo *dCTCF*<sup>30</sup> utilizado en este trabajo es hipomorfo debido a que cuenta con una parte de un elemento transponible cerca de la región promotora lo que contribuye a disminuir sus niveles de expresión (ver Anexo 1 para más información). Por último, el alelo *Mod(mdg4)*<sup>u1</sup> es hipomorfo y genera una delección del sexto exón el cual codifica para los dominios FLYWCH y SID de *Mod(mdg4)*-67.2 kDa. (ver Anexo 1 para más información).

## 6.2.- Mantenimiento de líneas mutantes de *Drosophila*

La línea con el alelo mutante *dAdd1*<sup>2</sup> fue generosamente donada por la Dra. Mitzi Kuroda. y las líneas que albergan los alelos mutantes *dxnp*<sup>2</sup>, *CTCF*<sup>30</sup> y *Mod(mdg4)*<sup>u1</sup> fueron obtenidas del Bloomington Drosophila Stock Center con los números de Stock #26643, #33480 y #59960 respectivamente. La línea wild-type (wt) y las moscas con alelos mutantes serán mantenidas con comida estándar (para 1L: 100g de levadura, 100g de melaza, 9g de agar y 10 mL de ácido propiónico) a 25°C.

## 6.3.- Cruzas genéticas

### 6.3.1.- Control wt

Para obtener el control wt se colocaron por vial 10 hembras vírgenes con 3 machos y durante un lapso de 48 horas se dejó a los adultos en viales con comida. Pasado ese tiempo, los adultos fueron retirados y se hizo un conteo de los huevos depositados por las hembras y se procedió a hacer el análisis de sobrevivencia (6.3.4).

### 6.3.2.- Controles de alelos mutantes

Para los controles de cada uno de los alelos mutantes se realizaron cruzas para obtener los siguientes genotipos;

- 1)  $dAdd1^2/+$
- 2)  $dxnp^2/+$
- 3)  $CTCF^{30}/+$
- 4)  $y^2w^1ct^6; +/+; Mod(mdg4)^{u1}/+$

La segregación de los alelos de interés fue rastreada con ayuda del balanceador *CyO* (Curly of Oster) para el cromosoma 2, y el balanceador *TM6B, Tb* para el cromosoma 3 (ver anexo 2 para más detalle). Cabe destacar que los cromosomas balanceadores portan múltiples mutaciones que podrían interactuar genéticamente con los alelos de interés. Por ello, es necesario removerlos de la progenie a evaluar en los ensayos de interacción genética. Para la obtención de los controles de cada uno de los alelos mutantes, de igual manera se colocaron en viales con comida 10 hembras vírgenes de la cepa wt y 3 machos del stock de cada alelo mutante y se realizó el mismo procedimiento descrito para el control wt.

Únicamente para el caso de la obtención de los organismos de genotipo  $y^2w^1ct^6; +/+; Mod(mdg4)^{u1}/+$ , así como cualquier otra cruce en la que se evaluó la actividad de bloqueo de enhancer con los alelos  $y^2$  y  $ct^6$ , se cruzaron 10 hembras vírgenes de genotipo  $y^2w^1ct^6/y^2w^1ct^6; +/+; Mod(mdg4)^{u1}/Mod(mdg4)^{u1}$  con los machos respectivos para obtener cada genotipo (Anexo 2). Esto se debe a que los alelos  $y^2$  y  $ct^6$  se encuentran en el cromosoma X por lo que, de esta manera, los machos de la F1 siempre serían portadores de los alelos  $y^2$  y  $ct^6$ . En el caso de las hembras no se evaluó la actividad enhancer debido a que es necesario portar los alelos mutantes en ambos cromosomas X para poder observar algún fenotipo, lo que dificulta bastante la obtención de esas hembras. Por ello, en este trabajo en lo que respecta a la evaluación de los alelos reporteros  $y^2$  y  $ct^6$  se tomaron en cuenta únicamente machos.

### 6.3.3.- Combinaciones de alelos mutantes

Para determinar la interacción genética entre los diferentes alelos, se generaron individuos con las siguientes combinaciones de genotipos;

- 1)  $dAdd1^2/+; CTCF^{30}/ dxnp^2$
- 2)  $dAdd1^2/+; CTCF^{30}/ dxnp^3$
- 3)  $y^2w^1ct^6/Y; dAdd1^2/+; Mod(mdg4)^{u1}/dxnp^2$
- 4)  $y^2w^1ct^6/Y; dAdd1^2/+; Mod(mdg4)^{u1}/dxnp^3$
- 5)  $y^2w^1ct^6/Y; dAdd1^2/+; Mod(mdg4)^{u1}/+$
- 6)  $y^2w^1ct^6/Y; Mod(mdg4)^{u1}/dxnp^2$
- 7)  $y^2/Y; dAdd1^2/+$
- 8)  $y^2/Y; +/+; dxnp^2/+$
- 9)  $y^2w^1ct^6/Y; dAdd1^2/dAdd1^2; Mod(mdg4)^{u1}/+$

(Ver anexo 2 para más detalle sobre el diseño de las cruces). Estos experimentos se llevaron a cabo bajo las condiciones descritas anteriormente para los todos los controles.

### 6.3.4.- Análisis de supervivencia

Se previó contar con un mínimo de 100 individuos para cada genotipo y se determinó por medio de una curva de supervivencia si la combinación de estos alelos mutantes disminuye la viabilidad de la progenie.

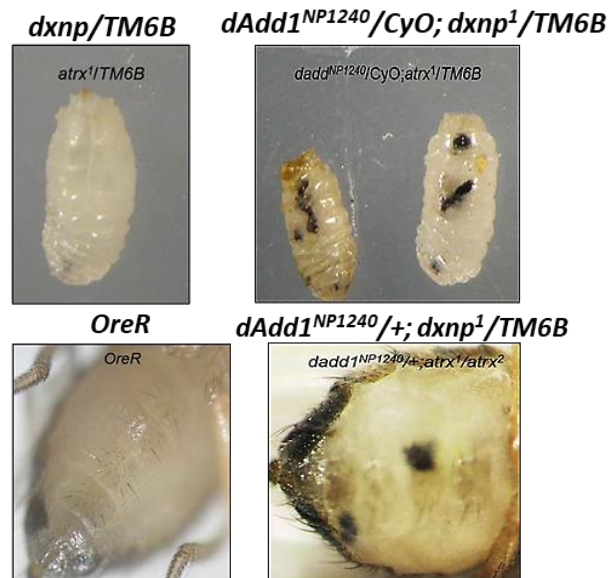
Para ello, una vez colocados machos y hembras parentales dentro de los viales, se esperó un tiempo de 48 horas. Pasado ese lapso, se retiraron los adultos y se comenzó a contar todos los huevos puestos. A las 120 horas se contabilizaron los individuos que alcanzaron el estadio de pupas y finalmente, a los 10 días los individuos que llegaron a la etapa adulta, así como su proporción de machos y hembras.

### 6.3.5.- Análisis de los fenotipos

Se analizaron los cuerpos completos de los adultos en busca de cambios fenotípicos derivados de la combinación de los diferentes alelos mutantes para determinar la existencia de interacciones entre *dAdd1*, *dxnp*, *dCTCF* y *Mod(mdg4)*.

Por un lado, se ha reportado que individuos de *D. melanogaster* que contienen combinaciones de diferentes alelos mutantes entre *dAdd1* y *dxnp* desarrollan las denominadas masas melanóticas, que son observables tanto en pupas como en adultos (Figura 20) (López-Falcón *et al.*, 2014).

Por lo tanto, las cruzas genéticas fueron diseñadas para obtener organismos que contengan los alelos de *dAdd1* y *dxnp* en combinación con *dCTCF*<sup>30</sup> o *Mod(mdg4)*<sup>41</sup>. Se analizó la aparición de las masas melanóticas y su proporción para, de esa manera, tener un indicador que mostrara que efectivamente existe una interacción genética, o en su defecto, la aparición de un nuevo fenotipo que no corresponda a lo observado en moscas wt.



**Figura 20:** Masas melanóticas generadas tanto en pupas como en adultos debido a la combinación de distintos alelos mutantes de *dAdd1* y *dxnp* (Tomado de López-Falcón *et al.*, 2014).

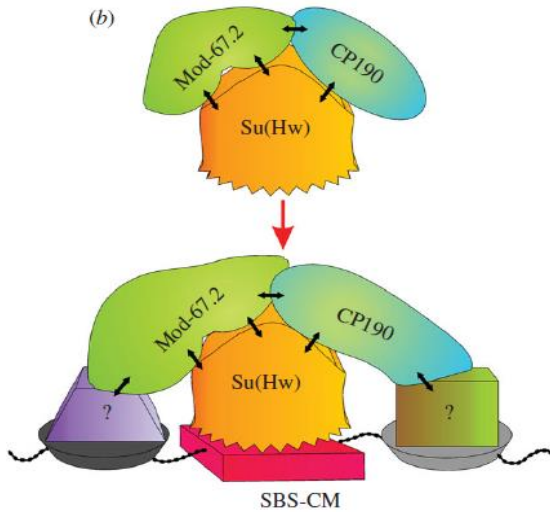


Por otro lado, recientemente se reportó que el alelo nulo  $dCTCF^0$  produce una desregulación en la expresión del gen homeótico *Abd-B* causando en machos la aparición de un segmento extra (A7) en el abdomen, además de genitales rotados y una coloración oscura en el segmento A4 que en los machos de genotipo silvestre no existe (Gambetta *et al.*, 2018) (Figura 21). Debido a lo anterior, también se determinó si moscas con los alelos mutantes de *dAdd1* y *dxnp* en combinación con el alelo  $dCTCF^{30}$  genera algún fenotipo similar y esto se evaluó a las 48 hrs post-eclosión.



**Figura 21:** Fenotipos generados en adultos debido a la eliminación de CTCF en *D. melanogaster* (Tomado de Gambetta *et al.*, 2018).

Para determinar la posible interacción genética de *dAdd1* y *dXNP* con *Mod(mdg4)*, se evaluó cambios en la actividad de bloqueo de enhancer del complejo *Su(Hw)/CP190/Mod(mdg4)* utilizando los alelos mutantes  $y^2$  y  $ct^6$  (descritos en figuras 18 y 19). Para ello, haciendo uso del alelo hipomorfo  $Mod(mdg4)^{u1}$  (el cual debilita la actividad de bloqueo de enhancer) en combinación con los alelos mutantes de *dAdd1* y *dxnp* se observó si se desencadenaba un cambio fenotípico en el borde del ala y en la coloración de la cutícula, lo cual comprobaría que existe una interacción genética. Cabe destacar que se ha propuesto que en la regulación del complejo de *Su(Hw)/CP190/Mod(mdg4)* podrían estar participando proteínas que pueden unirse al DNA o que puedan reconocer modificaciones postraduccionales en las histonas (Figura 22).

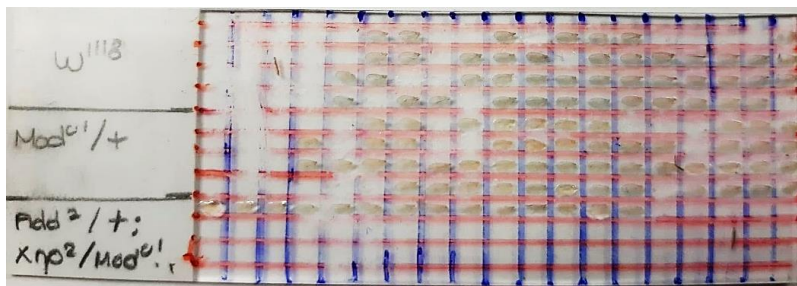


**Figura 22:** a) Posible modulación de la actividad de bloqueo de enhancer del complejo Su(Hw)/CP190/Mod(mdg4) mediante la unión de otras proteínas aún desconocidas “SBS-CM” representa al insulador formado a partir de Su(Hw)/CP190/Mod(Mdg4) (Tomado de Melnikova *et al.*, 2017).

### 6.3.6.- Análisis morfométrico de alas

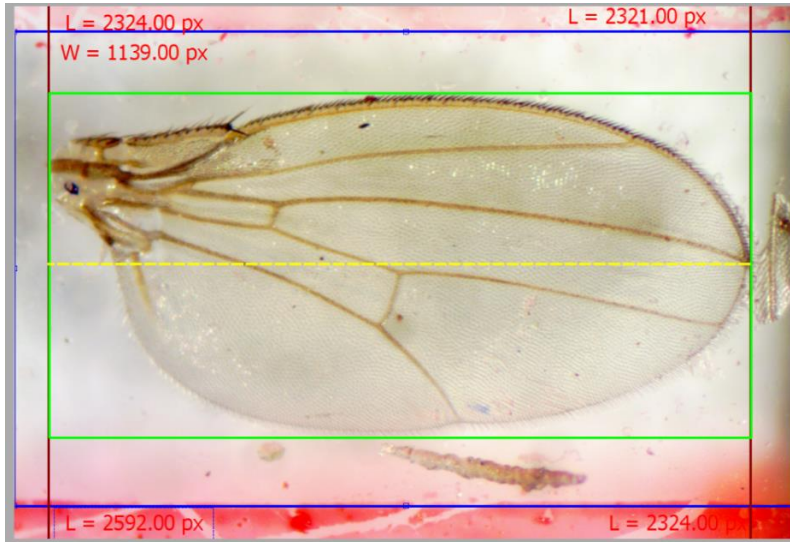
Para determinar si existieron cambios significativos en la morfología del ala en *D. melanogaster* se recurrió a un análisis morfométrico, el cual tiene como característica el uso de dos diferentes fuentes de información. El primero, es la homología biológica, que es la correspondencia de determinadas estructuras entre individuos. Y el segundo, es la localización geométrica, que se refiere al acomodo espacial ya sea en 2D o 3D de las estructuras de los individuos (Klingenberg y Monteiro, 2005; López-Galán, 2015).

Para ello, se disectaron las alas de las moscas de los diferentes organismos mutantes generados, las cuales fueron montadas en portaobjetos que estaban previamente cuadrículados con una medida de 3mm x 2mm por cuadrante. Posteriormente, las alas fueron cuidadosamente colocadas dentro de las cuadrículas y se aseguró que todas quedaran en la misma orientación y a la misma altura (Figura 23).



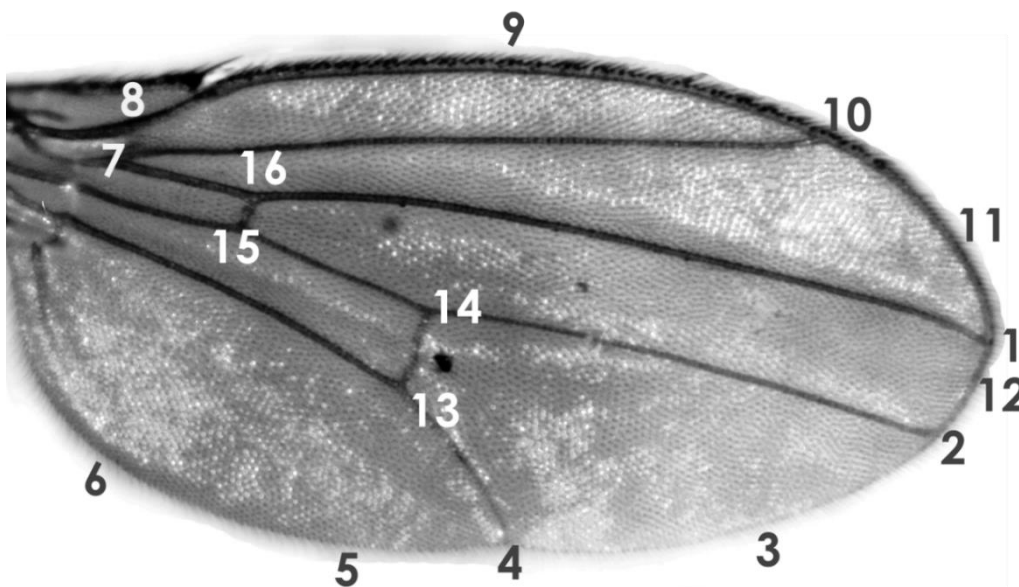
**Figura 23:** Portaobjetos cuadrículado con las alas montadas para su posterior toma de fotografías.

Posteriormente, para la toma de fotografías se utilizó una cámara digital modelo UCMOS05100KPA de 5.1 MP acoplada a un microscopio estereoscópico Carl Zeiss y con la ayuda del software TouPLite v.2.014 se colocaron 3 cuadrantes en la imagen generada por la cámara, que sirvieron como marco de referencia para centrar las alas antes de tomar las fotos (Figura 24). Las fotografías fueron tomadas a 4.5x.



**Figura 24:** Ejes de referencia (líneas azul, roja y verde) y simetría (línea punteada amarilla) utilizados para el alineamiento de las alas y la toma de fotografías mediante el software ToupLite v.2.014.

Posteriormente, las fotografías fueron procesadas con el software de descarga libre TpsDig V2.32 el cual sirvió para el establecimiento digital de 16 “*landmarks*”, los cuales pueden ser definidos como puntos anatómica o geoméricamente homólogos entre estructuras, los cuales contienen información de la forma, tamaño, posición y orientación de los objetos (Bookstein, 1991; Bookstein, 1997). En la disposición de los “*landmarks*” se tomó en cuenta todo el perímetro de las alas, los puntos donde iniciaban y terminaban las venaciones, así como las intersecciones entre ellas para establecer diferentes distancias morfológicas (Figura 25 y Tabla 1).



**Figura 25:** Establecimiento de los “*landmarks*”. Los “*landmarks*” marcados en negro sirven para representar todo el perímetro del ala, mientras que los blancos representan las venaciones intermedias, así como las intersecciones entre ellas.

Número de landmarks	Distancia morfológica	Acrónimo
1-7	Longitud de vena 1	LA
4-9	Ancho del ala	AA
7-10	Longitud de vena 2	LV2
13-14	Longitud de cross-vena posterior	LCP
14-15	Distancia entre cross-venas anterior y posterior	DCAP
15-16	Longitud de cross-vena anterior	LCA

**Tabla 1:** Disposición de “landmarks” que definen distancias morfológicas del ala. En la tabla se muestra pares de “landmarks” que definen las distancias morfológicas a evaluar en las alas. Adicionalmente, los landmarks 3, 5, 6, 11 y 12 toman en cuenta las secciones entre venaciones para de esta forma cubrir mejor el contorno de las alas.

Posteriormente, los archivos fueron procesados con el software de descarga libre MorphoJ V1.07a (Klingenberg, 2011), el cual toma los archivos creados con el software TpsDig y transforma los landmarks en coordenadas en 2D o 3D, cabe destacar que para este trabajo se utilizaron coordenadas en 2D.

Debido a que las coordenadas generadas a partir de los landmarks no son adecuadas para los análisis estadísticos, se requiere remover toda la información adicional. Por ello, se recurre a un análisis generalizado de procrustes, el cual es un análisis estadístico multivariado que utiliza cuadrados mínimos y busca minimizar la suma de las diferencias al cuadrado entre todos los pares de los landmarks (Torcida y Pérez, 2012), además de minimizar el efecto de la posición, tamaño y rotaciones que pudieran distorsionar el análisis de datos (Klingenberg, 2010, López-Galán, 2015). De esta forma se obtienen las raíces cuadradas de la suma de las diferencias al cuadrado entre todos los pares de landmarks (denominado como distancia procrustes) y se realizan superposiciones entre cada una de las formas obtenidas para poder realizar las comparaciones (Klingenberg, 2013).

Posteriormente, se sometió a un análisis de componentes principales (PCA) el cual explora las principales variaciones morfológicas de las muestras, así como reducir la dimensionalidad de los datos. Así, se obtienen plots de dispersión de datos donde cada punto representa a un individuo según se acerca o aleje de la forma consenso (centro de la elipse); esto a su vez permite visualizar la relación entre las variables analizadas y determinar si existen diferencias entre los grupos de datos (Pérez, 2003).

Por último, se realizó un análisis discriminante con los datos obtenidos para validar el análisis de PCA (Pérez SI, 2003, González-Marín *et al.*, 2016), en este análisis se examina la separación de dos grupos de observaciones, donde se compararon las distancias de procrustes y mahalabis para determinar si existía una diferencia estadística significativa. Además, se generaron los plots que contenían los landmarks con valores normalizados y se hizo la reconstrucción con la forma del ala para visualizar cualitativamente las diferencias observadas.

### **6.3.7.- Análisis de coloración de cutículas**

Para el análisis de la coloración de las cutículas, se utilizó una técnica modificada de Melnikova *et al.*, 2019 donde de acuerdo con la coloración en el segmento A5 de abdómenes de los diferentes individuos mutantes se le asignará un valor de 1 en el caso de los organismos que presenten mayor pigmentación y tengan un color café oscuro/negro (es decir una coloración wt) y se asignará un valor de 5 a una tonalidad de café muy claro.

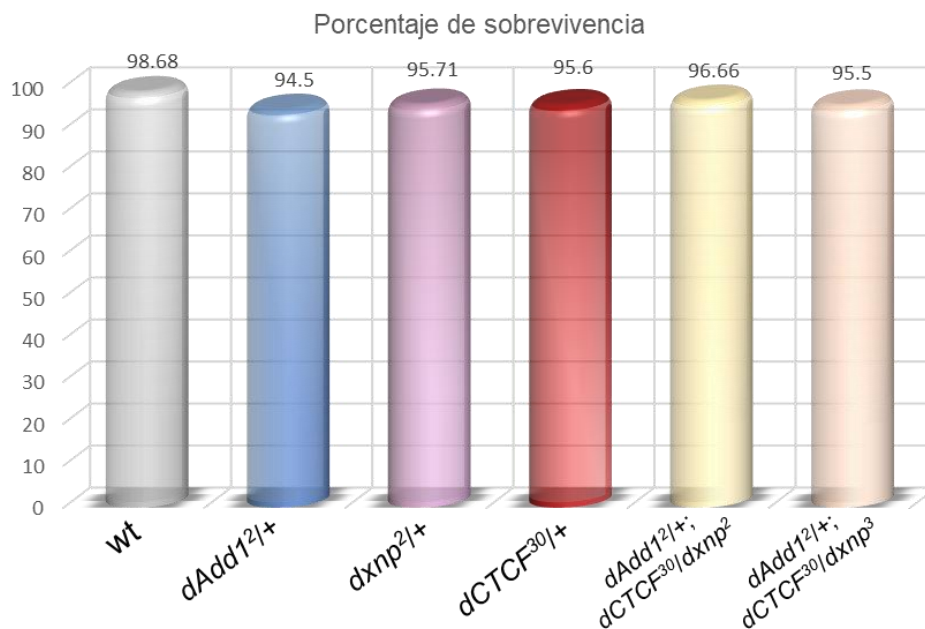
A diferencia de lo reportado por Melnikova *et al.*, 2019, en este trabajo esos valores numéricos no fueron asignados de acuerdo con una simple inspección visual, sino que se decidió la asignación de valores con la ayuda de una escala Pantone café, la cual fue dividida en 5 segmentos para delimitar dichos valores.

## 7.- Resultados y discusión

### 7.1.- Interacción genética entre *dAdd1*, *dxnp* y *dCTCF*

En la Figura 26 se muestra el porcentaje de sobrevivencia hasta la etapa adulta de los organismos controles y triple-mutantes. Los resultados indican que mutaciones en un solo alelo para *dAdd1*, *dXNP* y *dCTCF* no produce ningún efecto sobre la viabilidad de los individuos, lo que concuerda con lo reportado por López-Falcón *et al.*, 2014 para el alelo *dxnp<sup>2</sup>* en el cual en forma heterocigota no disminuyó la viabilidad de los organismos. Interesantemente, los individuos que fueron triples mutantes tampoco mostraron un cambio significativo respecto al porcentaje de sobrevivencia comparados con los controles (Figura 26)

También, esto concuerda con datos que indican que en *Drosophila*, *dCTCF* no es necesario para la sobrevivencia, ya que los individuos *dCTCF<sup>0</sup>* (los cuales eran nulos para *dCTCF*) son capaces de llegar a la etapa adulta (Gambetta *et al.*, 2018). Esto contrasta con mamíferos en donde se ha visto que CTCF si es esencial para supervivencia, lo cual podría tener que ver con el papel esencial de CTCF para la formación de loops de la cromatina en mamíferos, lo que tiene efectos importantes a nivel global de regulación génica (Gómez-Díaz y Corces, 2014).



**Figura 26:** Porcentaje de organismos que alcanzaron la etapa adulta tanto en mutantes individuales como en triple mutantes para *dAdd1*, *dxnp* y *dCTCF*, así como en mutantes individuales. El número de individuos analizados fueron obtenidos en 3 experimentos independientes y se muestra en la tabla 2.

En la tabla 2 se muestra los fenotipos a evaluar, así como el porcentaje de estos en los individuos evaluados. Sin embargo, no se detectó la aparición de ninguno de estos fenotipos en los individuos evaluados, salvo un solo macho de genotipo *dAdd1<sup>2</sup>/+; dCTCF<sup>30</sup>/dxnp<sup>2</sup>* el cual presentó el genital rotado.

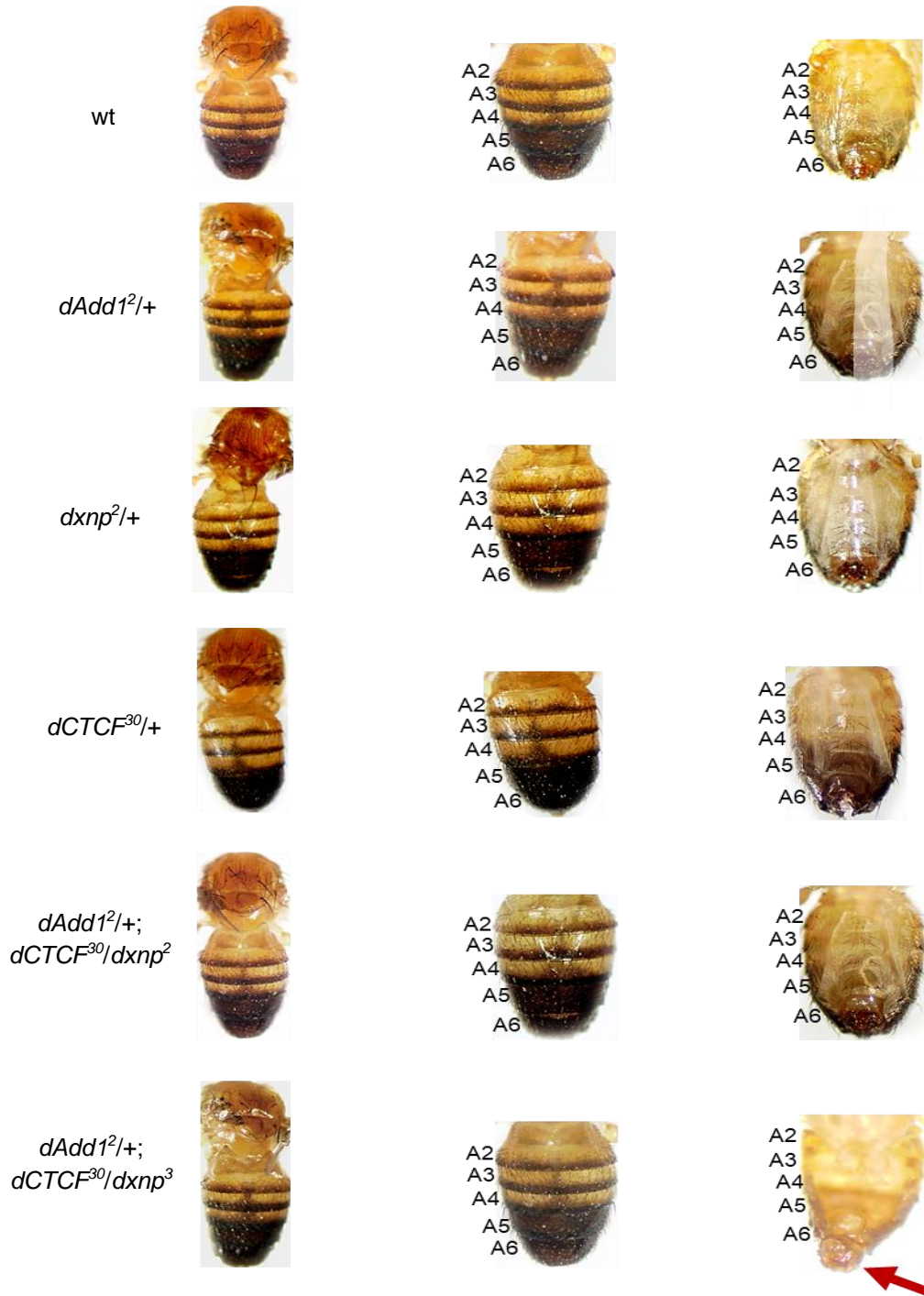
Los alelos *dAdd1<sup>2</sup>* y *dxnp<sup>2</sup>* por sí solos o en combinación con el alelo *dCTCF<sup>30</sup>* no generaron masas melanóticas ni en machos (Figura 27) ni en hembras (Figura 28). A pesar de que se había reportado que combinaciones alélicas entre *dAdd1* y *dxnp* podrían producirlas en una proporción de entre el 3% al 7% de la progenie, este no fue el caso. Sin embargo, cabe destacar que en el reporte donde se encontró la aparición de masas melanóticas no se usó el alelo *dAdd1<sup>2</sup>* que es nulo, sino que se utilizó el alelo *dAdd1<sup>NP1240</sup>* el cual es hipomorfo y tiene una inserción de un elemento transponible en el 5'UTR lo que ocasiona una disminución de los niveles de mRNA (López-Falcón, 2014).

Tomando en cuenta los datos no publicados del laboratorio, donde se ha observado que dCTCF depende en parte de las proteínas dAdd1 para su localización a lo largo del genoma de *Drosophila*, era de esperarse que utilizando el alelo nulo *dAdd1<sup>2</sup>* disminuyera la localización de dCTCF a lo largo del genoma. Mediante CRISPR/Cas9 se ha logrado generar la línea de moscas nulas *dCTCF<sup>0</sup>*, las cuales muestran la aparición de un segmento extra en el abdomen debido a una ganancia de función del gen *Abd-B*, sin embargo, también se ha observado que únicamente una disminución en los niveles de dCTCF también puede producir transformaciones homeóticas (Gambetta *et al.*, 2018).

Por ello, se esperaba que disminuyendo los niveles de dCTCF se pudieran obtener fenotipos similares a los observados en moscas *dCTCF<sup>0</sup>* (Gambetta *et al.*, 2018). Sin embargo, esto no ocurrió ya que sólo un organismo de casi 100 presentó el genital rotado (señalado en la Figura 26 con una flecha roja). Esto indica que el alelo *dCTCF<sup>30</sup>* no es capaz de generar ningún fenotipo anormal en forma heterocigota, mientras que en homocigosis resultó ser letal. Lo cual indica que el alelo *dCTCF<sup>30</sup>* contiene alguna deficiencia extra-alélica que pudiera generar esos eventos, por esa razón se decidió no continuar los experimentos utilizando el alelo *dCTCF<sup>30</sup>*.

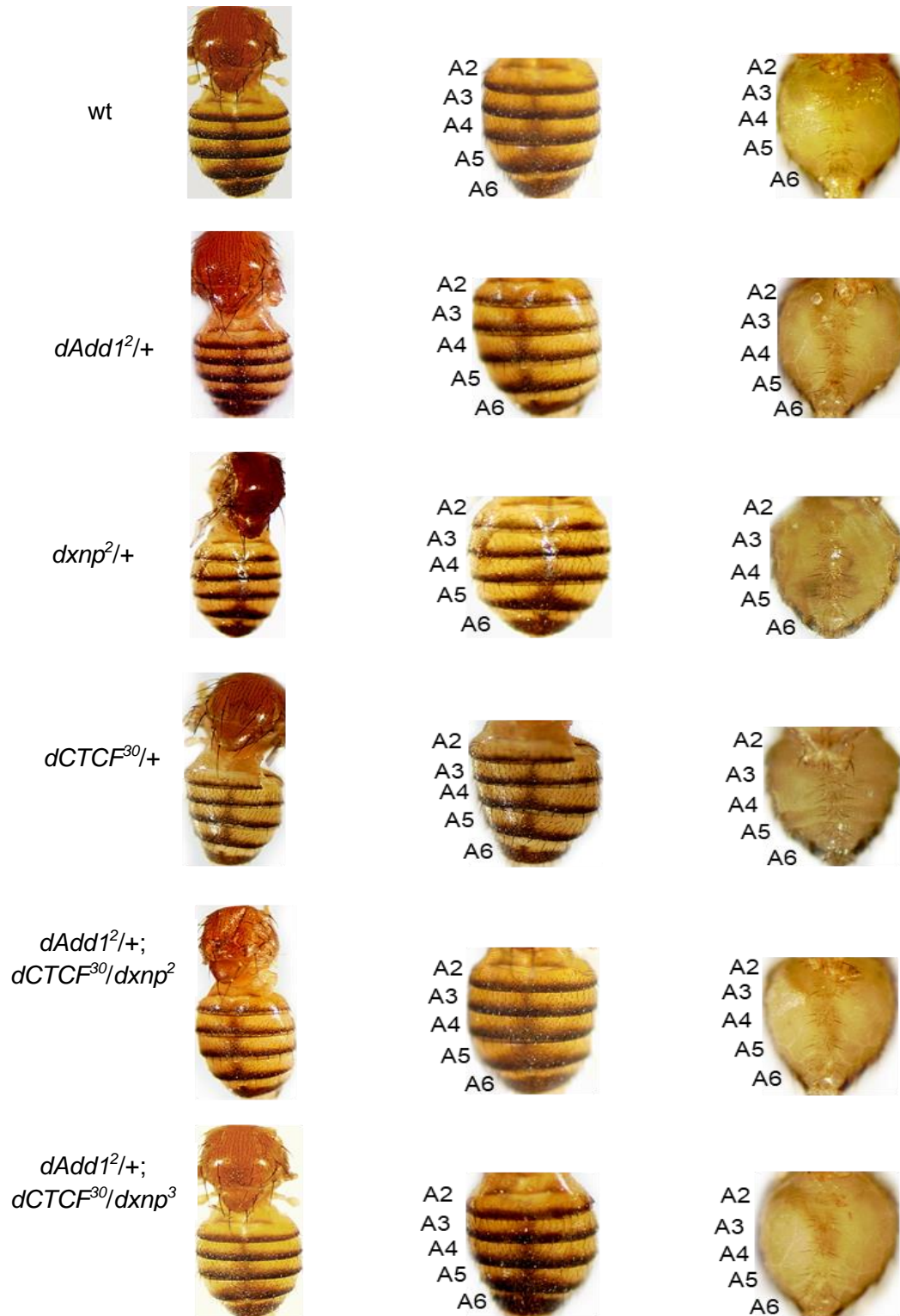
Genotipo	Masas melanóticas (%)	Genital rotado (%)	Segmentos abdominales extras (%)
wt	0/319 <b>(0%)</b>	0/319 <b>(0%)</b>	0/319 <b>(0%)</b>
<i>dAdd1<sup>2</sup>/+</i>	0/285 <b>(0%)</b>	0/285 <b>(0%)</b>	0/285 <b>(0%)</b>
<i>dxnp<sup>2</sup>/+</i>	0/141 <b>(0%)</b>	0/141 <b>(0%)</b>	0/141 <b>(0%)</b>
<i>dCTCF<sup>30</sup>/+</i>	0/139 <b>(0%)</b>	0/139 <b>(0%)</b>	0/139 <b>(0%)</b>
<i>dAdd1<sup>2</sup>/+; dCTCF<sup>30</sup>/dxnp<sup>2</sup></i>	0/87 <b>(0%)</b>	1/87 <b>(1.14%)</b>	0/87 <b>(0%)</b>
<i>dAdd1<sup>2</sup>/+; dCTCF<sup>30</sup>/dxnp<sup>3</sup></i>	0/85 <b>(0%)</b>	0/85 <b>(0%)</b>	0/85 <b>(0%)</b>

**Tabla 2:** Interacción genética entre dAdd1, dxnp y dCTCF. En la tabla se presenta la relación entre número total de individuos contra el número de individuos que tuvieron masas melanóticas, genitales rotados, segmentos abdominales extra y/o defectos en el ala, así como su **(porcentaje)** tanto en los controles como en los organismos que tienen combinaciones de los alelos mutantes.



**Figura 27:** Fenotipos generados en machos adultos por la presencia de los diferentes alelos mutantes. Se observa que los individuos que poseen un solo alelo de forma heterocigota son prácticamente idénticos a los wt. En los organismos triple mutantes únicamente se observó que un solo macho tuvo los genitales rotados (flecha roja).





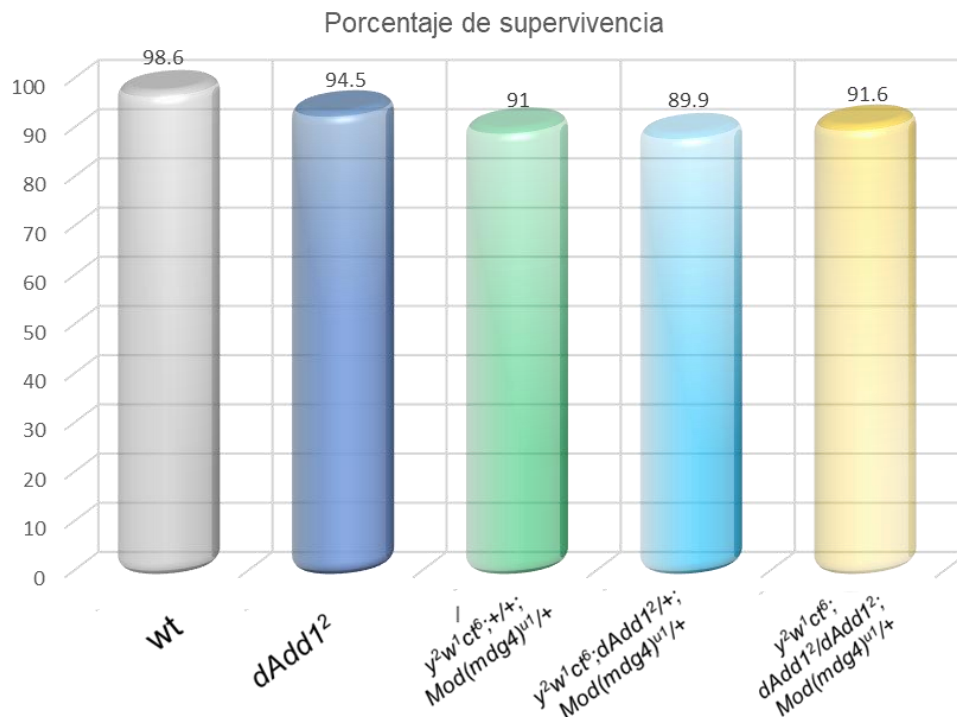
**Figura 28:** Fenotipos generados en hembras adultas por la presencia de los diferentes alelos mutantes. Se observa que, en prácticamente todas las combinaciones de alelos las hembras mutantes son indistinguibles a las wt.

## 7.2.- Interacción genética entre *dAdd1* y *Mod(mdg4)*

Para determinar si existía una interacción genética entre *dAdd1* y *Mod(mdg4)* se generó la línea doble mutante  $y^2w^1cf^6/Y; dAdd1^2/+; Mod(mdg4)^{u1}/+$  así como la línea homocigota nula para *dAdd1*:  $y^2w^1cf^6/Y; dAdd1^2/dAdd1^2; Mod(mdg4)^{u1}$  para observar si se desarrollaban cambios en la coloración de la cutícula, así como en la forma de las alas.

En primer lugar, en la figura 29 se muestra una gráfica que indica el porcentaje de organismos que contenían alelos mutantes para *Mod(mdg4)* y *dAdd1* en un fondo  $y^2w^1cf^6$ . En ella se puede apreciar que en todas las combinaciones de genotipos (incluyendo los controles) alrededor del 90% de los organismos alcanzaron la etapa adulta, lo cual está indicando que combinaciones de alelos mutantes para *dAdd1* y *Mod(mdg4)* no afectan de ninguna manera el porcentaje de supervivencia hasta la etapa adulta de los organismos.

Por otro lado, en la tabla 3 se muestran los porcentajes obtenidos de masas melanóticas, genitales rotados, segmentos abdominales extras, defectos en el ala y cutículas de color amarillo. Donde en el caso de los organismos de genotipo  $y^2w^1cf^6/Y; dAdd1^2/+; Mod(mdg4)^{u1}/+$  así como  $y^2w^1cf^6/Y; dAdd1^2/dAdd1^2; Mod(mdg4)^{u1}$  se aprecia que el 100% de ellos se desarrolla una cutícula de color amarillo y un ala de fenotipo cortado lo cual es consistente con los fenotipos de organismos de genotipo  $y^2$  y  $cf^6$ . Lo anterior, es un indicador de que las proteínas *dAdd1* estarían actuando como reguladores negativos de la actividad de bloqueo de enhancer mediada por el insulador *Gypsy*.



**Figura 29:** Porcentaje de organismos que alcanzaron la etapa adulta tanto en los controles individuales para *dAdd1* y *Mod(mdg4)* así como en organismos que presentan combinaciones de alelos mutantes para *dAdd1* y *Mod(mdg4)* (doble-mutantes). El número de individuos analizados fueron obtenidos en 3 experimentos independientes y se muestra en la tabla 3.

Genotipo	Masas melanóticas (%)	Genital rotado (%)	Segmentos abdominales extras (%)	Defectos en el ala (%)	Cutícula yellow (%)
wt	0/319 (0%)	0/319 (0%)	0/319 (0%)	0/319 (0%)	0/319 (0%)
<i>dAdd1<sup>2</sup>/+</i>	0/285 (0%)	0/285 (0%)	0/285 (0%)	0/285 (0%)	0/285 (0%)
<i>y<sup>2</sup>w<sup>1</sup>ct<sup>6</sup>; Mod(mdg4)<sup>u1</sup>/+</i>	0/71 (0%)	0/71 (0%)	0/71 (0%)	71/71 (100%)	71/71 (100%)
<i>y<sup>2</sup>w<sup>1</sup>ct<sup>6</sup>; dAdd1<sup>2</sup>/+ Mod(mdg4)<sup>u1</sup>/+</i>	0/35 (0%)	0/35 (0%)	0/35 (0%)	35/35 (100%)	35/35 (100%)
<i>y<sup>2</sup>w<sup>1</sup>ct<sup>6</sup>; dAdd1<sup>2</sup>/dAdd1<sup>2</sup>; Mod(mdg4)<sup>u1</sup>/+</i>	0/34 (0%)	0/34 (0%)	0/34 (0%)	34/34 (100%)	34/34 (100%)

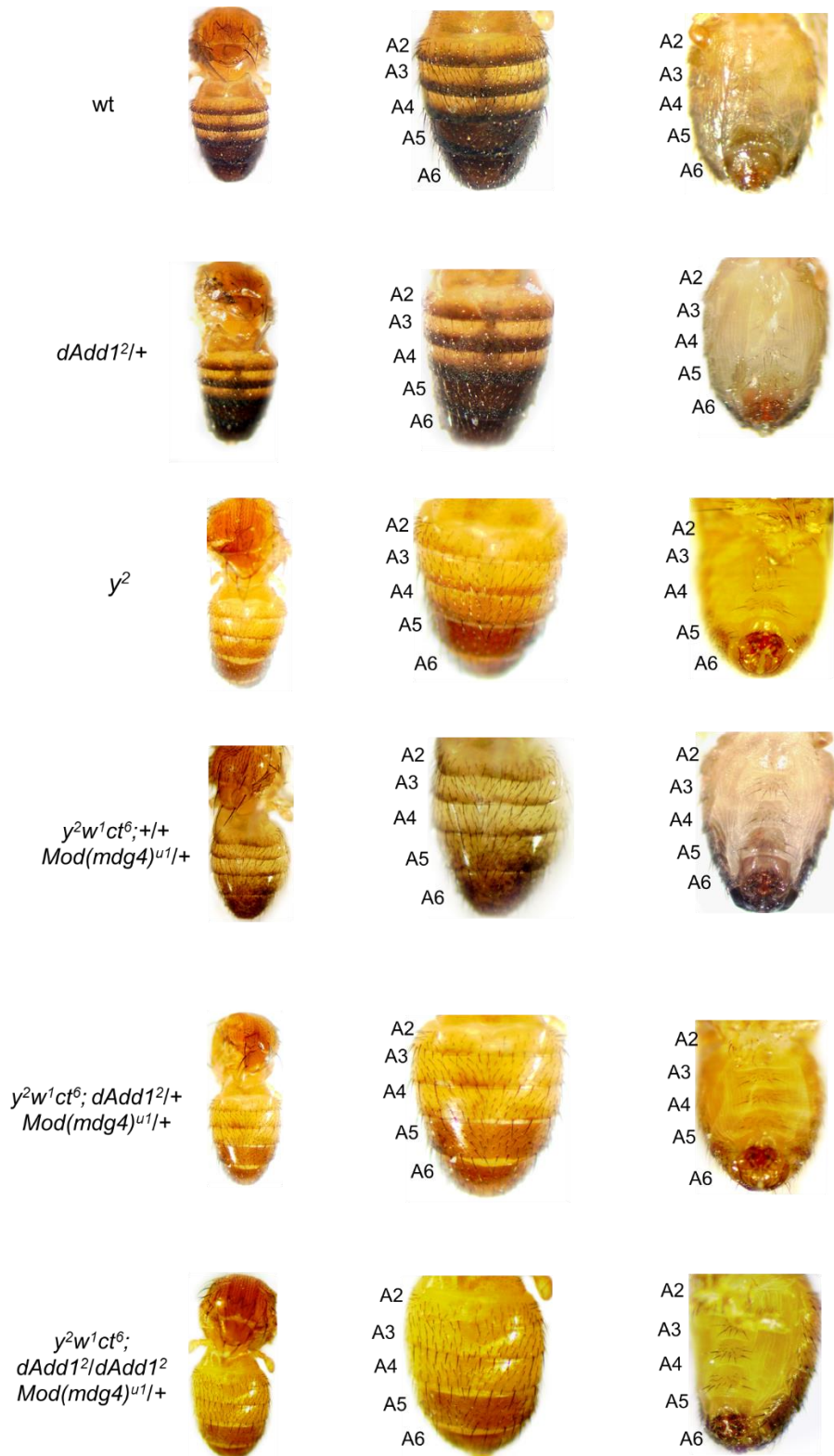
**Tabla 3:** Interacción genética entre *dAdd1* y *Mod(Mdg4)* en organismos doble-mutantes. En la tabla se presenta el (**porcentaje**) de individuos que tuvieron masas melanóticas, genitales rotados, segmentos abdominales extra, defectos en el ala y cutícula yellow, tanto en los controles como en los organismos que tienen combinaciones de alelos mutantes.

En la figura 30 se observa que los individuos del control *y<sup>2</sup>w<sup>1</sup>ct<sup>6</sup>/Y; +/+; Mod(mdg4)<sup>u1</sup>/+* presentan la cutícula del abdomen de color ligeramente amarillo a comparación de los organismos de genotipo *y<sup>2</sup>*. Además, la coloración en los segmentos A5 y A6 pasa de ser de un color negruzco a café (variegado), lo que indica una disminución en la deposición de melaninas en esos segmentos. Esto es porque al mutar una proteína que forma parte del insulador, se genera una disminución de la actividad de bloqueo de enhancer, aunque esta mutación no abate completamente dicha actividad, y esto concuerda con previos reportes donde se observa el mismo fenotipo (Melnikova *et al.*, 2017).

También se puede apreciar que los organismos de genotipo *y<sup>2</sup>w<sup>1</sup>ct<sup>6</sup>/Y; dAdd1<sup>2</sup>/+; Mod(mdg4)<sup>u1</sup>/+* presentaron una coloración amarilla en las cutículas, además de tener los segmentos A5 y A6 de un color café, lo cual indica que existe una disminución en la expresión del gen reportero *y*. Lo anterior indica que al mutar únicamente un solo alelo de *dAdd1* en combinación con el alelo *Mod(mdg4)<sup>u1</sup>* en un fondo *y<sup>2</sup>* es suficiente para restablecer la actividad de bloqueo de enhancer generando un fenotipo *y<sup>2</sup>* (Figura 30).

Por otro lado, los organismos de la línea homocigota nula *y<sup>2</sup>w<sup>1</sup>ct<sup>6</sup>/Y; dAdd1<sup>2</sup>/dAdd1<sup>2</sup>; Mod(mdg4)<sup>u1</sup>/+* también mostraron una cutícula de color amarillo, así como los segmentos A5/A6 de una coloración café claro. Sin embargo, respecto a la tonalidad del color se puede observar que realmente no existen diferencias en comparación con la pigmentación que generan los individuos de la línea *y<sup>2</sup>w<sup>1</sup>ct<sup>6</sup>/Y; dAdd1<sup>2</sup>/+; Mod(mdg4)<sup>u1</sup>/+*.

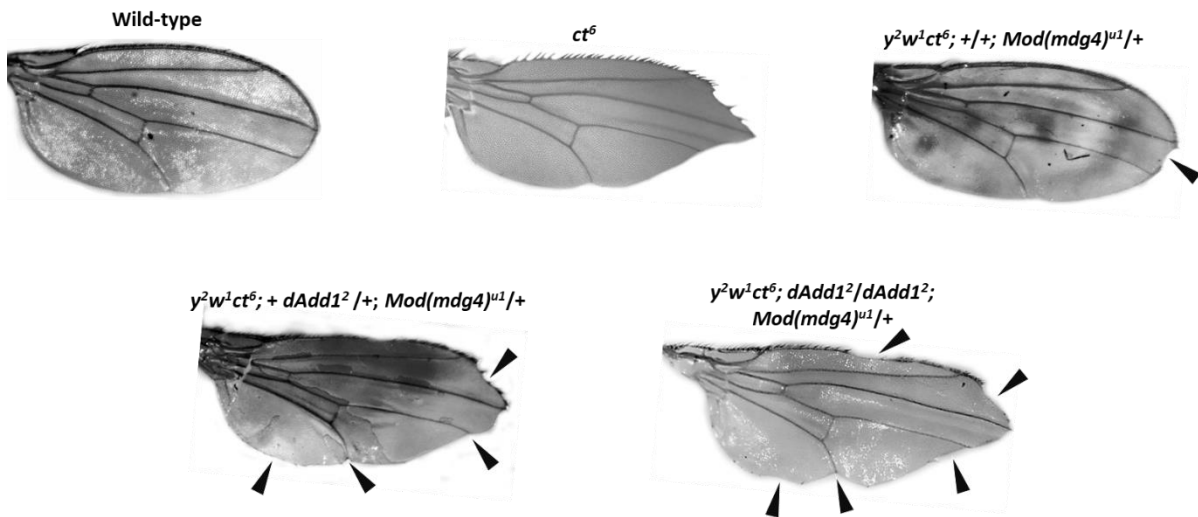
Todo lo anterior indica que el caso de los individuos que son homocigotos nulos para *dAdd1* no existe un aumento en la penetrancia del fenotipo. Debido a lo anterior, se puede concluir que únicamente basta con mutar un solo alelo de *dAdd1* para poder observar un restablecimiento en la actividad de bloqueo de enhancer mediada por el retrotransposón *Gypsy*.



**Figura 30:** Fenotipos obtenidos en machos adultos doble-mutantes. Se observa que en individuos heterocigotos u homocigotos nulos para *dAdd1* en combinación con el alelo *Mod(mdg4)<sup>u1</sup>* desencadenan una coloración amarilla en la cutícula igual a la observada en los organismos *y<sup>2</sup>* lo que indica que hay una restauración en la actividad de bloqueo de enhancer.

Respecto al gen reportero *ct*, en la figura 31 se puede apreciar que las alas de los organismos de genotipo doble-mutante  $y^2w^1ct^6/Y; dAdd1^2/+; Mod(mdg4)^{u1}/+$  se puede apreciar que la forma de ala de tipo aserrado que se asemeja al fenotipo de las alas de organismo  $ct^6$ , por lo que, de nueva cuenta, se está reestableciendo una actividad de bloqueo de enhancer.

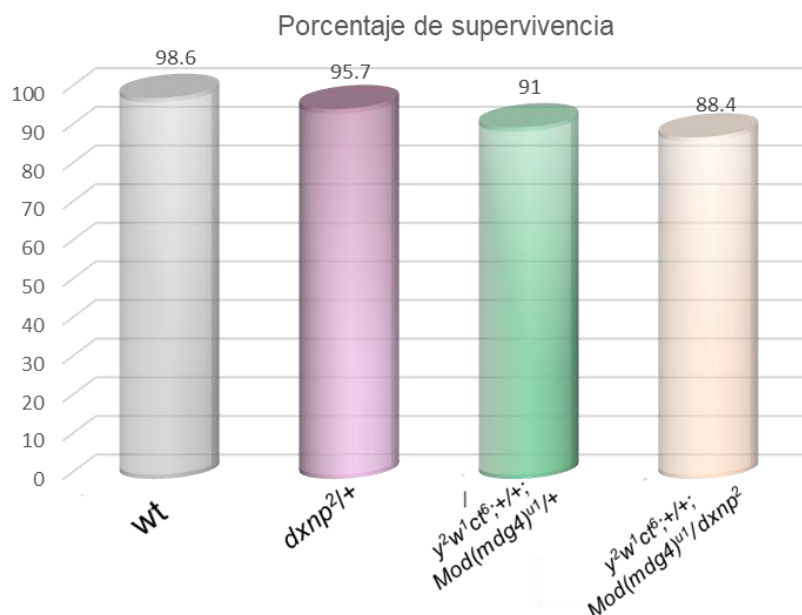
Además, en los organismos de la línea homocigota nula para *dAdd1*  $y^2w^1ct^6/Y; dAdd1^2/dAdd1^2; Mod(mdg4)^{u1}/+$  se puede observar que la forma de las alas también adquieren un fenotipo aserrado y al compararlas con las alas de los organismos heterocigotos para *dAdd1* no se aprecian grandes diferencias, esto indica de nueva cuenta que no existe un aumento de la penetrancia, indicando de nueva cuenta que únicamente basta con mutar un solo alelo de *dAdd1* para observar un fenotipo aserrado en el ala.



**Figura 31:** Fenotipos observados en alas de organismos heterocigotos para *dAdd1* y homocigotos nulos para *dAdd1* en combinación con  $Mod(mdg4)^{u1}$  en un fondo  $ct^6$ . Nótese que el alelo  $Mod(Mdg4)^{u1}$  en un fondo  $ct^6$  genera una pérdida casi total de la actividad de bloqueo de enhancer ya que las alas presentan un fenotipo casi wt, aunque la restauración no es total ya que aún se generan muescas en el ala (flecha negra). En el caso de los organismos doble mutantes para *dAdd1* y *Mod(mdg4)* en un fondo  $ct^6$  se puede apreciar claramente que el fenotipo generado es nuevamente aserrado en el cual aparecen muescas en todo el perímetro del ala (flechas negras) lo que indica que al mutar *dAdd1* en hetero u homocigosis reestablece una actividad de bloqueo de enhancer.

### 7.3.- Interacción genética entre *dxnp* y *Mod(mdg4)*

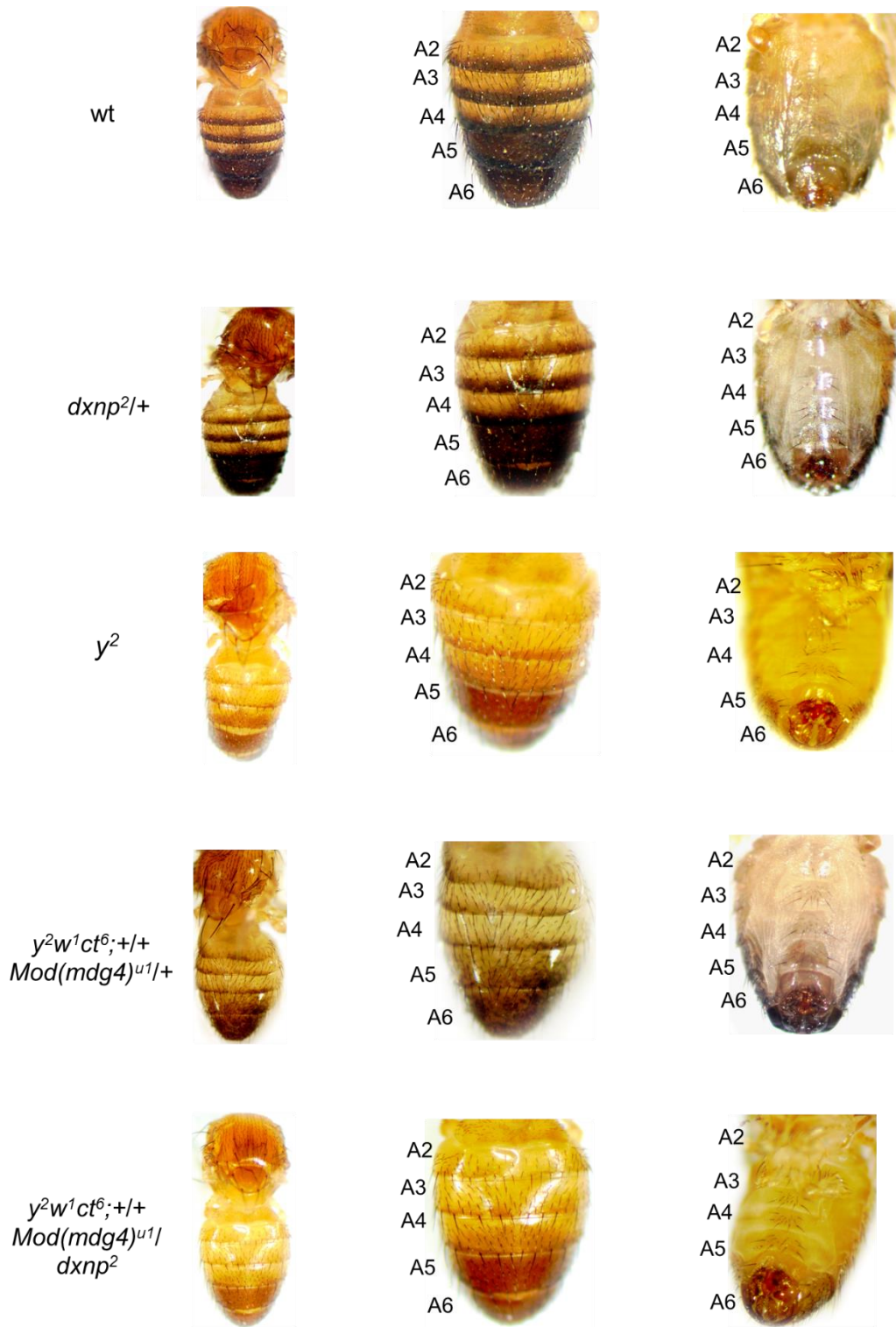
Para determinar si existía una interacción genética entre dXNP y *Mod(mdg4)* se generó la línea doble mutante  $y^2w^1ct^6/Y; +/+; Mod(mdg4)^{u1}/dxnp^2$ . En la figura 32 puede apreciarse que en todas las combinaciones de genotipos (incluyendo los controles) arriba del 85% de todos los organismos alcanzaron la etapa adulta, lo cual está indicando que combinaciones de alelos mutantes para dXNP y *Mod(mdg4)* no afectan en gran medida la supervivencia de los organismos. Hay que destacar que los organismos de genotipo  $y^2w^1ct^6; +/+; Mod(mdg4)^{u1}/dxnp^2$  mostraron una ligera disminución a comparación de los controles para *dxnp^2* y *Mod(mdg4)^{u1}*.



**Figura 32:** Porcentaje de organismos que alcanzaron la etapa adulta tanto en los controles individuales para dXNP y *Mod(mdg4)* así como en organismos doble-mutantes. El número de individuos analizados fueron obtenidos en 3 experimentos independientes y se muestra en la tabla 4.

Genotipo	Masas melanóticas (%)	Genital rotado (%)	Segmentos abdominales extras (%)	Defectos en el ala (%)	Cutícula yellow (%)
<i>dAdd1<sup>2</sup>/+</i>	0/285 (0%)	0/285 (0%)	0/285 (0%)	0/285 (0%)	0/285 (0%)
<i>dxnp<sup>2</sup>/+</i>	0/141 (0%)	0/141 (0%)	0/141 (0%)	0/141 (0%)	0/141 (0%)
$y^2w^1ct^6; Mod(mdg4)^{u1}/+$	0/71 (0%)	0/71 (0%)	0/71 (0%)	71/71 (100%)	71/71 (100%)
$y^2w^1ct^6; +/+; Mod(mdg4)^{u1}/dxnp^2$	0/37 (0%)	0/37 (0%)	0/37 (0%)	37/37 (100%)	37/37 (100%)

**Tabla 4:** Interacción genética entre dXNP y *Mod(Mdg4)*. En la tabla se presenta el (porcentaje) de individuos que tuvieron masas melanóticas, genitales rotados, segmentos abdominales extra, defectos en el ala y cutícula yellow, tanto en los controles como en los organismos doble-mutantes.

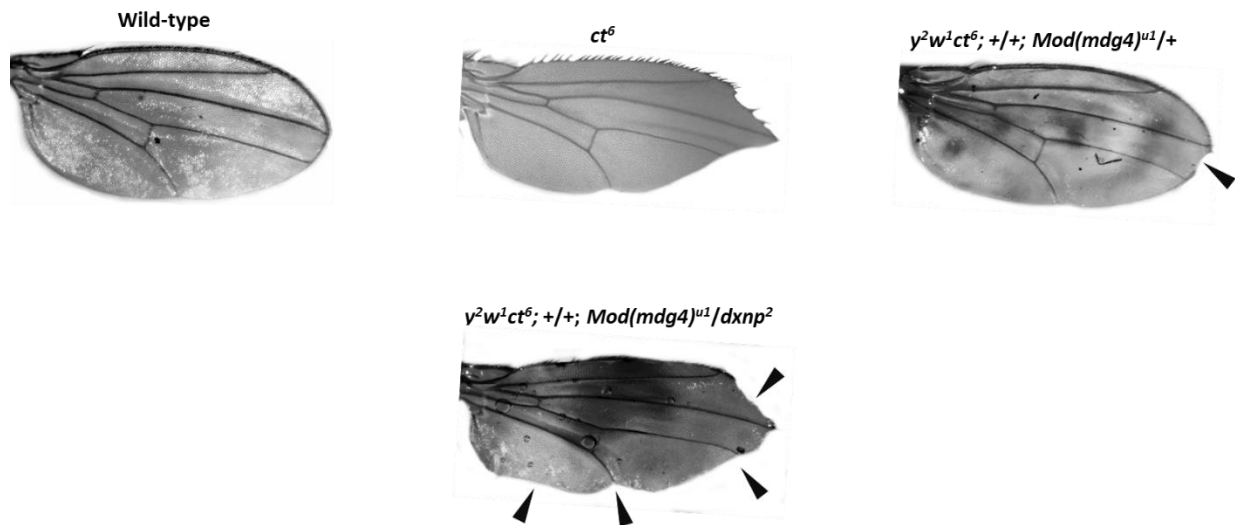


**Figura 33:** Fenotipos obtenidos en machos adultos doble-mutantes para dXNP y Mod(mdg4). En la figura se observa que en individuos heterocigotos para dXNP en combinación con el alelo *Mod(mdg4)<sup>u1</sup>* desencadenan una coloración amarilla en la cutícula igual a la observada en los organismos *y<sup>2</sup>* lo que indica que en este caso de nueva cuenta hay una restauración en la actividad de bloqueo de enhancer.

En la tabla 4 se muestra que los organismos doble-mutantes para *dxnp* y *Mod(mdg4)* en un fondo  $y^2ct^6$  también desarrollaron en un 100% una coloración amarilla en la cutícula (Figura 33) así como defectos en el borde del ala (Figura 34). Sin embargo, estos defectos resultan ser más severos que en el control  $y^2w^1ct^6; +/+; Mod(mdg4)/+$ . Lo anterior es un claro indicador que en las doble-mutantes existe una ganancia en la actividad de bloqueo de enhancer, lo que conlleva a una disminución en la expresión de ambos genes reporteros.

Todo lo anterior indica que también las proteínas dXNP actúan como reguladores negativos de la actividad de bloqueo de enhancer mediado por el retrotransposón *Gypsy*. Además, la coloración de las dobles mutantes para dXNP y *Mod(mdg4)* no parecen tener una tonalidad muy diferente a la que desarrollaron la cutícula de los organismos doble mutantes para dAdd1 y *Mod(Mdg4)* (Figura 30) y la forma de las alas (Figura 31). Además, estos datos indican que las proteínas dAdd1 y dXNP actúan en la misma vía regulando negativamente la actividad de las proteínas de arquitectura sobre la secuencia de *Gypsy*.

Como se mencionó anteriormente, los alelos reporteros  $y^2$  y  $ct^6$  poseen la inserción del retrotransposón *Gypsy*, el cual cercano a su región 5 contiene 12 motivos de unión para la PA Su(Hw), que a su vez puede reclutar a *Mod(mdg4)* y CP190 y generar una actividad de bloqueo de enhancer disminuyendo la expresión de estos dos genes reporteros (Figuras 18 y 19) (Melnikova *et al.*, 2017), posiblemente debido a que las proteínas dAdd1 y dXNP puedan estar interfiriendo en la estabilidad de estos complejos.



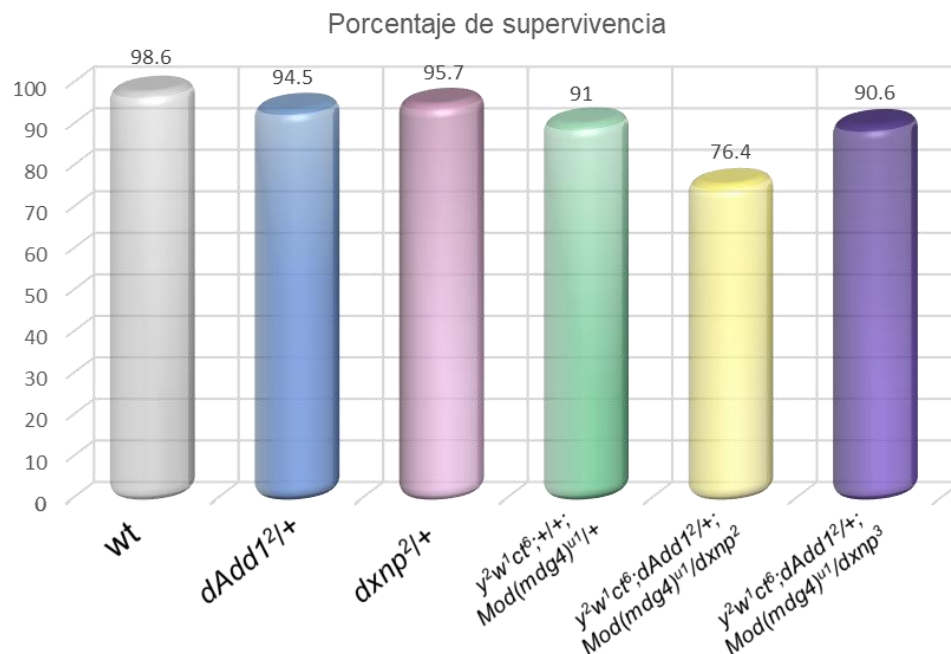
**Figura 34:** Fenotipos observados en alas de organismos heterocigotos para *dxnp* en combinación con el alelo *Mod(mdg4)<sup>u1</sup>* en un fondo  $ct^6$ . En el caso de los organismos doble mutantes para *dxnp* y *Mod(mdg4)* en un fondo  $ct^6$  se puede apreciar claramente que el fenotipo generado es nuevamente aserrado en el cual aparecen muescas en todo el perímetro del ala (flechas negras) lo que indica que al mutar *dxnp* en heterocigosis es suficiente para reestablecer la actividad de bloqueo de enhancer ya que se genera un fenotipo parecido al de las alas de organismos de genotipo  $ct^6$ .



#### 7.4.- Interacción genética entre *dAdd1*, *dxnp* y *Mod(mdg4)* (Triple-mutantes)

Para determinar si había un efecto mayor en la restauración de la actividad de bloqueo de enhancer se generaron líneas triple-mutantes. En la Figura 35 se muestra la supervivencia hasta la etapa adulta de organismos triple mutantes para *dAdd1*, *dxnp* y *Mod(mdg4)* en comparación con sus controles. Cabe destacar que solo los individuos de genotipo  $y^2w^1ct^6/Y; dAdd1^2/+; Mod(mdg4)^{u1}/dxnp^2$  mostraron una supervivencia del 76.4% la cual es ~16% menor al resto de los demás genotipos. Esto concuerda parcialmente con lo reportado por López-Falcón *et al.*, 2014, donde, generando organismos triple mutantes que contenían el alelo *dxnp*<sup>2</sup> en combinación con alelos mutantes de *dAdd1* más el alelo *dxnp*<sup>3</sup> se encontró una tasa de supervivencia muy similar.

Sin embargo, esto contrasta con el hecho de que los organismos de genotipo  $y^2w^1ct^6/Y; dAdd1^2/+; dxnp^3/Mod(mdg4)^{u1}$  tuvieron una tasa de supervivencia muy similar a la que se observó en todos los controles (Figura 29). Lo indica que la disminución de la viabilidad viene dada por la presencia de los alelos *dxnp*<sup>2</sup> y *dxnp*<sup>3</sup> en el mismo fondo genético (Bassett *et al.*, 2008), y aparentemente no es producto de la combinación entre los alelos de *dxnp* y *dAdd1*. Además, en este caso, el alelo hipomorfo *Mod(mdg4)^{u1}* no produjo una disminución de la tasa de supervivencia por sí solo (Gerasimova *et al.*, 1995, Gerasimova y Corces, 1998) o en combinación con los alelos *dAdd1*<sup>2</sup> y *dxnp*<sup>3</sup>.



**Figura 35:** Porcentaje de organismos que alcanzaron la etapa adulta tanto en los controles individuales, así como en organismos que presentan combinaciones de alelos mutantes para *dAdd1*, *dxnp* y *Mod(mdg4)* (triple-mutantes). El número de individuos analizados fueron obtenidos en 3 experimentos independientes y se muestra en la tabla 5.

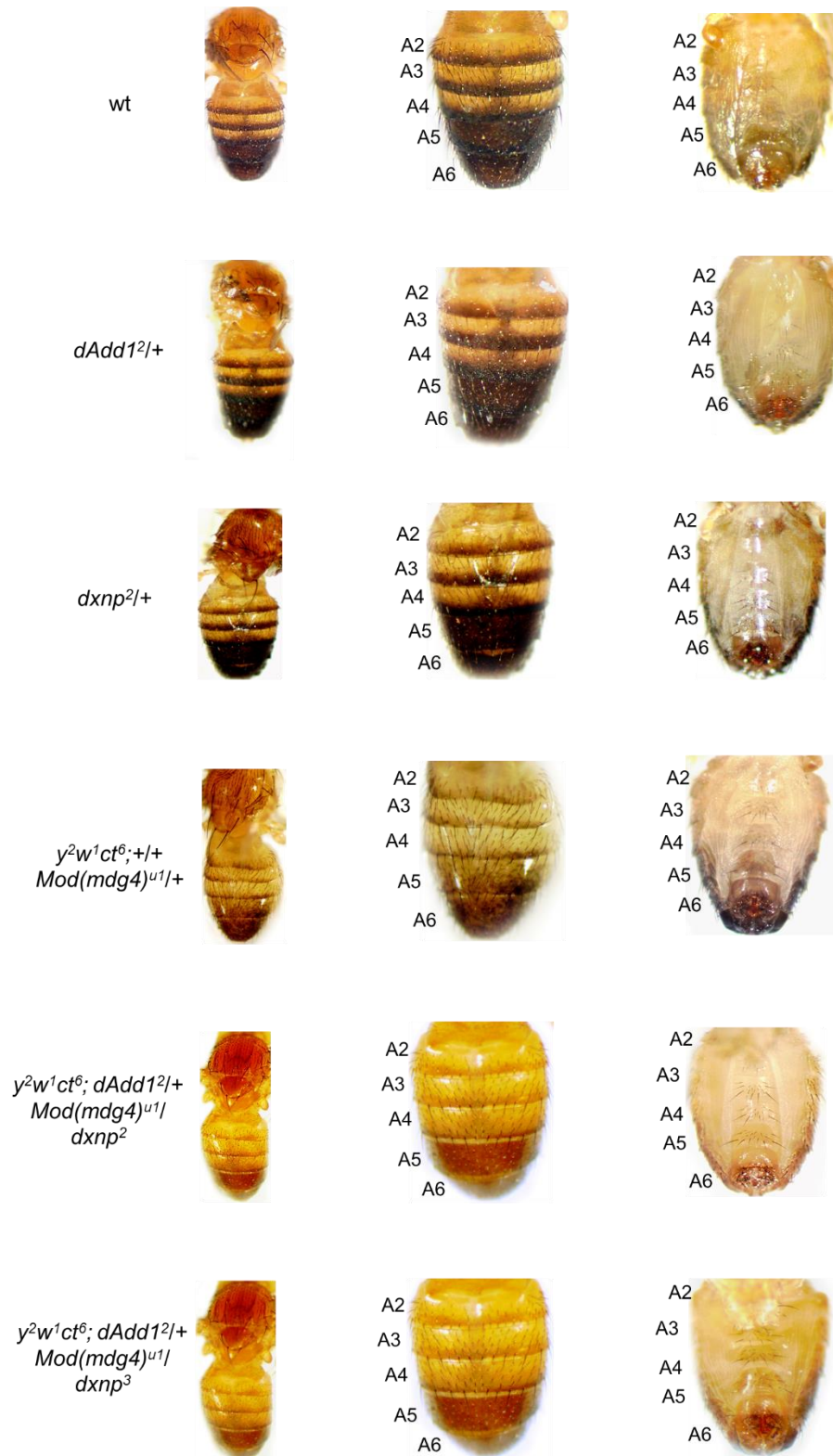
En la tabla 5, se desglosan los resultados referentes a los fenotipos generados por las diferentes combinaciones de alelos en los organismos triple-mutantes. Cabe señalar en primer lugar que en el control  $y^2w^1ct^6/Y; +/+ Mod(mdg4)^{u1}/+$  de se observa que el 100% de los individuos presentaron una cutícula ligeramente amarilla (Figura 36) además de que también presentaron ligeros defectos en ala (Figura 37).

Lo anterior es producto de dos factores, en primer lugar, está el efecto de haber cruzado hembras homocigas de genotipo  $y^2w^1ct^6/y^2w^1ct^6; +/+; Mod(mdg4)^{u1}/Mod(mdg4)^{u1}$  con machos wt, y cuya proporción de fenotipos no hubiera sido la misma al haber realizado la cruce inversa (Gerasimova y Corces, 1998). Mientras que, en segundo lugar, está el hecho de que el alelo hipomorfo  $Mod(mdg4)^{u1}$  no causa una total interrupción de la actividad de bloqueo de enhancer, ya que los individuos aún presentan ligeros defectos en el borde del ala, así como una cutícula ligeramente amarilla.

Además, en la tabla 3 se muestra que los organismos triple mutantes para *dAdd1*, *dxnp* y *Mod(mdg4)* en un fondo  $y^2ct^6$  también desarrollaron en un 100% una coloración amarilla en la cutícula (Figura 36) así como defectos en el borde del ala (Figura 37). Sin embargo, estos defectos resultan ser más severos que en el control  $y^2w^1ct^6; +/+; Mod(mdg4)/+$ . Lo anterior es un claro indicador que en las triple-mutantes también se genera una ganancia de en la actividad de bloqueo de enhancer, aunque cabe destacar que no parece haber un aumento en la penetrancia del fenotipo.

<b>Genotipo</b>	Masas melanóticas (%)	Genital rotado (%)	Segmentos abdominales extras (%)	Defectos en el borde del ala (%)	Cutícula yellow (%)
wt	0/319 <b>(0%)</b>	0/319 <b>(0%)</b>	0/319 <b>(0%)</b>	0/319 <b>(0%)</b>	0/319 <b>(0%)</b>
<i>dAdd1</i> <sup>2</sup> /+	0/285 <b>(0%)</b>	0/285 <b>(0%)</b>	0/285 <b>(0%)</b>	0/285 <b>(0%)</b>	0/285 <b>(0%)</b>
<i>dxnp</i> <sup>2</sup> /+	0/141 <b>(0%)</b>	0/141 <b>(0%)</b>	0/141 <b>(0%)</b>	0/141 <b>(0%)</b>	0/141 <b>(0%)</b>
$y^2w^1ct^6;$ <i>Mod(mdg4)</i> <sup>u1</sup> /+	0/71 <b>(0%)</b>	0/71 <b>(0%)</b>	0/71 <b>(0%)</b>	71/71 <b>(100%)</b>	71/71 <b>(100%)</b>
$y^2w^1ct^6;$ <i>dAdd1</i> <sup>2</sup> /+ <i>Mod(mdg4)</i> <sup>u1</sup> / <i>dxnp</i> <sup>2</sup>	0/26 <b>(0%)</b>	0/26 <b>(0%)</b>	0/26 <b>(0%)</b>	26/26 <b>(100%)</b>	26/26 <b>(100%)</b>
$y^2w^1ct^6;$ <i>dAdd1</i> <sup>2</sup> /+ <i>Mod(mdg4)</i> <sup>u1</sup> / <i>dxnp</i> <sup>3</sup>	0/29 <b>(0%)</b>	0/29 <b>(0%)</b>	0/29 <b>(0%)</b>	29/29 <b>(100%)</b>	29/29 <b>(100%)</b>

**Tabla 5:** Interacción genética entre *dAdd1*, *dxnp* y *Mod(mdg4)* en organismos triple-mutantes. En la tabla se presenta el **(porcentaje)** de individuos que presentaron masas melanóticas, genitales rotados, segmentos abdominales extra, defectos en el ala y coloración amarilla en la cutícula tanto en los controles como en los organismos que tienen combinaciones de alelos mutantes.



**Figura 36:** Fenotipos obtenidos en machos adultos triple-mutantes. En la imagen se aprecia que las triples mutantes generan una cutícula más amarilla a comparación del control *y<sup>2</sup>w<sup>1</sup>ct<sup>6</sup>; +/+; Mod(mdg4)/+*. Lo que indica que al mutar a *dAdd1* y *dXNP* en combinación con el alelo de *Mod(mdg4)<sup>u1</sup>* se restablece la actividad de bloqueo de enhancer.

Hasta este punto, queda claro que las proteínas dAdd1 y dXNP actúan como reguladores negativos de la actividad de bloqueo de enhancer mediada por el insulador formado a partir de la inserción de *Gypsy*, ya que una falta parcial o total de dAdd1 y parcial de dXNP restablece por completo su actividad. Una posibilidad para esto podría ser que las proteínas dAdd1 pudieran estar contribuyendo al silenciamiento de *Gypsy*, de modo que, al bajar sus niveles de expresión, *Gypsy* pueda establecer la actividad de bloqueo de enhancer mediante el reclutamiento del complejo Su(Hw)/CP190/Mod(mdg4).

Esta posibilidad es apoyada porque existen datos bioinformáticos no publicados del laboratorio, que han sugerido que existen putativamente 12 motivos de unión de dAdd1 dentro de la secuencia de *Gypsy* que está presente en los alelos  $y^2$  y  $ct^6$ . Hay que destacar que los sitios de unión de Su(Hw) dentro de *Gypsy* únicamente se encuentran en una región de 300 pb cercano al 5'UTR y cercano a esa región hay 3 posibles motivos de unión para las proteínas dAdd1, aunque estos motivos se encuentran distribuidos a lo largo de todo el retrotransposón.

En *Drosophila* se ha observado que las proteínas dAdd1 y dXNP contribuyen a la estabilidad cromosómica (Meyer-Nava *et al.*, 2020) ya que están involucrados en mantener silenciados a dos tipos de retrotransposones que son del tipo non-LTR (Non-Long Terminal Repeats) conocidos como Het-A y TART, en parte inhibiendo la transcripción de esos elementos mediante el reclutamiento de componentes involucrados en la formación de la heterocromatina y de esa manera, previniendo la inestabilidad cromosómica en telómeros (Chávez *et al.*, 2017).

El mismo efecto se ha visto con la proteína ATRX en vertebrados, donde se ha descrito que en células troncales embrionarias de ratón (mESCs) ATRX participa en conjunto con la chaperona DAXX depositando la histona H3.3 sobre los extremos 3' y 5' de los LTRs (Long Terminal Repeats) de una clase de retrotransposones conocidos como Endogenous Retroviral Elements (ERVs). Ya que la histona H3.3 puede albergar la marca H3K9me3 la cual genera represión sobre esos elementos evitando así inestabilidad cromosómica (Elssässer *et al.*, 2015; Sadic *et al.*, 2015).

Por todo lo anterior, existe la posibilidad de que, a partir de un mecanismo de formación de heterocromatina, las proteínas dAdd1 y dXNP estén actuando como reguladores negativos de la actividad de bloqueo de enhancer establecida por el retrotransposón *Gypsy*, ya que al mantenerse la heterocromatina sobre *Gypsy* pudiera estar afectando el reclutamiento de las proteínas del complejo Su(Hw)/CP190/Mod(mdg4).

Sin embargo, existe la posibilidad de que de también una falta de las proteínas dAdd1 y dXNP estén propiciando cambios a nivel de la formación de loops de la cromatina. Esto se debe a que se ha reportado que una disminución en la expresión de SMARCA4 (que es una ATPasa de la misma familia de CRCs que ATRX) desencadena cambios en la interacción entre regiones de cromatina, ya que se incrementan asociaciones intercromosomales en regiones subteloméricas (Barutcu *et al.*, 2016).

Además, una disminución en los niveles de SMARCA4 genera cambios en el posicionamiento de los nucleosomas alrededor de los sitios de unión de CTCF afectando la estabilidad de los límites de los TADs y también incrementando el número de interacciones dentro de los TADs. Todo lo anterior indica el papel de algunos CRCs como reguladores de unidades estructurales de la cromatina (Barutcu *et al.*, 2016).

## 7.5.- Análisis de coloración de cutículas de organismos mutantes.

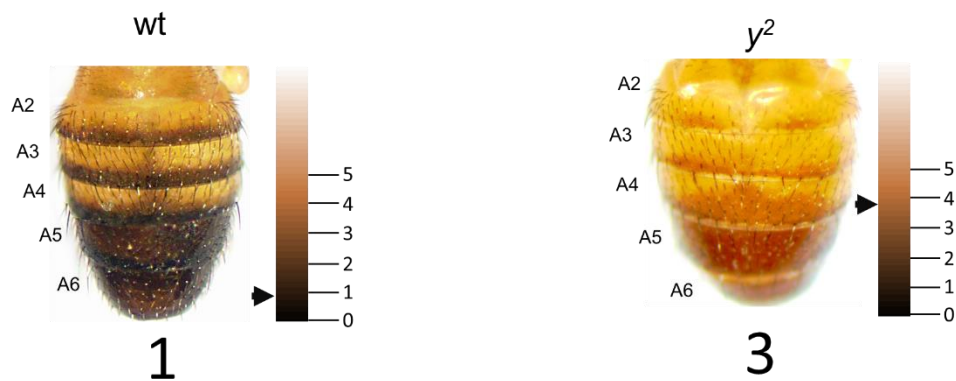
Para observar de una manera cualitativa si existían diferencias respecto a la tonalidad de la cutícula generada tanto en organismos doble y triple-mutantes entre *dAdd1*, *dxnp* y *Mod(mdg4)* se compararon las tonalidades de la cutícula de los segmentos A5/A6 de los abdómenes de machos con la ayuda de una escala de color RGB a la cual se le asignaron valores arbitrarios respecto a la tonalidad.

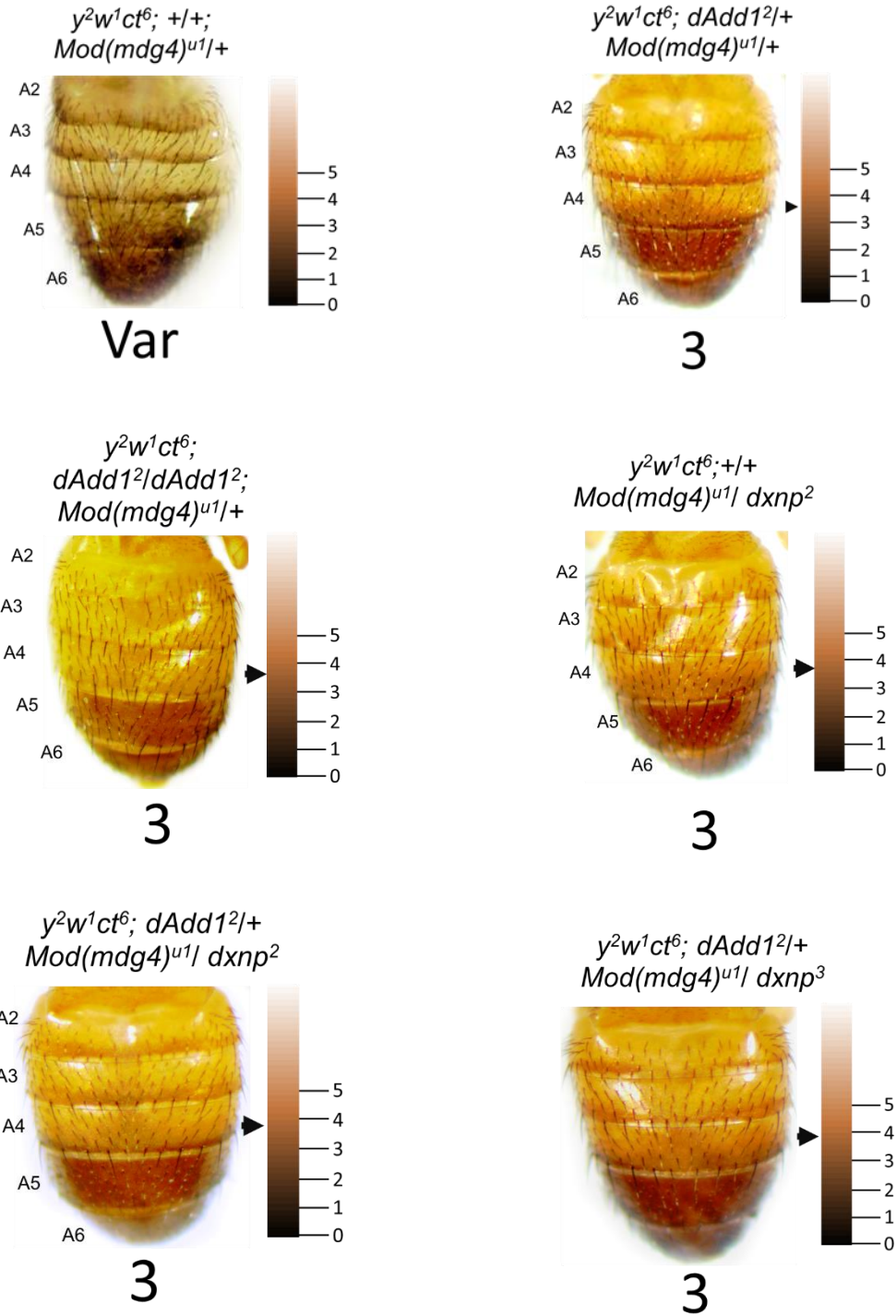
En la figura 37 se muestran los abdómenes con su respectiva escala de color RGB a un lado. A manera de comparación en primer lugar se muestra el abdomen de machos de genotipo *wt*, donde se puede apreciar que sus segmentos A5/A6 son de una tonalidad café oscuro/negruzco por lo cual esa tonalidad corresponde a un valor de 1 en la escala (mostrado en la parte inferior del abdomen). Por otro lado, también se indica en la Figura 37 la coloración que desarrollan las cutículas de organismos que son de genotipo  $y^2$  donde se aprecia que la tonalidad de los segmentos A5/A6 tiene un valor que corresponde a 3 según la escala RGB.

Respecto a la coloración desarrollada en las cutículas de los organismos de genotipo  $y^2 w^1 cf^6$ ; *dAdd1*<sup>2</sup>/+; *Mod(mdg4)*<sup>u1</sup>/+ también tienen un valor de 3 respecto a la escala de color, lo que indica que no hay diferencias en comparación con los organismos  $y^2$ . Además, las cutículas de los individuos homocigotos nulos para *dAdd1* en combinación con el alelo *Mod(mdg4)*<sup>u1</sup> también tienen un valor de alrededor de 3 según la escala. Por lo anterior, se puede decir que efectivamente no existe un aumento en la penetrancia en ese genotipo.

En el caso de los organismos heterocigotos para *dxnp*, de nueva cuenta se observa que la coloración generada en los segmentos A5/A6 puede ser clasificada con un valor de 3. Esto deja en claro que *dxnp* participa en la misma que las proteínas *dAdd1* y ambas son importantes regulando negativamente la actividad de bloqueo de enhancer (Figura 37).

Finalmente, en el caso de los organismos que son triple-mutantes para *dAdd1*, *dxnp* y *Mod(mdg4)* se puede apreciar que la coloración de sus cutículas corresponde a un valor de 3 según la escala RGB, por lo que en estos casos no existe una variación en la penetrancia. Indicando que únicamente basta con un alelo mutado para *dAdd1* o *dxnp* para generar una reversión hacia el fenotipo  $y^2$  (Figura 37).





**Figura 37:** Análisis de coloración de cutículas de todos los genotipos mutantes generados. Para el análisis se tomó en cuenta la coloración de los segmentos A5/A6 y se comparó con una escala de color RGB la cual tiene asignado valores que van de 0 (negro) hasta 5 (café claro). De acuerdo con la intensidad del tono en los segmentos A5/A6 de cada genotipo, se asignó un valor correspondiente a la escala y se colocó el número debajo de cada abdomen. Únicamente en el caso de los organismos de genotipo  $y^2w^1ct^6/Y; +/+; Mod(mdg4)^{u1}/+$  no hay un valor asignado ya que el fenotipo producido en esa condición es variegado debido a un debilitamiento de la actividad de bloqueo de enhancer (Melnikova *et al.*, 2017).

## 7.6.- Análisis morfométrico (AM) en alas de individuos triple-mutantes.

Para determinar el grado de cambio en estos bordes del ala, se recurrió a un análisis de morfometría, el cual permitió observar de una forma cuantitativa el cambio global en las alas entre el fenotipo observado en organismos wt, los del control  $y^2w^1ct^6; +/+; Mod(mdg4)^{u1}/+$  y los organismos triple mutantes. De acuerdo con el análisis de PCA (Figura 38), los datos se encuentran agrupados en dos clusters diferentes lo que significa que existen diferencias entre individuos wt y los del control  $y^2w^1ct^6; +/+; Mod(mdg4)^{u1}/+$  principalmente en la distancia morfológica correspondiente al AA Figura 39) (ver tabla 1 y Figura 25 para más información). Sin embargo, estas diferencias solo son mínimas debido a que existe una separación ligera entre los dos clusters de datos en el PCA.

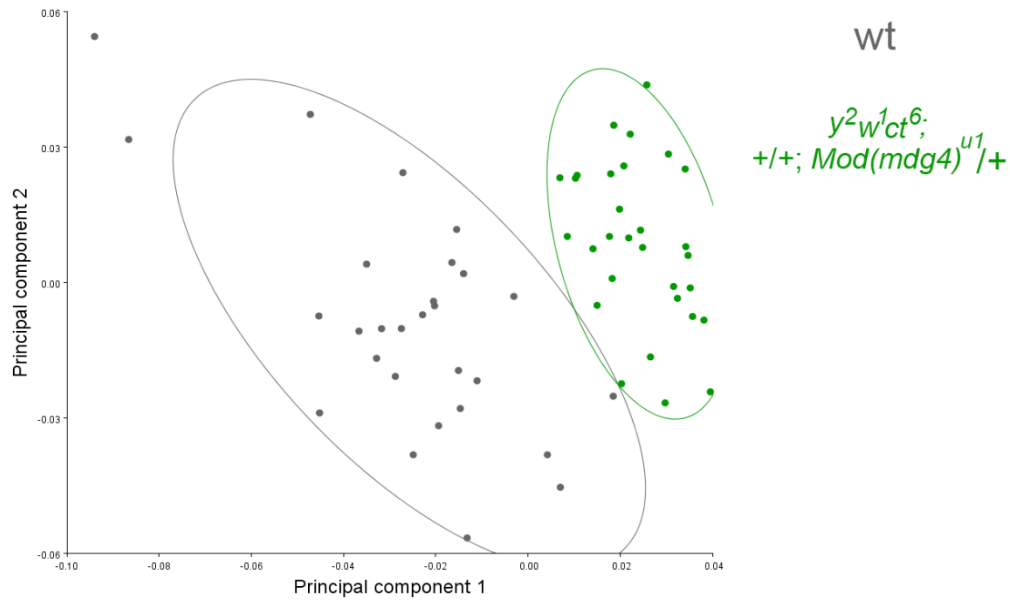
Por otro lado, los organismos triple mutantes de genotipo  $y^2w^1ct^6; dAdd1^2/+; Mod(mdg4)^{u1}/dxnp^2$  tuvieron diferencias significativas con respecto al control  $y^2w^1ct^6; +/+; Mod(mdg4)^{u1}/+$  lo cual se observa en el plot de PCA donde los dos clusters de datos se encuentran totalmente separados (Figura 40). Además, en el plot donde se reconstruyó la forma de las alas se puede apreciar claramente la diferencia entre la forma de las alas, donde la diferencia más marcada corresponde a la distancia morfológica del AA, así como una muy ligera disminución de la distancia de la LCA y un cambio de posición de la vena 2 (Figura 41).

En cuanto a las alas de los organismos triple mutante de genotipo  $y^2w^1ct^6; dAdd1^2/+; Mod(mdg4)^{u1}/dxnp^3$  se observa igualmente diferencias significativas con respecto al control  $y^2w^1ct^6; +/+; Mod(mdg4)^{u1}/+$  en el análisis de PCA (Figura 42). En cuanto a la reconstrucción de la forma de las alas, se puede observar una marcada disminución del AA, una muy ligera disminución del LCA y un cambio de posición de la vena 2 (Figura 43) (ver tabla 1 y Figura 25 para más información).

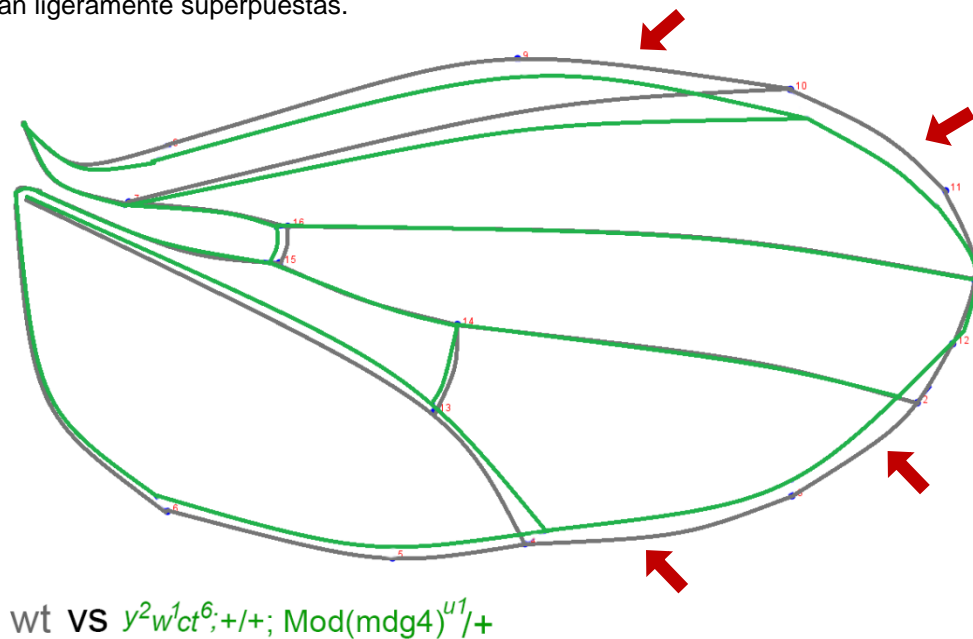
Finalmente, el análisis de PCA al comparar las alas de los organismos de genotipo  $y^2w^1ct^6; dAdd1^2/+; Mod(mdg4)^{u1}/dxnp^2$  con las alas de los de genotipo  $y^2w^1ct^6; dAdd1^2/+; Mod(mdg4)^{u1}/dxnp^3$  se aprecia que ambas elipses se encuentran totalmente sobrelapadas (Figura 44), lo que indica que no existe diferencia alguna entre las alas de ambos genotipos. Esto se ve también de una manera muy clara en el plot obtenido a partir del análisis discriminante (Figura 45).

Lo anterior muestra que al utilizar el alelo  $dxnp^2$  que es nulo para ambas isoformas o el alelo  $dxnp^3$  que únicamente afecta a la isoforma larga, se produce el mismo fenotipo, y sugiere que aparentemente la isoforma larga de dXNP es la que estaría participando en regular la actividad de bloqueo de enhancer mediada por el insulador *Gypsy* y el complejo de proteínas Su(Hw)/CP190/Mod(mdg4). Por esta razón, en análisis posteriores únicamente se trabajó con el alelo  $dxnp^2$ .

7.6.1.- wt vs  $y^2w^1ct^6$ ; +/+;  $Mod(mdg4)^{u1/+}$



**Figura 38:** PCA de los parámetros obtenidos de las alas de organismos con genotipo wt (n=35) (gris) y  $y^2w^1ct^6$ ; +/+;  $Mod(mdg4)^{u1/+}$  (n=35) (verde). En el gráfico se aprecian las relaciones entre “landmarks” por genotipo donde cada punto representa el ala de un individuo. Las elipses que agrupan ambos componentes muestran ligeras diferencias en las formas entre alas ya que estas se encuentran ligeramente superpuestas.

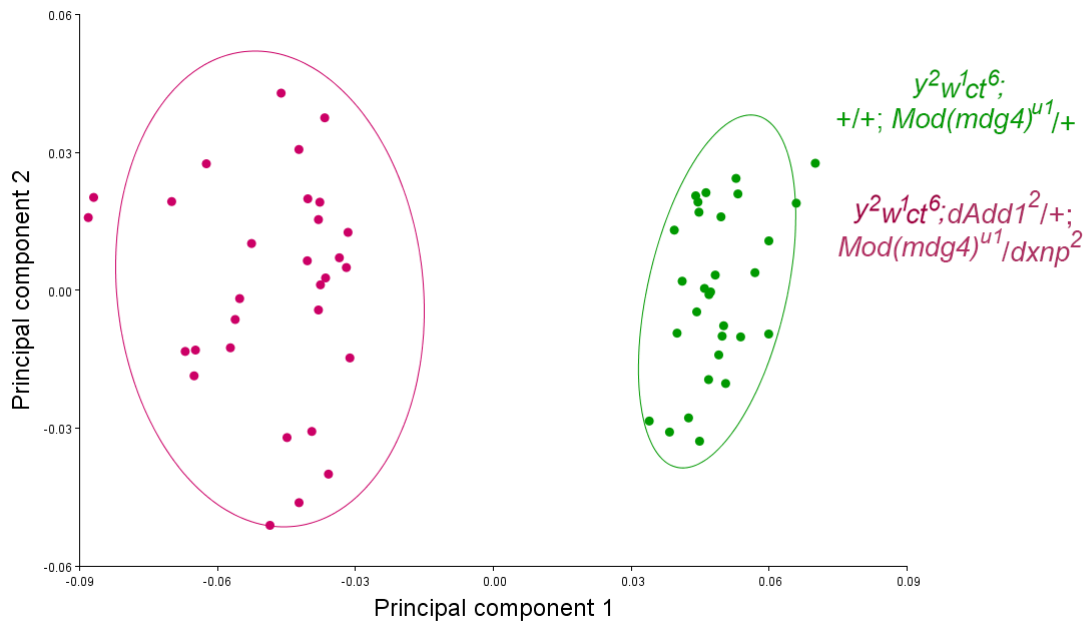


wt VS  $y^2w^1ct^6$ ; +/+;  $Mod(mdg4)^{u1/+}$

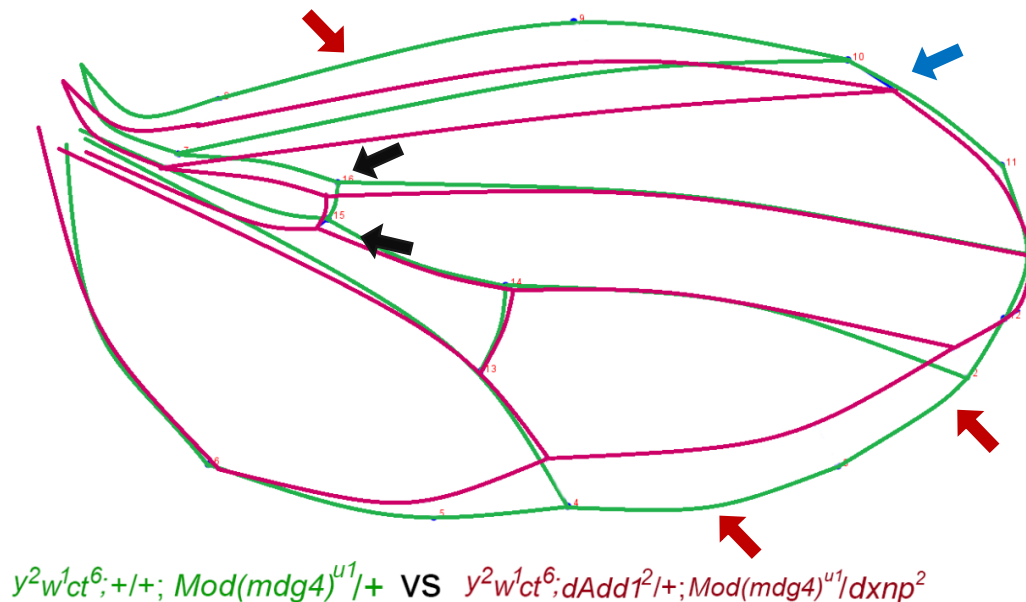
**Figura 39:** Resultado de la variación en la forma del ala entre las alas de organismos de genotipo wt (gris) comparado con alas de organismos de genotipo  $y^2w^1ct^6$ ; +/+;  $Mod(mdg4)^{u1/+}$  (verde). En la figura, se puede apreciar que existen ligeras diferencias entre los dos genotipos en la región del borde del ala (flechas rojas) ya que los organismos de genotipo  $y^2w^1ct^6$ ; +/+;  $Mod(mdg4)^{u1/+}$  poseen un ala ligeramente menos ancha. Por otro lado, en las venaciones en la parte intermedia del ala no se observa una gran variación.



7.6.2.-  $y^2w^1ct^6; +/+; Mod(mdg4)^{u1}$  vs  $y^2w^1ct^6; +/+; dAdd1^2/+; Mod(mdg4)^{u1}/dxnp^2$

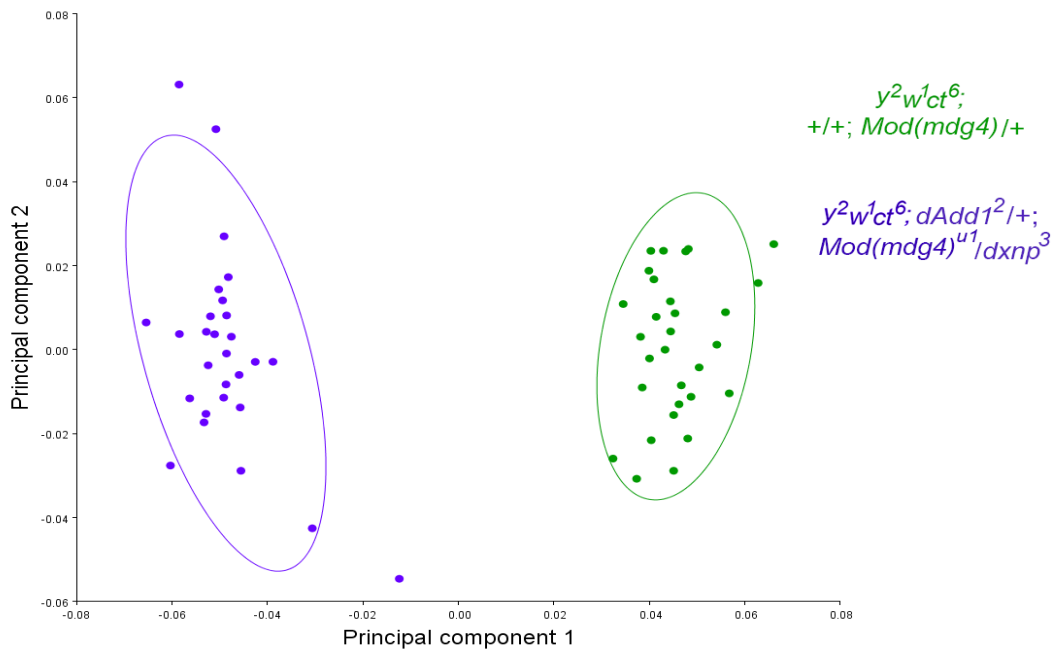


**Figura 40:** PCA de los parámetros obtenidos de las alas de organismos con genotipo  $y^2w^1ct^6; +/+; Mod(mdg4)^{u1}/+$  ( $n=35$ ) (verde) y  $y^2w^1ct^6; dAdd1^2/+; Mod(mdg4)^{u1}/dxnp^2$  ( $n=26$ ) (magenta). En el gráfico se aprecian las relaciones entre “landmarks” por genotipo, donde cada punto representa el ala de un individuo. Las elipses que agrupan los grupos muestran diferencias significativas en las formas entre alas de ambos genotipos ya que estas se encuentran totalmente separadas.

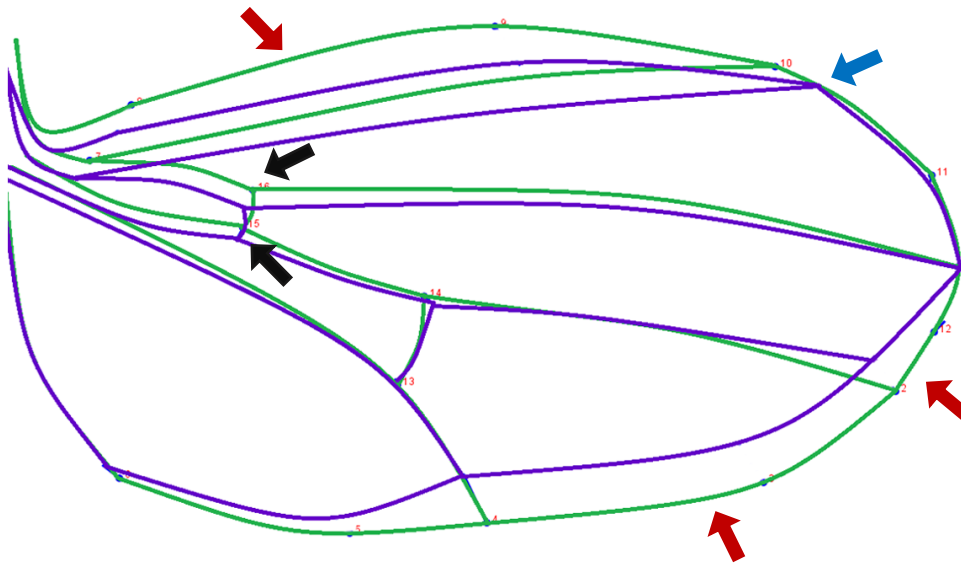


**Figura 41:** Resultado de la variación en la forma del ala entre las alas de organismos de genotipo  $y^2w^1ct^6; Mod(mdg4)^{u1}/+$  (verde) comparado con alas de organismos  $y^2w^1ct^6; dAdd1^2/+; Mod(mdg4)^{u1}/dxnp^2$  (magenta). En la figura se puede apreciar que existen marcadas diferencias entre los dos genotipos en la región del borde del ala (flechas rojas) mientras que casi no se observa variación en la posición de las venas salvo en la región de la cross-vena anterior (flechas negras) y la posición de la vena 2 (flecha azul).

7.6.3.-  $y^2w^1ct^6; +/+; Mod(mdg4)^{u1}$  vs  $y^2w^1ct^6; +/+; dAdd1^2/+; Mod(mdg4)^{u1}/dxnp^3$



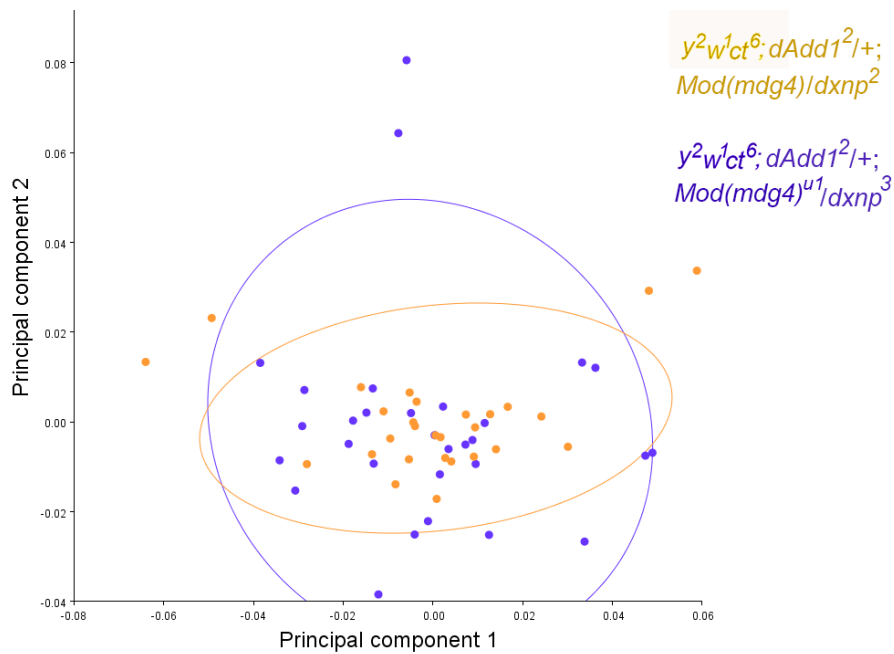
**Figura 42:** PCA de los parámetros obtenidos de las alas de organismos con genotipo  $y^2w^1ct^6; +/+; Mod(mdg4)^{u1}/+$  ( $n=35$ ) (verde) y  $y^2w^1ct^6; dAdd1^2/+; Mod(mdg4)^{u1}/dxnp^3$  ( $n=29$ ) (morado). En el gráfico se aprecian las relaciones entre “landmarks” por genotipo, donde cada punto representa el ala de un individuo. Las elipses que agrupan los grupos muestran diferencias significativas en las formas entre alas de ambos genotipos ya que estas se encuentran totalmente separadas.



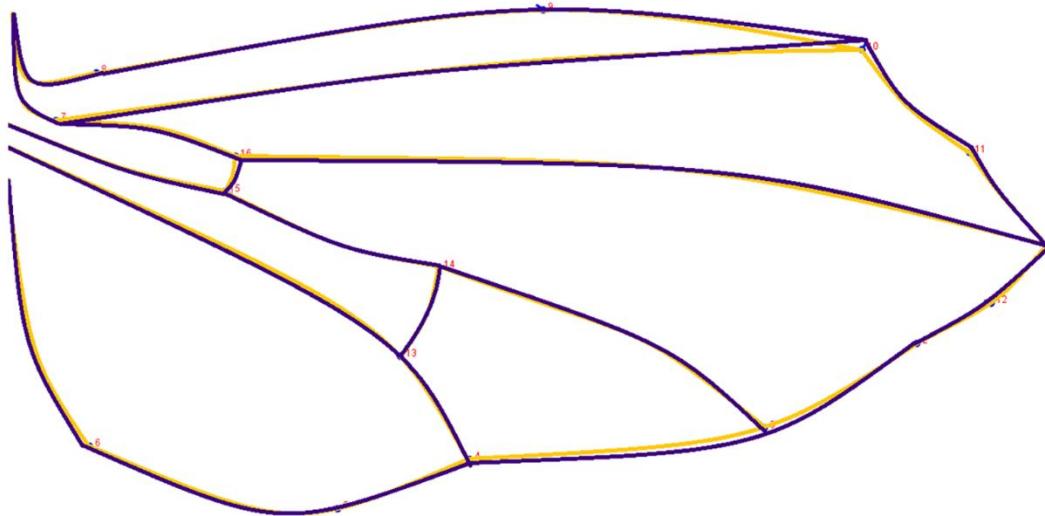
$y^2w^1ct^6; +/+; Mod(mdg4)^{u1}/+$  VS  $y^2w^1ct^6; dAdd1^2/+; Mod(mdg4)^{u1}/dxnp^3$

**Figura 43:** Resultado de la variación en la forma del ala entre las alas de organismos de genotipo  $y^2w^1ct^6; +/+; Mod(mdg4)^{u1}/+$  (verde) comparado con alas de organismos  $y^2w^1ct^6; +/+; dAdd1^2/+; Mod(mdg4)^{u1}/dxnp^3$  (morado). En la figura se puede apreciar que existen marcadas diferencias entre los dos genotipos en la región del borde del ala (flechas rojas) mientras que casi no se observa variación en la posición de las venas salvo en la región de la cross-vena anterior (flechas negras) y la posición de la vena 2 (flecha azul).

7.6.4.-  $y^2w^1ct^6; dAdd1^2/+; Mod(mdg4)^{u1}/dxnp^2$  vs  $y^2w^1ct^6; dAdd1^2/+; Mod(mdg4)^{u1}/dxnp^3$



**Figura 44:** PCA de los parámetros obtenidos de las alas de organismos con genotipo  $y^2w^1ct^6; dAdd1^2/+; Mod(mdg4)^{u1}/dxnp^2$  (n=26) (amarillo) y  $y^2w^1ct^6; dAdd1^2/+; Mod(mdg4)^{u1}/dxnp^3$  (n=29) (morado). En el gráfico se aprecian las relaciones entre “landmarks” por genotipo, donde cada punto representa el ala de un individuo. Las elipses que agrupan los grupos muestran que no hay diferencias en las formas entre alas de ambos genotipos ya que estas se encuentran totalmente sobrepuestas.



$y^2w^1ct^6; dAdd1^2/+; Mod(mdg4)^{u1}/dxnp^2$  vs  $y^2w^1ct^6; dAdd1^2/+; Mod(mdg4)^{u1}/dxnp^3$

**Figura 45:** Resultado de la variación en la forma del ala entre las alas de organismos de genotipo  $y^2w^1ct^6; dAdd1^2/+; Mod(mdg4)^{u1}/dxnp^2$  (amarillo) comparado con alas de organismos  $y^2w^1ct^6; +/+; dAdd1^2/+; Mod(mdg4)^{u1}/dxnp^3$  (morado). En la figura, se puede apreciar prácticamente no hay diferencias entre las alas desarrollados por cada uno de los dos genotipos evaluados.

### 7.6.5.- Validación estadística de análisis morfométrico

Genotipos comparados	Distancia procrustes	Distancia Mahalanobis	Valor de $p$
wt vs $y^2w^1ct^6; +/+; Mod(mdg4)^{u1}$	0.0535	12.7139	<0.0001
$y^2w^1ct^6; +/+; Mod(mdg4)^{u1}$ vs $y^2w^1ct^6; dAdd1^2/+; Mod(mdg4)^{u1}/dxnp^2$	0.0973	16.1408	<0.0001
$y^2w^1ct^6; +/+; Mod(mdg4)^{u1}$ vs $y^2w^1ct^6; dAdd1^2/+; Mod(mdg4)^{u1}/dxnp^3$	0.0943	20.1232	<0.0001
$y^2w^1ct^6; dAdd1^2/+; Mod(mdg4)^{u1}/dxnp^2$ vs $y^2w^1ct^6; dAdd1^2/+; Mod(mdg4)^{u1}/dxnp^3$	0.0160	0.0095	<0.0001

**Tabla 6:** Validación estadística mediante discriminante en el análisis morfométrico.

En la tabla 6 se muestra la validación estadística de los análisis de PCA obtenida mediante el análisis discriminante, en ella se pueden apreciar las distancias procrustes obtenidas para cada par de genotipo comparados, así como las distancias de Mahalanobis y el valor de  $p$  utilizado en la prueba estadística. El criterio de decisión para indicar que existe una diferencia significativa es que la distancia de procrustes sea menor a la distancia de Mahalanobis.

Con base en la anterior se puede apreciar que la distancia de Mahalanobis es mayor que la distancia de procrustes cuando se compararon las alas de las wt vs  $y^2w^1ct^6; +/+; Mod(mdg4)^{u1}$  y las triples mutantes  $y^2w^1ct^6; dAdd1^2/+; Mod(mdg4)^{u1}/dxnp^2$  y  $y^2w^1ct^6; dAdd1^2/+; Mod(mdg4)^{u1}/dxnp^3$  vs  $y^2w^1ct^6; +/+; Mod(mdg4)^{u1}$ .

Sin embargo, al comparar los organismos triple-mutante entre ellos, se puede apreciar que efectivamente no existen diferencias significativas y se concluye que mutando ambas isoformas de dXNP (mediante el uso del alelo  $dxnp^2$ ) o solo la isoforma larga (mediante el uso del alelo  $dxnp^3$ ) producen el mismo efecto.

En los análisis de morfometría cabe destacar que las diferencias significativas mayoritariamente se observaron en el borde del ala en general. Lo anterior concuerda con reportes previos para el patrón celular de expresión de *ct* (Jack *et al.*, 1991, Guo *et al.*, 1999, Zhang *et al.*, 2000). Lo anterior indica que el efecto fenotípico observado en las alas es por una expresión disminuida de *ct* y no por otros factores. No obstante, también se observaron variaciones en la zona de cross-vena anterior, aunque esto pudo deberse únicamente por la reducción del ancho de las alas posiblemente por eventos de apoptosis (Jack *et al.*, 1991).

## 7.7.- Evaluación de actividad de insulador mediante el desarrollo de sensilias mecanosensoras en el borde del ala.

Una forma alternativa de medir la actividad de insulador sobre el gen reportero *ct* es mediante la evaluación de la pérdida de sensilias mecanosensoras, ya que sabe que una mosca de genotipo *wt* presenta ~90 sensilias en la parte apical del ala (Figura 46), mientras que una expresión disminuida de *ct* ha mostrado generar un menor número de estas estructuras (Kwon *et al*, 2016).

Por ejemplo, los individuos que poseen el alelo *ct<sup>6</sup>* en conjunción con otras mutaciones de componentes del complejo de insulador formado a raíz de *Su(Hw)* como lo es *CP190* (que es una proteína involucrada en el establecimiento de la actividad de bloqueo de enhancer junto a *Su(Hw)*) y *Mod(mdg4)* han mostrado un número menor a 90 sensilias mecanosensoras (Kwon *et al*, 2016).

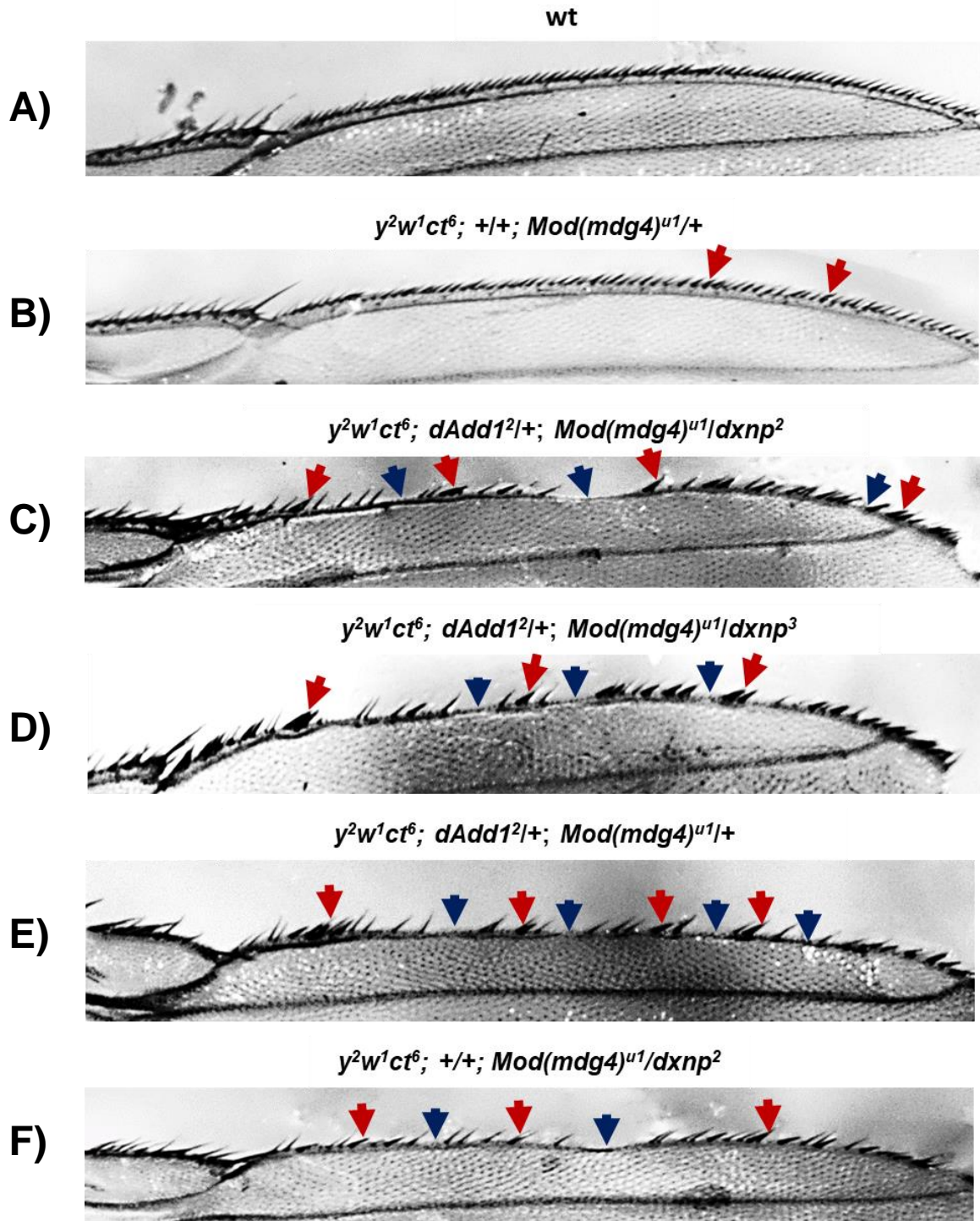
Por ello, se realizó una cuantificación del número de sensilias desarrolladas en las alas de los organismos mutantes. En primer lugar, se observó que los individuos de genotipo *y<sup>2</sup>w<sup>1</sup>ct<sup>6</sup>; +/+; Mod(mdg4)<sup>u1</sup>/+* desarrollaron un número muy similar de sensilias en comparación con los organismos *wt*, aunque cabe destacar que se notó la aparición de algunas sensilias de morfología anormal, ya que son un poco más engrosadas que las demás (Figura 46B).

Con base en lo anterior, los resultados de la cuantificación del número de sensilias mostraron que en los individuos de genotipo *y<sup>2</sup>w<sup>1</sup>ct<sup>6</sup>; +/+; Mod(mdg4)<sup>u1</sup>/+* no existe una diferencia significativa con respecto a los individuos *wt* (Figura 47). Lo cual era de esperarse debido a que como ya se mencionó anteriormente, el alelo *Mod(mdg4)<sup>u1</sup>* genera una pérdida de función de la actividad de bloqueo de enhancer, lo que restablece en gran medida la expresión de *ct*.

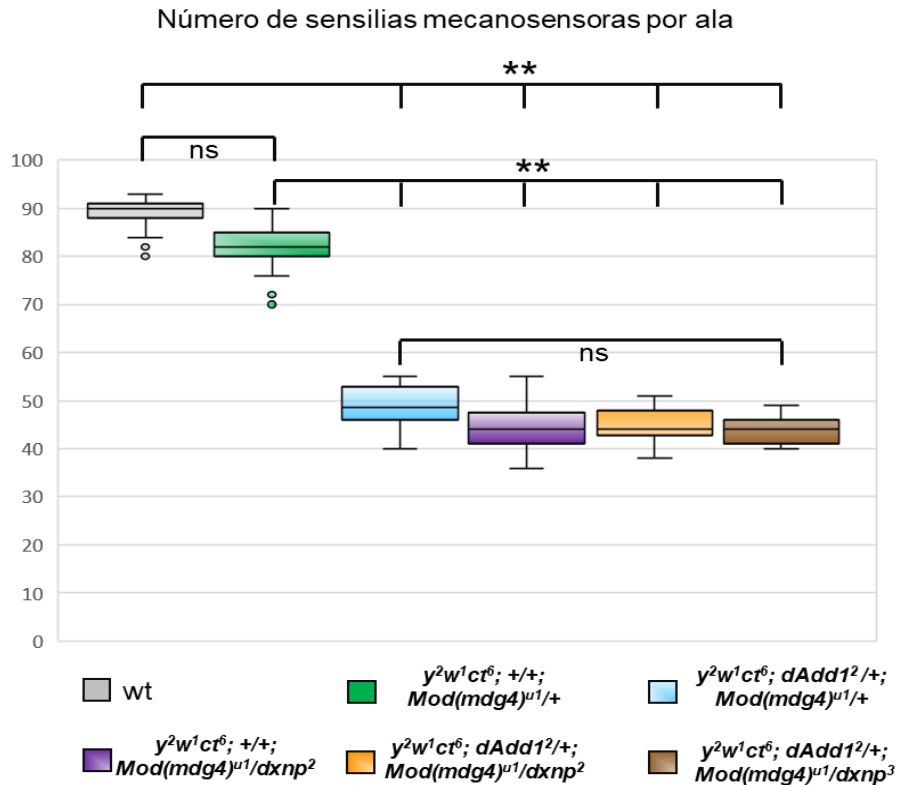
En el caso de los organismos que son triple-mutantes (Figura 46C y D) se observa a simple vista que el número de sensilias disminuye en comparación con el control *wt* y los organismos de genotipo *y<sup>2</sup>w<sup>1</sup>ct<sup>6</sup>; +/+; Mod(mdg4)<sup>u1</sup>/+*. En las imágenes es evidente la aparición de zonas en el borde del ala que no desarrollaron las sensilias, así como un mayor número de sensilias anormales. Adicionalmente, la cuantificación del número de sensilias arrojó que dicha disminución es estadísticamente significativa en comparación con los organismos *wt* y los de genotipo *y<sup>2</sup>w<sup>1</sup>ct<sup>6</sup>; +/+; Mod(mdg4)<sup>u1</sup>/+* (Figura 47).

Por último, los individuos doble-mutantes también mostraron una disminución estadísticamente significativa en el número de sensilias, con respecto al control *wt* y los individuos de genotipo *y<sup>2</sup>w<sup>1</sup>ct<sup>6</sup>; +/+; Mod(mdg4)<sup>u1</sup>/+*, así como un aumento en el número de sensilias anormales (Figura 46E y F). Además, los resultados de la cuantificación del número de sensilias arrojó que no existen diferencias significativas en el número total de sensilias desarrolladas entre los organismos triple y doble-mutantes (Figura 47).

Esto quiere decir que se necesita únicamente el alelo *Mod(mdg4)<sup>u1</sup>* más *dAdd1<sup>2</sup>* y/o *dxnp<sup>2</sup>* para generar un fenotipo muy evidente en el ala. Además, hasta este punto ha quedado evidenciado que *dAdd1* y *dXNP* están participando en la misma vía, ya que la falta de cualquiera de los dos genera los fenotipos anteriormente observados en la misma medida y no presentan un efecto aditivo al estar mutados al mismo tiempo.



**Figura 46:** Fotos representativas del borde superior de las alas de donde se encuentran las sensilias mecanosensoras y que pueden ser afectadas por la actividad de insulador de Mod(mdg4). Las flechas rojas indican sensilias engrosadas o de morfología engrosada (órganos cordotonales) mientras que las flechas azules indican zonas que carecen de sensilias mecanosensoras.



**Figura 47:** Promedio de número de sensilias mecanosensoras por genotipo. Análisis estadístico de ANOVA \*\* =  $p < 0.05$

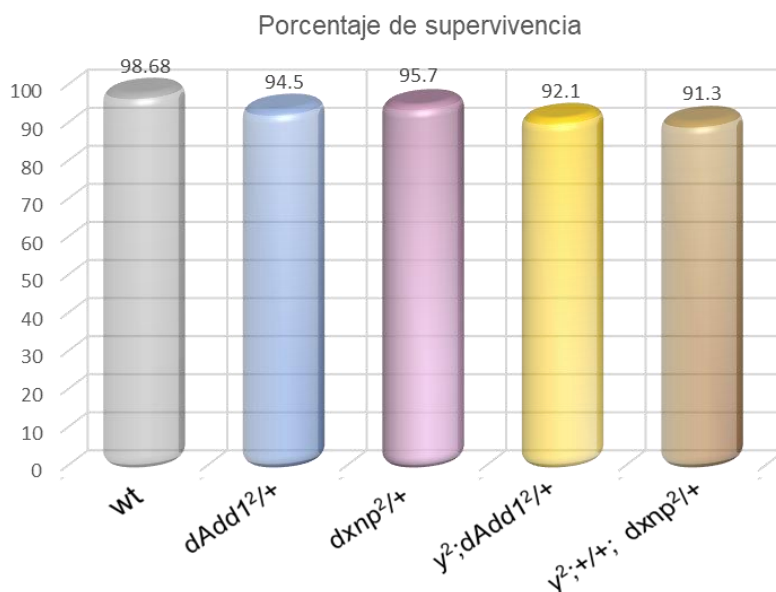
Las sensilias en general son componentes del sistema nervioso periférico y tienen patrones de desarrollo similares entre ellas (Simpson y Marcellini, 2006). En el caso de las mecanosensoras, estas son parte de un órgano que está compuesto de 4 tipos celulares que son denominados como “shaft”, “socket”, “neuron sheath” y neurona bipolar, los cuales son el resultado de la especialización de cuatro células generadas por divisiones sucesivas de una célula precursora denominada como SOP (célula precursora del órgano sensorial) (Furman y Bukharina, 2008).

*ct* actúa como un gen selector neuronal, el cual se expresa específicamente en las células SOP, por lo que ha mostrado ser necesario para la formación de los 4 tipos celulares que forman a las sensilias mecanosensoras (Blochlinger *et al*, 1990). Además, se ha reportado que una disminución en la expresión de *ct* resulta en una alteración molecular y morfológica de las sensilias, las cuales se transforman en órganos cordotonales (Merritt, 1997). Esto explica la aparición de lo que en este trabajo se hizo referencia como sensilias engrosadas. Cabe destacar que los órganos cordotonales también funcionan como órganos mecanoreceptores especializados y como propioceptores, pero estos no se localizan en el ala sino en articulaciones en el exoesqueleto, así como en extremidades (Field and Matheson, 1998).

Además, otro papel de *ct* respecto a la especificación del margen del ala es que actúa como un interactor de varias vías que participan en el desarrollo del ala como Notch y Wingless (*wg*), siendo este último más relevante, debido a que *ct* mantiene la expresión de este morfógeno en la etapa de prepupa (Micchelli *et al.*, 1997). Sin embargo, se sabe que la actividad de *ct* es independiente del mantenimiento de la expresión de *wg*, y se han identificado alrededor de 45 loci genéticos que interactúan con *ct* (Krupp *et al*, 2005).

### 7.8.- Efecto sobre la actividad de insulador en el alelo reportero $y^2$

El 92% de los individuos de genotipo  $y^2; dAdd1^{2/+}$  alcanzaron la etapa adulta, por lo que no se ve comprometida la viabilidad en este caso, mientras que el 91.3% los organismos de genotipo  $y^2; +/+; dxnp^2/+$  alcanzaron la etapa adulta (Figura 48).



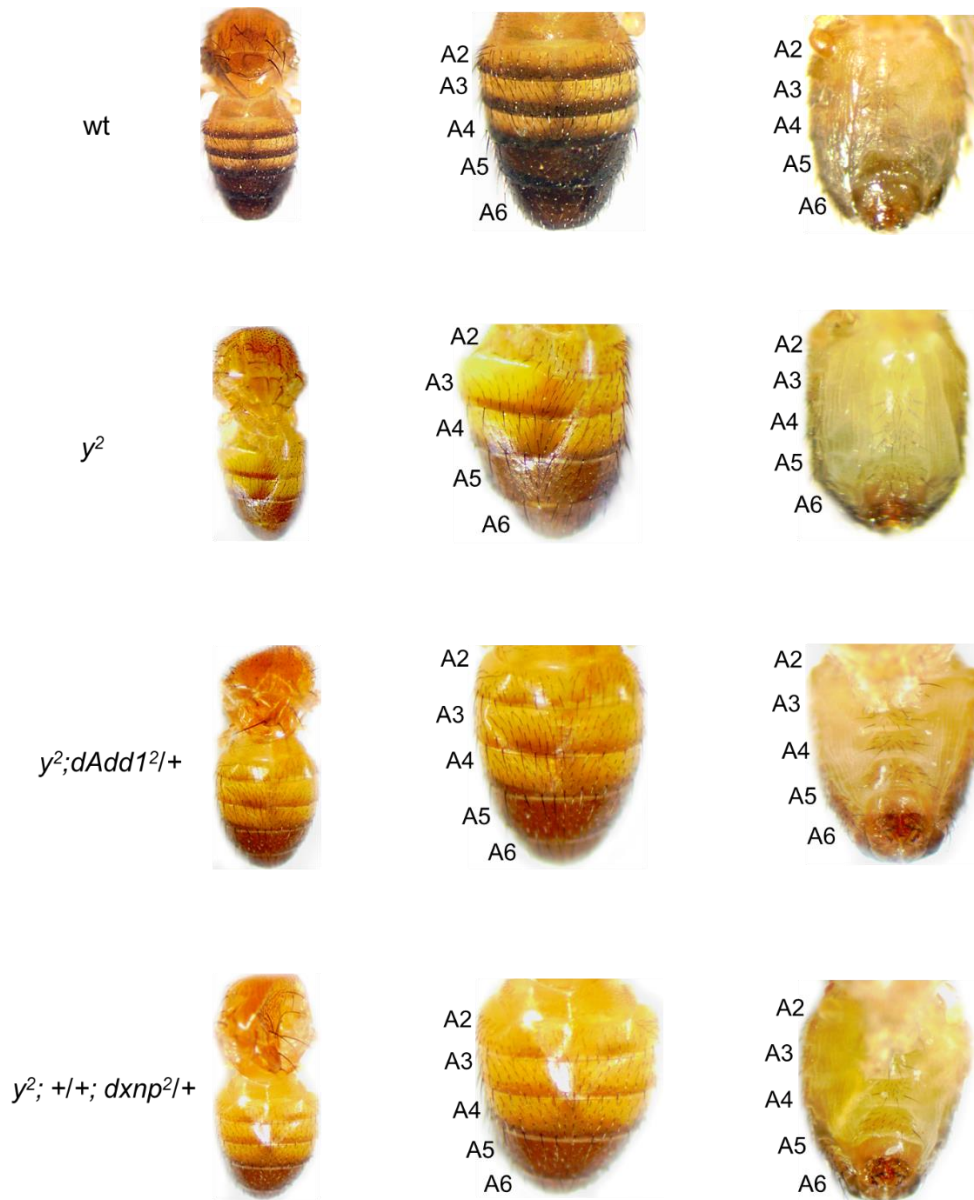
**Figura 48:** Porcentaje de organismos que alcanzaron la etapa adulta en organismos de genotipo  $y^2; dAdd1^{2/+}$  y  $y^2; +/+; dxnp^2$ . El número de individuos analizados fueron obtenidos en 3 experimentos independientes y se muestra en la tabla 7

Por otro lado, en la tabla 6, se muestran los resultados referentes a los fenotipos que se podrían generar en los organismos mutantes para  $dAdd1^{2/+}$  en un fondo  $y^2$ . En ella, se puede apreciar  $dAdd1$  y/o  $dxnp$  en un fondo  $y^2$  generan una cutícula amarilla, por lo que en este caso no se observa una alteración en la actividad de bloque de enhancer.

Genotipo	Masas melanóticas (%)	Genital rotado (%)	Segmentos abdominales extras (%)	Cutícula yellow (%)
$dAdd1^{2/+}$	0/285 <b>(0%)</b>	0/285 <b>(0%)</b>	0/285 <b>(0%)</b>	0/285 <b>(0%)</b>
$y^2; dAdd1^{2/+}$	0/122 <b>(0%)</b>	0/122 <b>(0%)</b>	0/122 <b>(0%)</b>	122/122 <b>(100%)</b>
$y^2; +/+; dxnp^2/+$	0/75 <b>(0%)</b>	0/75 <b>(0%)</b>	0/75 <b>(0%)</b>	75/75 <b>(100%)</b>

**Tabla 7:** Efecto de  $dAdd1$  y  $dXNP$  sobre el alelo reportero  $y^2$ . En la tabla se presenta el porcentaje de individuos que presentaron masas melanóticas, genitales rotados, segmentos abdominales extra, defectos en el ala y cutícula amarilla.





**Figura 49:** Fenotipos obtenidos en machos adultos. Se aprecia que los machos de genotipo  $y^2$ ;  $dAdd1^2/+$  y  $dxnp^2$  resultaron no tener una coloración amarilla, si no, que su cutícula se asemeja a la coloración de las moscas wt.

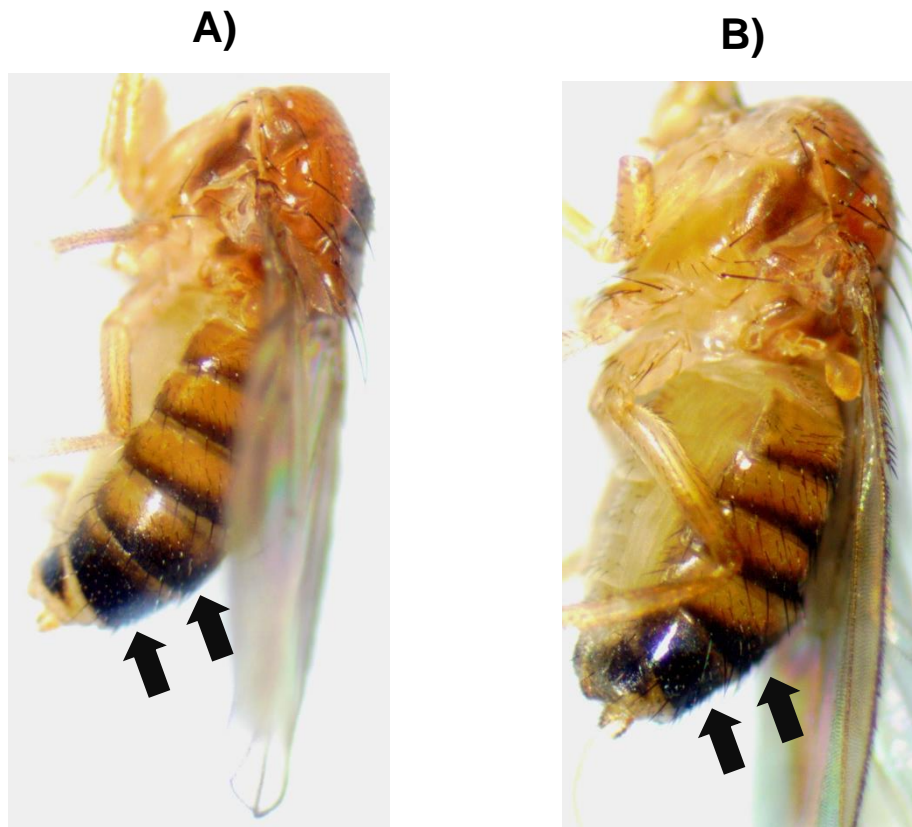
La falta de una coloración amarilla únicamente mutando a  $dAdd1$  y/o  $dxnp$  en un fondo  $y^2$  contrasta con los resultados obtenidos previamente. Sin embargo, esto puede deberse a que en el caso de las dobles y triples mutantes se contaba con el alelo  $Mod(mdg4)^{u1}$  el cual generaba una menor estabilidad en el insulador y posiblemente mutando un solo alelo de  $dAdd1$  o  $dxnp$  era suficiente para observar un fenotipo.

Por ello, sería necesario generar organismos que sean homocigotos nulos para  $dAdd1$  y heteroalélicos para  $dxnp$  en un fondo  $y^2$  y/o  $ct^6$  evaluar si se produce de nuevo un cambio en los fenotipos derivados de una disminución de la expresión del gen reportero.

### 7.9.- Efecto de *dAdd1*, *dXNP* y *Mod(mdg4)* sobre la pigmentación del abdomen en hembras

En *D. melanogaster* existe un dimorfismo sexual respecto al patrón de coloración en el abdomen. Los machos poseen un color claro en los segmentos A2-A4, con una banda de coloración negra en la región posterior de esos segmentos, así como una coloración totalmente oscura en los segmentos A5/A6 (Figura 27, ver genotipo wt). Por otro lado, las hembras, poseen una coloración clara entre los segmentos A2-A6 con una banda de coloración negra en la región posterior de los segmentos (Figura 28, ver wt).

Sorpresivamente, las hembras triple-mutantes de genotipo  $y^2w^1ct^6/y^1w$ ;  $dAdd1^{2/+}$ ;  $Mod(mdg4)^{u1}/dxnp^2$  y  $y^2w^1ct^6$ ;  $dAdd1^{2/+}$ ;  $Mod(mdg4)^{u1}/dxnp^3$  desarrollaron un cambio en el patrón de pigmentación en los segmentos más posteriores del abdomen. En el segmento A6 y la mitad del segmento A5 mostraron una deposición de pigmento negro que les da apariencia de macho (Figura 50). Cabe destacar que efectivamente son hembras ya que no poseen peines sexuales en el primer par de patas, los cuales son estructuras que únicamente tienen los machos cuya función es facilitar la cópula con las hembras.



**Figura 50:** Cambio de en el patrón de coloración en la cutícula en el abdomen de hembras triple-mutantes: A)  $y^2w^1ct^6/y^1w$ ;  $dAdd1^{2/+}$ ;  $Mod(mdg4)^{u1}/dxnp^2$ . B)  $y^2w^1ct^6/y^1w$ ;  $dAdd1^{2/+}$ ;  $Mod(mdg4)^{u1}/dxnp^3$ . En ambos casos puede observar que las hembras de esos genotipos desarrollan una coloración negra que abarca todo el segmento A6, así como la mitad del segmento A5 (flechas negras), lo cual les da una apariencia más cercana a machos.

En *Drosophila*, así como en otros insectos, la coloración que adquieren las cutículas de los adultos resulta de una combinación entre melaninas y esclerotinas, las cuales son producidas por vías bioquímicas interconectadas que procesan tirosina obtenida a partir de la dieta (True, 2003; Zhan *et al.*, 2010; Massey y Wittkopp, 2016), lo que genera pigmentos que son depositados en la cutícula en desarrollo durante estadios pupales tardíos, así como en etapas tempranas del adulto (Walter *et al.*, 1996, Wittkopp *et al.*, 2003).

En *D. melanogaster* los pigmentos se forman a partir de dopamina, que puede entrar a 4 vías diferentes para la generación melaninas y esclerotinas. En el caso de la proteína yellow, se sabe que está involucrada junto a fenol-oxidasas en la catálisis de dopamina hacia melanina negra, y una disminución en la expresión de *y* afecta la formación de las mismas ya que se favorece la síntesis de esclerotinas originando una cutícula amarilla o melaninas cafés (Wittkopp *et al.*, 2009; Massey y Wittkopp, 2016).

Interesantemente, los genes involucrados en la síntesis de pigmentos como, por ejemplo, *yellow*, *ebony* y *tan*, son regulados por cinco factores transcripcionales en *Drosophila*, los cuales son; *bric a brac (bab)*, *doublesex (dsx)*, *Distal-less (Dll)*, *Engrailed (en)* y *abdominal-B (Abd-B)* (Massey y Wittkopp, 2016). Este último resalta debido a que se sabe que puede unirse directamente sobre el enhancer de cuerpo de *yellow* y propiciar su transcripción (Jeong *et al.*, 2006).

Esto también es relevante, debido a que datos no publicados de nuestro laboratorio obtenidos mediante ChIP-seq en células kc167 las cuales tienen una expresión moderadamente alta de *yellow*, muestran picos de co-localización de diversas proteínas como dAdd1, Su(Hw), CP190 y Mod(mdg4) sobre la región promotora del gen *Abd-B*.

Lo cual estaría sugiriendo que dAdd1, dXNP y Mod(mdg4) también podrían regular la expresión de *Abd-B*, y de esta manera quizá también este contribuyendo a en la regulación en la expresión de *yellow* en los segmentos más posteriores del abdomen. Además, en los datos de ChIP-seq se ha observado picos de co-localización entre las proteínas dAdd1 y Mod(mdg4) sobre el enhancer *bab*, el cual es un gen que codifica para factores transcripcionales que actúan como represores de la deposición de melaninas en los segmentos más posteriores en el abdomen de hembras.

Aunado a lo anterior, *Abd-B* cuenta con dos sitios de unión directa muy bien caracterizados sobre el enhancer de cuerpo de *yellow* (Jeong *et al.*, 2006) y al revisar esa región en nuestros datos de ChIP-seq, se observó picos de co-localización de dAdd1, Mod(mdg4) y dCTCF justo en esos sitios. Lo anterior abre la posibilidad de que las proteínas, dAdd1, Mod(mdg4) y quizá dCTCF pudieran estar ayudando a dirigir a *Abd-B* sobre su secuencia blanco en el enhancer de cuerpo de *yellow* y de esta forma intervenir en su expresión, por lo que esto podría ser una cuarta posibilidad para tratar de explicar los fenotipos observados en las triples mutantes.

Todo lo anterior, sugiere tres posibilidades para tratar de explicar el fenotipo observado. 1) Que al disminuir la expresión de las proteínas dAdd1, dXNP y mod(mdg4) exista un aumento en la expresión de *y*. 2) Que exista una disminución en los niveles de expresión de *bab*. 3) Que se esté viendo afectado el reclutamiento de *Abd-B* sobre las regiones regulatorias de *y* y *bab*

Además, todo lo anterior también es apoyado por datos obtenidos mediante ensayos de doble híbrido, donde se ha encontrado que hay una interacción entre dXNP y Mod(Mdg4) (Datos no publicados), mientras que dXNP interactúa gracias a su amino-terminal con las 3 isoformas de dAdd1 (López-Falcón *et al.*, 2014). Esto indica la capacidad de estas 3 proteínas para interactuar y formar parte de complejos que estén regulando la expresión de ciertos genes.

## 8.- Conclusiones

- No encontró una interacción genética entre dAdd1, dXNP y CTCF utilizando los alelos *dxnp<sup>2</sup>/dxnp<sup>3</sup>*; *dAdd1<sup>2</sup>* y *dCTCF<sup>30</sup>*.
- Existe una interacción genética entre dAdd1, dXNP y Mod(mdg4).
- Las proteínas dAdd1 y dXNP son reguladores negativos de la actividad de bloqueo de enhancer mediada por el retrotransposón *Gypsy*, además de que participan en la misma vía.
- Aparentemente la isoforma larga dXNP es la que está involucrada junto a las proteínas dAdd1 en la regulación negativa de la actividad de bloque de enhancer generada por la presencia del retrotransposón *Gypsy*.
- Las proteínas dAdd1, dXNP y Mod(mdg4) están involucradas en el patrón de pigmentación que genera el dimorfismo sexual entre machos y hembras en *D. melanogaster*.

## 9.- Perspectivas

- Se propone realizar ensayos de pull-down entre Mod(mdg4) y dXNP para conocer exactamente los dominios de interacción entre ellas. Además de realizar ensayos de pull-down entre Mod(mdg4), dAdd1 y dXNP para determinar si estas proteínas pueden interactuar entre ellas, lo cual ayudaría a saber si pueden formar complejos entre ellas.
- Para verificar si dAdd1 y dXNP regulan una actividad de bloqueo de enhancer de *Gypsy* afectando la formación de loops de la cromatina se propone realizar un ensayo de 3C ya sea en células del disco de ala y en pupas respectivamente, para comprobar si se altera la interacción entre enhancer-promotor en el locus de *yellow* y *ct* en los organismos doble mutantes  $y^2w^1ct^6$ ;  $dAdd1^2/+$ ;  $Mod(mdg4)^{u1/+}$  y  $y^2w^1ct^6$ ;  $+/+$ ;  $Mod(mdg4)^{u1}/dxnp^2$ , así como en los individuos triple mutantes  $y^2w^1ct^6$ ;  $dAdd1^2/+$ ;  $Mod(mdg4)^{u1}/dxnp^2$ .
- Para poder tener un acercamiento sobre si dAdd1 puede reconocer a *Gypsy* y silenciarlo, se propone realizar ensayos de ChIP-qPCR para determinar si esta proteína es capaz de unirse a la secuencia de *Gypsy* en los alelos  $y^2$  y  $ct^6$ , además de que esto permitirá saber (si es el caso) en qué regiones específicamente se está uniendo dAdd1.
- Para determinar si las proteínas dAdd1, dXNP y Mod(mdg4) regulan la expresión de *Abd-B* es necesario verificar sus niveles de expresión por RT-qPCR y/o la cantidad de proteína por western blot en pupas de organismos doble mutantes  $y^2w^1ct^6$ ;  $dAdd1^2/+$ ;  $Mod(mdg4)^{u1/+}$  y  $y^2w^1ct^6$ ;  $+/+$ ;  $Mod(mdg4)^{u1}/dxnp^2$ , así como en los individuos triple mutantes  $y^2w^1ct^6$ ;  $dAdd1^2/+$ ;  $Mod(mdg4)^{u1}/dxnp^2$ .
- Para determinar si las proteínas dAdd1, dXNP y Mod(mdg4) pueden regular el reclutamiento de *Abd-B* sobre las regiones regulatorias de *y* y *bab*, se proponen realizar ensayos de ChIP-qPCR para averiguar si existe un cambio en los niveles de posicionamiento de *Abd-B*.
- Se sugiere generar individuos que sean homocigotos nulos para dAdd1 y heteroalélicas para dXNP en un fondo  $y^2$  y  $ct^6$ , para determinar si aparecen fenotipos en un fondo donde la actividad de bloqueo de enhancer no está sensibilizada.

## 10.- Referencias

- Ahmad K., Henikoff S. (2002). The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Mol. Cell.* 9(6): 1191-1200. doi: [10.1016/s1097-2765\(02\)00542-7](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00542-7)
- Alekseyenko AA., Gorchakov AA., Zee BM., Fuchs SM., Kharchenko PV., Kuroda MI. (2014). Heterochromatin associated interactions of Drosophila HP1a with dADD1, HIP1 and repetitive RNAs. *Genes Dev.* 28(13): 1445-1460. doi: [10.1101/gad.241950.114](https://doi.org/10.1101/gad.241950.114)
- Allis CD., Jenuwein T., Reinberg D., Caparros ML. (2007). Epigenetics, chapter 3: Overview and concepts. Chapter 10: Chromatin modifications and their mechanisms of action. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. 1<sup>st</sup> Ed.
- Andrews FH., Shinsky SA., Shanle EK., Bridgers JB., Gest A., Tsun IK., Krajewski K., Shi X., Strahl BD., Kutateladze T. (2016). The taf14 YEATS domain is a reader of histone crotonylation. *Nat. Chem. Biol.* 12(6): 396-398. doi: [10.1038/nchembio.2065](https://doi.org/10.1038/nchembio.2065)
- Aoki T., Sarkeshik A., Yates J., Schedl P. (2012). Elba, a novel developmentally regulated chromatin boundary factor is a hetero-trapartite DNA binding complex. *eLife*. 1: doi: [10.7554/eLife.00171](https://doi.org/10.7554/eLife.00171).
- Argentaro A., Yang JC., Chapman L., Kowalczyk MS., Gibbons RJ., Higgs DR., Neuhaus D., Rhodes D. (2007). Structural consequences of disease-causing mutations in the ATRX-DNMT3-DNMT3L (ADD domain of the chromatin-associated protein ATRX). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104(29): 11939-11944. doi: [10.1073/pnas.0704057104](https://doi.org/10.1073/pnas.0704057104)
- Armstrong J., Papoulas O., Daubresse G., Sperling AS., Lis JT., Scott MP., Tamkun JW. (2002). Drosophila BRM complex facilitates global transcription by RNA polymerase II. *EMBO J.* 21(19): 5245-5254. doi: [10.1093/emboj/cdf517](https://doi.org/10.1093/emboj/cdf517)
- Arnoult L., Su KFY., Manoel D., Minervino C., Magriña J., Gompel N., (2013). Emergence and diversification of fly pigmentation through evolution of a gene regulatory module. *Science* 339, 1423–1426. doi: [10.1126/science.1233749](https://doi.org/10.1126/science.1233749)
- Arzate-Mejía RG., Cerecedo-Castillo AJ., Guerrero G., Furlan-Magaril M., Recillas-Targa F. (2020). In situ dissection of domain boundaries affect genome topology and gene transcription in *Drosophila*. *Nat. Commun.* 11: 894. doi: [10.1038/s41467-020-14651-z](https://doi.org/10.1038/s41467-020-14651-z)
- Bartkuhn M., Straub T., Herold M., Herrmann M., Rathke C., Saumweber H., Gilfillan GD., Becker PB., Renkawitz R. (2009). Active promoters and insulators are marked by the centrosomal protein 190. *EMBO J.* 28(7): 877-888. doi: [10.1038/emboj.2009.34](https://doi.org/10.1038/emboj.2009.34)
- Barutcu AR., Lajoie BR., Fritz AJ., McCord RP., Nickerson JA., van Wijnen AJ., *et al.*, (2016). SMARCA4 regulates gene expression and higher-order structure in proliferating mammary epithelial cells. 26(9): 1188 – 1201. doi: [10.1101/gr.201624.115](https://doi.org/10.1101/gr.201624.115)
- Bassett AR., Cooper SE., Ragab A., Travers AA. (2008). The chromatin remodeling factor dATRX is involved in heterochromatin formation. *PLoS One.* 3(5): e2099. doi: [10.1371/journal.pone.0002099](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002099)
- Bassett A., Cooper S., Wu C., Travers A. (2009). The folding and unfolding of eukaryotic chromatin. *Curr. Op. Genet. And Dev.* 19(1): 159-165. doi: <https://doi.org/10.1016/j.gde.2009.02.010>
- Bell AC, Felsenfeld G. (2000). Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the igf2 gene. *Nature.* 405(1): 482-485. doi: [10.1038/35013100](https://doi.org/10.1038/35013100)

- Bender AM., Wells O., Fay DS. (2004). *lin-35/rb* and *xnp-1/ATR-X* function redundantly to control somatic gonad development in *C. elegans*. *Dev. Biol.* 273(2): 335-349. doi: [10.1016/j.ydbio.2004.06.009](https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.06.009)
- Bérubé NG., Healy J., Medina CF., Wu S., Hodgson T., Jagla M., Picketts DJ. (2008). Patient mutations alter ATRX targeting to PML nuclear bodies. *Eur. J. Hum. Genet.* 16(2): 192-201. doi: [10.1038/sj.ejhg.5201943](https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201943)
- Bérubé NG. (2011). ATRX in chromatin assembly and genome architecture during development and disease. *Biochem. Cell. Biol.* 89(5): 435-444. doi: [10.1139/o11-038](https://doi.org/10.1139/o11-038)
- Blochlinger K., Bodmer R., Jan LY., Jan YN. (1990). Patterns of expression of *cut*, a protein required for external sensory organ development in wild-type and *cut* mutant *Drosophila* embryos. *Genes Dev.* 4(8): 1322-1331. doi: [10.1101/gad.4.8.1322](https://doi.org/10.1101/gad.4.8.1322)
- 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(3): 423-346. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.07.052>
- Bookstein FL. (1991). *Morphometric tools for landmark data: geometry and biology*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Bookstein FL. (1997). Landmark for methods for forms without landmarks: Localizing group differences in outline shape. *Med. Image Anal.* 1(1): 225-243. doi: [https://doi.org/10.1016/S1361-8415\(97\)85012-8](https://doi.org/10.1016/S1361-8415(97)85012-8)
- Bosch-Prasegué L., Raurell-Vila H., Thackray JK., González J., Casal C., Kane-Goldsmith N., Visozo M., Brown JP., Gómez A., Ausió J., Zimmerman T., Esteller M., Schotta G., Singh PB., Serrano L., Vaquero A. (2017). Mammalian HP1 isoforms have specific roles in heterochromatin structure and organization. *Cell Rep.* 21(8): 2048-2057. doi: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.092>
- Brackley CA., Johnson J., Michieletto D., Morozov AN., Nicodemi N., Cook PR., Marenduzzo D. (2017). Nonequilibrium chromosome looping via molecular slip links. *Phys. Rev. Lett.* DOI: 10.1103/PhysRevLett.119.138101. doi: [10.1103/PhysRevLett.119.138101](https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.119.138101)
- Brehme KS. (1941). The effect of adult body color mutations upon the larva of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 23(1): 254-261. doi: [10.1073/pnas.27.6.254](https://doi.org/10.1073/pnas.27.6.254)
- Buchwalter A., Kaneshiro JM., Hetzer MW. (2019). Coaching from the sidelines: The nuclear periphery in genome regulation. *Nat. Rev. Genet.* 20(1): 39-50. doi: [10.1038/s41576-018-0063-5](https://doi.org/10.1038/s41576-018-0063-5)
- Bushey AM., Ramos E., Corces VG. (2009). Three subclasses of *Drosophila* insulator show distinct and cell type-specific genomic distributions. *Genes Dev.* 23(1): 1338-1350. doi: [10.1101/gad.1798209](https://doi.org/10.1101/gad.1798209)
- Cairns RB. (2009). The logic of chromatin architecture and remodelling at promoters. *Nature.* 461(7261): 193-198. doi: [10.1038/nature08450](https://doi.org/10.1038/nature08450)
- Canzio D., Chang EY., Shankar S., Kuchenbecker KM., Simon MD., Madhani HD., Narlikar GJ., Al-Sady B. (2011). Chromodomain mediated oligomerization of HP1 suggests a nucleosome-binding mechanism for heterochromatin assembly. *Mol. Cell.* 41(1): 67-81. doi: [10.1016/j.molcel.2010.12.016](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.12.016)
- Chávez J., Murillo-Maldonado JM., Bahena V., Cruz AK., Castañeda-Sortibrán A., Rodríguez-Arnaíz R., Zurita M., Valadez-Graham V. (2017). dAdd1 and dXNP prevent genome instability by maintaining HP1a localization at *Drosophila* telomeres. *Chromosoma.* 126(6): 697-712. doi: <https://doi.org/10.1007/s00412-017-0634-9>
- 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(7): e41374. doi: [10.1371/journal.pone.0041374](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041374)



Clapier CR., Cairns BR. (2009). The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu. Rev. Biochem.* 78(1): 273-304. doi: [10.1146/annurev.biochem.77.062706.153223](https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.062706.153223)

Clapier CR., Iwasa J., Cairns BR., Peterson CL. (2017). Mechanisms of action and regulation of ATP-dependent chromatin remodelling complexes. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 18(7): 407-422. doi: [10.1038/nrm.2017.26](https://doi.org/10.1038/nrm.2017.26)

Clynes D., Jelinska C., Xella B., Helena Ayyub., Scott C., Mitson M., Taylor S., Higgs DR., Gibbons RJ. (2015). Suppression of the alternative lengthening of telomere pathway by the chromatin remodeling factor ATRX. *Nat. Commun.* 6(1): 7538. doi: [10.1038/ncomms8538](https://doi.org/10.1038/ncomms8538)

Corona DF., Clapier CR., Becker PB., Tamkun JW. (2002). Modulation of ISWI functions by site-specific histone acetylation. *EMBO Rep.* 3(3): 242-247. doi: [10.1093/embo-reports/kvf056](https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvf056)

Cuartero S., Fresán U., Reina O., Planet E., Espinàs ML. (2014). Ibf1 and Ibf2 are novel CP190-interacting proteins required for insulator function. *EMBO J.* 33(6):637-647. doi: [10.1002/emboj.201386001](https://doi.org/10.1002/emboj.201386001)

Cubeñas-Potts C., Corces VG (2015) Architectural proteins, transcription and the three-dimensional organization of the genome. *FEBS Lett.* 589:2923-2930. doi: [10.1016/j.febslet.2015.05.025](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.05.025)

Cuddapah S., Jothi R., Schones DE., Roh TY., Cui K., Zhao K. (2009). Global analysis of the insulator binding protein CTCF in chromatin barrier regions reveals demarcation of active and repressive domains. *Genome Res.* 19(1): 24-32. doi: [10.1101/gr.082800.108](https://doi.org/10.1101/gr.082800.108)

Deng Y., Chang S. (2007). Role of telomeres and telomerase in genomic instability, senescence and cancer. *Laboratory Investigation.* 87(1): 1071-1076. doi: [10.1038/labinvest.3700673](https://doi.org/10.1038/labinvest.3700673)

Denslow SA., Wade PA. (2007). The human Mi-2/NuRD complex and gene regulation. *Oncogene.* 26(37): 5433-5438. doi: [10.1038/sj.onc.1210611](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210611)

Dhayalan A., Tamas R., Bock I., Tattermusch A., Dimitrova E., Kudithipudi S., Ragozin S., Jeltsch A. (2011). The ATRX-ADD domain binds to H3 tail peptides and reads the combined methylation state of K4 and K9. *Hum. Mol. Genet.* 20(11): 2195-2203. doi: [10.1093/hmg/ddr107](https://doi.org/10.1093/hmg/ddr107)

Dixon JR., Selvaraj S., Yue F., Kim A., Li Y., Shen Y., Hu M., Liu JS., Ren B. (2012). Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature.* 485(7398): 376-380. doi: [10.1038/nature11082](https://doi.org/10.1038/nature11082)

Downs JA., Allard S., Jobin-Robitaille O., Javaheri A., Auger A., Bouchard N., Kron SJ., Jackson SP., Côté J. (2004). Binding of chromatin-modifying activities to phosphorylated histone H2A at DNA damage sites. *Mol Cell.* 16(6): 979-990. doi: [10.1016/j.molcel.2004.12.003](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.12.003)

Duc C., Benoit M., Détourné G., Simon L., Poulet A., Jung M., Veluchamy A., Latrasse D., Le Goff S., Cotterell S., Tatout C., Benhamed M., Probst AV. (2017). Arabidopsis ATRX modulates H3.3 occupancy fine-tunes gene expression. *Plant Cell.* 29(7): 1773-1793. doi: [10.1105/tpc.16.00877](https://doi.org/10.1105/tpc.16.00877)

Elsässer SJ., Noh KM., Diaz N., Allis CD., Banaszynski LA. (2015). Histone H3.3 is required for endogenous retroviral element silencing in embryonic stem cells. *Nature.* 522(7555): 240-244. doi: [10.1038/nature14345](https://doi.org/10.1038/nature14345)

Espinàs ML., Jiménez-García E., Vaquero A., Canudas S., Bernués J., Azorín F. (1999). The N-terminal POZ of domain of GAGA mediates the formation of oligomers that bind DNA with high affinity and specificity. *J. Biol. Chem.* 274(23): 16461-16469. doi: [10.1074/jbc.274.23.16461](https://doi.org/10.1074/jbc.274.23.16461)

Farrelli LA., Thompson RE., Zhao S., Lepack AE., Lyu Y., Bhanu NV., *et al.*, (2019). Histone serotonylation is a permissive modification that enhances TFIID binding to H3K4me3. *Nature.* 567(1): 535 – 539. doi: <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1024-7>

Felsenfeld G., Groudine M. (2003). Controlling de double helix. *Nature*. 421(6921): 448-453. doi: [10.1038/nature01411](https://doi.org/10.1038/nature01411)

Field LH., Matheson T. (1998). Chordotonal organs of insects. *Advances in Insect Physiology*. 27(1): 1-228. doi: [https://doi.org/10.1016/S0065-2806\(08\)60013-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2806(08)60013-2)

Filippova GN., Fagarlie S., Klenova EM., Myers C., Dehner Y., Goodwin G., Neiman PE., Collins SJ., Lovanenkov VV. (1996). An exceptionally conserved transcriptional repressor, CTCF, employ different combinations of zinc fingers to bind diverged promoter sequences of avian and mammalian c-myc oncogenes. *Mol. Cell. Biol.* 16(1): 2802-2813. doi: [10.1128/mcb.16.6.2802](https://doi.org/10.1128/mcb.16.6.2802)

Fischle W., Wang F., Allis CD. (2003). Histone and chromatin cross-talk. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 15(2): 172-183. doi: [10.1016/s0955-0674\(03\)00013-9](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(03)00013-9)

<sup>1</sup>FlyBase (2018). [En línea] [Fecha de acceso: 1 de agosto de 2018]. Accesible en: <http://flybase.org/reports/FBgn0002781.html>.

<sup>2</sup>FlyBase (2019). [En línea] [Fecha de acceso: 29 de noviembre de 2019]. Accesible en: <https://flybase.org/reports/FBgn0004034>

Fradet-Turcotte A., Canny MD., Escribano-Diaz C., Orthwein A., Leung CCY., Huang H., Landry MC., Kitevsky-LeBlanc J., Noordermeer SM., Sicheri F., Durocher D. (2013). 53BP1 is a reader of the DNA-damage-induced H2A Lys 15 ubiquitin mark. *Nature*. 499(1): 50-54. doi: [10.1038/nature12318](https://doi.org/10.1038/nature12318)

Fraser J., Williamsom I., Bickmore WA., Dostie J. (2015). An overview of genome organization and how we got there: from FISH to Hi-C. *Microbiol. Biol. Mol. Rev.* 79(3): 347-372. doi: [10.1128/MMBR.00006-15](https://doi.org/10.1128/MMBR.00006-15)

Fudenberg G., Imakaev M., Lu C., Goloborodko A., Abdennur N., Mirny LA. (2016). Formation of chromosomal domains by loops extrusion. *Cell Rep.* 15(9): 2038-2049. doi: [10.1016/j.celrep.2016.04.085](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.04.085)

Furman DP., Bukharina TA. (2008). How *Drosophila melanogaster* forms its mechanoreceptors. *Curr. Genomics*. 9(5): 312-323. doi: [10.2174/138920208785133271](https://doi.org/10.2174/138920208785133271)

Fussner E., Strauss M., Djuric U., Li R., Ahmed K., Hart M., Ellis J., Bazett-Jones, D.P. (2012). Open and closed domains in the mouse genomes are configured as 10-nm chromatin fibres. *EMBO Rep.* 13(1): 992-996. doi: [10.1038/embor.2012.139](https://doi.org/10.1038/embor.2012.139)

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(1): 129-136. doi: [10.1534/genetics.118.301350](https://doi.org/10.1534/genetics.118.301350)

Gao JL., Fan YJ., Wang XY., Zhang Y., Pu J., Li L., Shao W., Zhan S., Hao J., Xu YZ. (2015). A conserved intronic U1 snRNP-binding sequence promotes trans-splicing in *Drosophila*. *Genes Dev.* 29(7):760-771. doi: [10.1101/gad.258863.115](https://doi.org/10.1101/gad.258863.115)

Garrick D., Sharpe JA., Arkell R., Dobbie L., Smith AJ., Wood WG., Higgs DR., Gibbons RJ. (2006). Loss of Atrx affects thophoblast development and the pattern of X-inactivation in extraembryonic tissues. *PLoS Genet.* 2(4): e58. doi: [10.1371/journal.pgen.0020058](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020058)

GeneCards (2018). [En línea] [Fecha de acceso: 27 de julio de 2018]. Accesible en: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ATRX#proteins>.

Gerasimova TI., Gdula DA., Gerasimov DV., Simonova O., Corces VG. (1995). A *Drosophila* protein that imparts directionality on a chromatin insulator is an enhancer of position.effect variegation. *Cell*. 82(4): 587-597. doi: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90031-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90031-4)

Gerasimova TI., Corces VG. (1998). Polycomb and trithorax group proteins mediate the function of a chromatin insulator. *Cell*. 92(4): 511-521. doi: [10.1016/s0092-8674\(00\)80944-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80944-7)

Gerasimova TI., Lei EP., Bushey AM., Corces VG. (2007). Coordinated control of dCTCF and gypsy chromatin insulators in *Drosophila*. *Mol. Cell*. 28(5): 761-772. doi: [10.1016/j.molcel.2007.09.024](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.09.024)

Gibbons RJ., Picketts DJ., Villard L., Higgs DR. (1995). Mutations in a putative global transcriptional regulator cause X-linked mental retardation with  $\alpha$ -thalassemia (ATR-X syndrome). *Cell*. 80(6): 837-845. doi: [10.1016/0092-8674\(95\)90287-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90287-2)

Gibbons RJ., Bachoo S., Picketts DJ., Aftimos S., Asenbauer B., Bergoffen J., Berry SA., Dahl N., Fryer A., Keppler K., Kurosawa K., Levin ML., Masuno M., Neri G., Pierpont ME., Slaney SF., Higgs DR. (1997). Mutations in transcriptional regulator ATRX establish the functional significance of PHD-like domain. *Nat. Genet.* 2(1): 146-14. doi: [10.1038/ng1097-146](https://doi.org/10.1038/ng1097-146)

Gibbons RJ. (2006). Alpha thalassaemia-mental retardation, X linked. *Orphanet J. Rare Dis.* 1:15. doi: [10.1186/1750-1172-1-15](https://doi.org/10.1186/1750-1172-1-15)

Goldberg AD., Banaszynski LA., Noh KM., Lewis PW., Elsaesser SJ., Stadler S., Dewell S., Law M., Guo X., Li X., Wen D., Chappier A., DeKolver RC., Miller JC., Lee YL., Boydston EA., Holmes MC., Gregory PD., Greally JM., Rafii S., Yang C., Scambler PJ., Garrick D., Gibbons RJ., Higgs DR., Cristea IM., Urnov FD., Zheng D., Allis CD. (2010). Distinct factors control histone variant H3.3 localization at specific genomic regions. *Cell*; 140(5): 678-691. doi: [10.1016/j.cell.2010.01.003](https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.003)

Golovnin A., Mazur A., Kopantseva M., Kurshakova M., Gulak PV., Gilmore B., Whitfield WGF., Geyer P., Pirrotta V., Georgiev P. (2007). Integrity of the Mod(mdg4)-67.2 domains is critical to insulation function in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell Biol.* 27(1): 963-974. doi: [10.1128/MCB.00795-06](https://doi.org/10.1128/MCB.00795-06)

Gómez-Díaz E, Corces VG. (2014). Architectural proteins: Regulators of 3D genome organization in cell fate. *Trends Cell Biol.* 24(11): 703-711. doi: [10.1016/j.tcb.2014.08.003](https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.08.003)

González-Marín A., Morando M., Javier-Avila L. (2016). Morfología lineal y geométrica en un grupo de lagartijas patagónicas del género *Phymaturus* (Squamata: Liolaemini). *Rev. Mex. Biodiv.* 87(2): 399-408.

Guo Y., Livne-Barr I., Zhou L., Boulianne GL. (1999). *Drosophila* presenilin is required for neuronal differentiation and affects notch subcellular localization and signaling. *J. Neurosci.* 19(19): 8435- 8442. doi: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-19-08435.1999>

Hark AT., Schoenherr CJ., Katz DJ., Ingram RS., Levorse JM., Tilghman SM. (2000). CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the *H19/Igf2* locus. *Nature.* 405(6785): 486-489. doi: [10.1038/35013106](https://doi.org/10.1038/35013106)

He Q., Kim H., Huang R., Lu W., Tang M., Shi F., Yang D., Zhang X., Huang J., Liu D., Songyang Z. (2015). The Daxx/Atrx complex protects tandem repetitive elements during DNA hypomethylation by promoting H3K9 trimethylation. *Cell Stem Cell.* 17(3): 273-286. doi: [10.1016/j.stem.2015.07.022](https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.07.022)

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. USA.* 109(43): 17503-17512. doi: [10.1073/pnas.1111941109](https://doi.org/10.1073/pnas.1111941109)

Hirschhorn JN., Brown SA., Clark CD., Winston F. (1992). Evidence that SFN2/SWI2 and SFN5 active transcription in yeast by altering chromatin structure. *Genes Dev.* 6(12):2288-2298. doi: [10.1101/gad.6.12a.2288](https://doi.org/10.1101/gad.6.12a.2288)

Ibarra-Morales DA. (2014). Atrx durante el Desarrollo embrionario temprano de pez cebra. (Tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, México. 74 Pp.

- lizuka M., Smith MM. (2003). Functional consequences of histone modifications. *Curr. Op. Genet. And Dev.* 13(1): 154-160. doi: [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(03\)00020-0](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(03)00020-0)
- Jack J., Dorsett D., Delotto Y., Liu S. (1991). Expression of the cut locus in the Drosophila wing margin is required for cell type specification and its regulated by a distant enhancer. *Development.*113(3): 735-747. doi:
- Jenuwein T., Allis CD. (2001). Translating the histone code. *Science.* 293(5532): 1074-1080. doi: [10.1126/science.1063127](https://doi.org/10.1126/science.1063127)
- Jeong S., Rokas A., Carroll SB. (2006). Regulation of body pigmentation by the Abdominal-B Hox protein and its gain and loss in Drosophila evolution. *Cell.* 125(7): 1387-1399. doi: [10.1016/j.cell.2006.04.043](https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.04.043)
- Juhász S., Elbakry A., Mathes A., Löbrich M. (2018). ATRX promotes DNA repair synthesis and sister chromatid exchange during homologous recombination. *Mol. Cell.* 71(1): 11-24. doi: [10.1016/j.molcel.2018.05.014](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.05.014)
- Klenova EM., Nicolas RH., Paterson HF., Carne AF., Heath CM., Goodwin GH., Neiman PE., Lobanekov VV. (1993). CTCF, a conserved nuclear factor required for optimal transcription activity of the chicken c-myc gene is an 11-Zn-finger protein differentially expressed in multiple forms. *Mol. Cell Biol.* 13(12): 7612-7624. doi: [10.1128/mcb.13.12.7612](https://doi.org/10.1128/mcb.13.12.7612)
- Klingenberg CP., Monteiro LR. (2005). Distances and directions in multidimensional shape spaces: implications for morphometric applications. *Syst. Biol.* 54(4): 678-688. doi: [10.1080/10635150590947258](https://doi.org/10.1080/10635150590947258)
- Klingenberg CP. (2010). Evolution and development of shape: Integrating quantitative approaches. *Nat. Rev.*11(1): 623-635. doi: <https://doi.org/10.1038/nrg2829>
- Klingenberg CP. (2011). MorphoJ: An integrated software package for geometric morphometrics. *Mol. Ecol. Resour.* 11(2): 353-357. doi: [10.1111/j.1755-0998.2010.02924.x](https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02924.x)
- [Klingenberg CP. \(2013\). Cranial intergation and modularity: Insights into evolution and development from morphometric data. \*Hystrix It. J. Mamm.\* 24\(1\): 43-58. doi: <https://doi.org/10.4404/hystrix-24.1-6367>](https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02924.x)
- Krupp JJ., Yaich LE., Wessells RJ., Bodmer R. (2005). Identification of genetic loci that interact with *cut* during *Drosophila* wing.margin development. *Genetics.* 170(4): 1775-1795. doi: [10.1534/genetics.105.043125](https://doi.org/10.1534/genetics.105.043125)
- Kwon SY., Grisan V., Jang B., Herbert J., Badenhorst P. (2016). Genome-wide mapping targets of the metazoan chromatin remodeling factor NURF reveals nucleosome remodeling at enhancers, core promoters and gene insulators. *PLoS Genet.* 12(4): e1005969. doi: [10.1371/journal.pgen.1005969](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005969)
- Längst G., Bonte EJ., Corona DF., Pecker pb. (1999). Nucleosome movement by CHRAC and ISWI without disruption of trans-displacement of the histone octamer. *Cell.* 97(7): 843-852. doi: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80797-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80797-7)
- Lewis PW., Elsaesser J., Noh KM., Stadler SC., Allis D. (2010). DAXX is an H3.3-specific histone chaperone and cooperates with ATRX in replication-independent chromatin assembly at telomeres. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107(32): 14075-14080. doi: [10.1073/pnas.1008850107](https://doi.org/10.1073/pnas.1008850107)
- López-Falcón B., Meyer-Nava S., Hernández-Rodríguez B, Campos A., Montero D., Rudiño E., Vázquez M., Zurita M., Valadez-Graham V. (2014). Characterization of the *Drosophila* group ortholog to the amino-terminus 6of the alpha-thalassemia and mental retardation x-linked (ATRX) vertebrate protein. *PLoS ONE.* 9(12):e113182. doi:
- Li B., Carey., Workman JL. (2007). The role of chromatin during transcription. *Cell.* 128(4): 707-719. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.015>

López-Falcón B., Meyer-Nava S., Hernández-Rodríguez B, Campos A., Montero D., Rudiño E., Vázquez M., Zurita M., Valadez-Graham V. (2014). Characterization of the *Drosophila* group ortholog to the amino-terminus of the alpha-thalassemia and mental retardation x-linked (ATRX) vertebrate protein. *PLoS ONE*. 9(12):e113182. doi: [10.1371/journal.pone.0113182](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113182)

López-Galán A. (2015). Morfometría geométrica: El estudio de la forma y su aplicación en la biología. *Temas de ciencia y tecnología*. 19(55): 53 – 59.

Lorch Y., Zhang M., Kornberg RD. (1999). Histone octamer transfer by a chromatin-remodeling complex. *Cell*. 96(3): 389-392. doi: [10.1016/s0092-8674\(00\)80551-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80551-6)

Lovejoy CA., Takai K., Huh MS., Picketts DJ., de Lange T. (2020). ATRX affects the repair of telomeric DSBs by promoting cohesion and DAXX-dependent activity. *PLoS Biol*. 18(1): e3000594. doi: [10.1371/journal.pbio.3000594](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000594)

Magaña-Acosta M., Valadez-Graham V. (2020). Chromatin remodelers in the 3D nuclear compartment. *Front. Genet*. 11:600615. doi: [10.3389/fgene.2020.600615](https://doi.org/10.3389/fgene.2020.600615)

Maksimenko O., Georgiev P. (2014). Mechanisms and proteins involved in long-distance interactions. *Front. Genet*. 5(1): 8. doi: [10.3389/fgene.2014.00028](https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00028).

Maksimenko O., Bartkuhn M., Stakhov V., Herold M., Zolotarev N., Jox T., Buxa MK., Kirsch R., Bonchuk A., Fedotova A., Kyrchanova O., Renkawitz R., Gerogiev P. (2015). Two new insulator proteins, Pita and ZIPIC, target CP190 to chromatin. *Genome Res*. 25(1): 89-99. doi: [10.1101/gr.174169.114](https://doi.org/10.1101/gr.174169.114)

Marmorstein R., Zhou MM. (2014). Writers and readers of histone acetylation: structure, mechanism, and inhibition. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*. 6(7): a018762. doi: [10.1101/cshperspect.a018762](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018762)

Massey JH., Wittkopp PJ. (2016). The genetic basis of pigmentation differences within and between *Drosophila* species. *Curr. Top. Dev. Biol*. 119(1): 27-61. doi: [10.1016/bs.ctdb.2016.03.004](https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.03.004)

Massey JH., Chung D., Siwanowicz I., Stern DL., Wittkopp P. (2019). The *yellow* gene influences *Drosophila* male mating success through sex comb melanization. *eLife*. 8(1): e49388. doi: [10.7554/eLife.49388](https://doi.org/10.7554/eLife.49388)

Matzat LH., Dale RK., Moshkovich N., Lei EP. (2012). Tissue-specific regulation of chromatin insulator function. *PLoS Genet*. 8(11): e1003069. doi: [10.1371/journal.pgen.1003069](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003069)

McGinty RK., Tan S. (2015). Nucleosome structure and function. *Chem. Rev*. 115(6): 2255-2273. doi: [10.1021/cr500373h](https://doi.org/10.1021/cr500373h)

Melnick A., Ahmad KF., Arai S., Polinger A., Ball H., Borden KL., Carlile GW., Prive GG., Licht JD. (2000). In-depth mutational analysis of the promyelocytic leukemia zinc finger BTB/POZ domain reveals motifs and residues required for biological and transcriptional factors. *Mol. Cell. Biol*. 20(17): 6550-6567. doi: [10.1128/mcb.20.17.6550-6567.2000](https://doi.org/10.1128/mcb.20.17.6550-6567.2000)

Melnikova L., Kostyuchenko M., Molodina V., Parshikov A., Georgiev P., Golovnin A. (2017). Multiple interactions are involved in a high specific association of the Mod(Mdg4)-67.2 isoform with the Su(Hw) sites in *Drosophila*. *Open Biol*. 7(10): 170150. doi: [10.1098/rsob.170150](https://doi.org/10.1098/rsob.170150)

Melnikova L., Molodina V., Erokhim M., Georgiev P., Golovnin A. (2019). HIPP1 stabilizes the interaction between CP190 and Su(Hw) in the *Drosophila* insulator complex. *Scientific Reports*. 9(1): 19102. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55617-6>

- Merritt, DJ. (1997). Transformation of external sensilla to chordotonal sensilla in the cut mutant of *Drosophila* assessed by single-cell marking in the embryo and larva. doi: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19971215\)39:6<492::AID-JEMT4>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19971215)39:6<492::AID-JEMT4>3.0.CO;2-G)
- Meyer-Nava S., Torres A., Zurita M., Valadez-Graham V. (2020). Molecular effects of dADD1 misexpression in chromatin organization and transcription. *BMC. Mol. and Cell Biol.* 21(1):17 doi: <https://doi.org/10.1186/s12860-020-00257-2>.
- Michelli CA., Rulifson EJ., Blair SS. (1997). The function and regulation of *cut* expression on the wing margin of *Drosophila*: Notch, Wingless and a dominant negative role for Delta and Serrate. *Development.* 124(8): 1485-1495.
- Misulovin Z., Schwartz YB., Li XY., Kahn TG., Gause M., MacArthur S., Fay JC., Eisen MB., Pirrotta V., Biggin MD., Dorsett D. (2008). Association of cohesin and Nipped-B with transcriptionally active regions of the *Drosophila melanogaster* genome. *Chromosoma.* 117(1): 89-102. doi: [10.1007/s00412-007-0129-1](https://doi.org/10.1007/s00412-007-0129-1)
- Moon H., Filippova G., Loukinov D., Pugacheva E., Chen Q., Smith ST., Munhall A., Grewe B., Bartkuhn M., Arnold R., Burke LJ., Renkawitz-Pohl R., Ohlsson R., Zhou J., Renkawitz R., Lobanenkov V. (2005). CTCF is conserved from *Drosophila* to humans and confers enhancer blocking of the Fab-8 insulator. *EMBO. Rep.* 6(2): 165-170. doi: [10.1038/sj.embor.7400334](https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400334)
- Narendra V., Bulajić M., Dekker J., Mazzone EO., Reinberg D., (2016). CTCF-mediated topological boundaries during development Foster appropriate gene regulation. *Genes Dev.* 30(24): 2657-2662. doi: [10.1101/gad.288324.116](https://doi.org/10.1101/gad.288324.116)
- NCBI (2018). [En línea] [Fecha de acceso: 16 de julio de 2018]. Accesible en: [https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg38&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chrX%3A77504877-77786268&hgid=683736401\\_XaXCjaszflgShZqqIKfJ0410amb1](https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg38&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chrX%3A77504877-77786268&hgid=683736401_XaXCjaszflgShZqqIKfJ0410amb1).
- Nishino Y., Eltsov M., Joti Y., Ito K., Takata H., Takahashi Y., Hihara S., Frangakis AS., Imamoto AS., Ishikawa T., Maeshima K. (2012). Human mitotic chromosomes consist predominantly of irregularly folded nucleosome fibres without a 30-nm chromatin structure. *EMBO J.* 31(1): 1644-1653. doi: [10.1038/emboj.2012.35](https://doi.org/10.1038/emboj.2012.35)
- OMIM (2018). [En línea] [Fecha de acceso: 16 de julio de 2018]. Accesible en: <https://www.omim.org/entry/300032>.
- Ong CT., Corces VG. (2014). CTCF an architectural protein bridging genome topology and function. *Nat. Rev. Genet.* 15(4): 234-246. doi: [10.1038/nrg3663](https://doi.org/10.1038/nrg3663)
- Park DJ., Pask AJ., Huynh K., Renfree MB., Harley VR., Marshall-Graves JA. (2004). Comparative analysis of ATRX, a chromatin remodeling protein. *Gene.* 339(1): 39-48. doi: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.06.025>
- Park DJ., Pask AJ., Huynh K., Harley VR., Renfree MB., Graves JAM. (2005). Characterisation of the marsupial-specific ATRY gene: Implications for the evolution of male-specific function. *Gene.* 362(1): 29-36. doi: [10.1016/j.gene.2005.08.003](https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.08.003)
- Pérez SI. (2003). Morfometría de poblaciones humanas prehistóricas, una comparación de técnicas tradicionales y geométricas. *Intersecciones en antropología.* 4(1): 121-129.
- Picketts DJ., Tastan AO., Higgs DR., Gibbons RJ. (1998). Comparison of the human and murine ATRX gene identifies highly conserved functionally important domains. *Mamm. Genome.* 9(5): 400-403. doi: <https://doi.org/10.1007/s003359900781>

- Pombo A., Dillon N. (2015). Three-dimensional genome architecture: players and mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 16(4): 245-257. doi: [10.1038/nrm3965](https://doi.org/10.1038/nrm3965)
- Prieto E.I., Maeshima K. (2019). Dynamic chromatin organization in the cell. *Essays Biochem.* 63(1): 133-145. doi: [10.1042/EBC20180054](https://doi.org/10.1042/EBC20180054)
- Rao SS., Huntley MH., Durand NC., Stamenova EK., Bochkov ID., Robinson TJ., Sanborn AL., Machol I., Omer AD., Lander ES., Aiden EL. (2014). A 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping. *Cell.* 159(7): 1665-1680. doi: [10.1016/j.cell.2014.11.021](https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.021)
- Ricci MA., Manzo C., García-Parajo MF., Lakadamyali M., Cosma MP. (2015). Chromatin fibers are formed by heterogeneous groups of nucleosomes in vivo. *Cell.* 160(6): 1145-1158. doi: [10.1016/j.cell.2015.01.054](https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.054)
- Rowley, MJ., Corces VG. (2018). Organizational principles of 3D genome architecture. *Nat. Rev. Genet.* 19(1): 789-800. doi: <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0060-8>
- Sadic D., Schmidt K., Groh S., Kondofersky I., Ellwart J., Fuchs C., Theis FJ., Schotta G. (2015). Atrx promotes heterochromatin formation at retrotransposons. *EMBO Rep.* 16(7): 836-850. doi: [10.15252/embr.201439937](https://doi.org/10.15252/embr.201439937)
- Saha A., Wittmeyer J., Cairns BR. (2006). Chromatin remodeling: The industrial revolution of DNA and histones. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7(6): 437-447. doi: [10.1038/nrm1945](https://doi.org/10.1038/nrm1945)
- Savitsky M., Kim M., Kravchuk O., Schwartz YB. (2016). Distinct roles of chromatin insulator proteins in control of the *Drosophila* bithorax complex. *Genetics.* 202(2): 601-617. doi: [10.1534/genetics.115.179309](https://doi.org/10.1534/genetics.115.179309)
- Simpson P., Marcellini S. (2006). The origin and evolution of stereotyped patterns of macrochaetes on the nota of cyclorhaphous Diptera. *Heredity.* 97(3): 148-156. doi: [10.1038/sj.hdy.6800874](https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800874)
- Schneiderman JI., Sakai A., Goldstein S., Ahmad K. (2009). The XNP remodeler targets dynamic chromatin in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106(34): 14472-14477. doi: [10.1073/pnas.0905816106](https://doi.org/10.1073/pnas.0905816106)
- Stacey S.N., Lansman R.A., Brock H.W., Grigliatti T.A. (1986). Distribution and conservation of mobile elements in the genus *Drosophila*. *Mol. Biol. Evol.* 3(6): 522-534. doi: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040413>
- Stigler J., Camdere GÖ., Koshland DE., Greene EC. (2016). A single-molecule imaging reveals a collapsed conformational state for DNA-bound cohesin. *Cell Rep.* 15(5): 988-998. doi: [10.1016/j.celrep.2016.04.003](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.04.003)
- Stogios PG., Downs GS., Jauhal JS., Nandra SK., Prive GG. (2005). Sequence and structural analysis of BTB domain proteins. *Genome Biol.* 6(10): R82. doi: [10.1186/gb-2005-6-10-r82](https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-10-r82)
- Suganuma T., Workman J.L. (2011). Signals and combinatorial functions of histone modifications. *Ann. Rev. Biochem.* 80(1): 473-499. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061809-175347>
- Terakawa T., Bisht S., Eeftens JM., Dekker C., Haering CH., Greene EC. (2017). The condensin complex is a mechanochemical motor that translocates along DNA. *Science.* 358(6363): 672-676. doi: [10.1126/science.aan6516](https://doi.org/10.1126/science.aan6516)
- True, JR. (2003). Insect melanism: The molecules matter. *Trend. Ecol. Evol.* 18(1): 640-647. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tree.2003.09.006>
- Torcida S., Pérez SI (2015). Análisis de Procrustes y el estudio de la variación morfológica. *Revista Argentina de Antropología Biológica.* 14(1): 131-141.

- Tsai SY., Chang YL., Swamy KB., Chiang RL., Huang DH. (2016). GAGA factor, a positive regulator of global gene expression modulates transcriptional pausing and organization of upstream nucleosomes. *Epigenetics Chromatin*. 9(1): 32 doi: 10.1186/s13072-016-0082-4. doi: [10.1186/s13072-016-0082-4](https://doi.org/10.1186/s13072-016-0082-4)
- Tsukuda T., Fleming AB., Nickoloff JA., Osley MA. (2005). Chromatin remodelling at a DNA double-strand break site in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*. 438(7066): 379-383. doi: [10.1038/nature04148](https://doi.org/10.1038/nature04148)
- Udugama M., Chang FTM., Chan FL., Tang MC., Pickett HA., McGhie JDR., Mayne L., Collas P., Mann JR., Wong LH. (2015). Histone variant H3.3 provides the heterochromatic H3 lysine 9 tri-methylation mark at telomeres. *Nucleic Acids Res*. 43(21): 10227-10237. doi: [10.1093/nar/gkv847](https://doi.org/10.1093/nar/gkv847)
- Valadez-Graham V., Yoshioka Y., Velázquez O., Kawamori A., Vázquez M., Neumann A., Yamaguchi M., Zurita M. (2012). XNP/dATRX interacts with DREF in the chromatin to regulate gene expression. *Nucleic Acids Res*. 40(4): 1460-1474. doi: [10.1093/nar/gkr865](https://doi.org/10.1093/nar/gkr865)
- Valle-García D., Qadeer ZA., McHugh DS., Ghiraldini FG., Chowdhury AH., Hasson D., Dyer MA., Recillas-Targa F., Bernstein E. (2016). ATRX binds to atypical chromatin domains at the 3' exons of zinc finger genes to preserve H3K9me3 enrichment. *Epigenetics*. 11(6): 389-314. doi: [10.1080/15592294.2016.1169351](https://doi.org/10.1080/15592294.2016.1169351)
- Van Bortle K., Corces V.G. (2012). Nuclear organization and genome function. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol*. 28(1):163-187. doi: [10.1146/annurev-cellbio-101011-155824](https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101011-155824)
- Van Bortle K., Nichols MH., Li L., Ong CT., Takenaka N., Qin ZS., Corces VG. (2014). Insulator function and topological domain border strength scale with architectural protein occupancy. *Genome Biol*. 15(5): R82. doi: <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-5-r82>
- Vogelmann J., Le Gall A., Dejardin S., Allemand F., Gamot A., Labesse G., Cuvier O., Nègre N., Cohen-Gonsaud EM., Nöllmann M. (2014). Chromatin insulator factors involved in long-range DNA interactions and their role in the folding of the *Drosophila* genome. *PLoS Genet*. 10(8): e1004544. doi: [10.1371/journal.pgen.1004544](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004544)
- Wade PA., Geggion A., Jones PL., Ballestar E., Aubry F., Wolffe AP. (1999). Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nat. Genet*. 23(1): 62-66. doi: [10.1038/12664](https://doi.org/10.1038/12664)
- Walter MF., Zeineh LL., Black BC., Mclvor WE., Wright TR., Biessmann H. (1996). Catecholamine metabolism and in vitro induction of premature cuticle melanization in wild type and pigmentation mutants of *Drosophila melanogaster*. *Arch. Insect. Biochem. Physiol*. 31(2): 219-233. doi: [10.1002/\(SICI\)1520-6327\(1996\)31:2<219::AID-ARCH9>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6327(1996)31:2<219::AID-ARCH9>3.0.CO;2-U)
- Whitehouse I., Flaus A., Cairns BR., White MF., Workman JL., Owen-Hughes T. (1999). Nucleosome mobilization catalysed by the yeast SWI/SNF complex. *Nature*. 400(6746): 784-787. doi: [10.1038/23506](https://doi.org/10.1038/23506)
- Widom J. (1998). Chromatin structure: Linking structure to function with histone H1. *Curr. Biol*. 8(22): R788-791. doi: [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(07\)00500-3](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(07)00500-3)
- Wittkopp PJ., Carroll SB., Kopp A. (2003). Evolution in black and white: genetic control of pigment patterns in *Drosophila*. *Trends. Genet*. 19(9): 495-504. doi: [10.1016/S0168-9525\(03\)00194-X](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(03)00194-X)
- Wittkopp PJ., Stewart EE., Arnold LL., Neidert AH., Haerum BK., Thompson EM. Akhras S., Smith-Winberry G., Shefner L. (2009). Intraspecific polymorphism to interspecific divergence: Genetics of pigmentation in *Drosophila*. *Science*. 326(5952): 540-544. doi: [10.1126/science.1176980](https://doi.org/10.1126/science.1176980)
- Workman JL., Kingston RE. (1998). Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu. Rev. Biochem*. 67(1): 445-479. doi: [10.1146/annurev.biochem.67.1.545](https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.545)
- Zhan S., Guo Q., Li M., Li M., Li J., Miao X., Huang Y. (2010). Disruption of N-acetyltransferase gene in a silkworm reveals a novel role in pigmentation. *Development*. 137(23): 4083-4090. doi: [10.1242/dev.053678](https://doi.org/10.1242/dev.053678)



Zhang SX., Guo Y., Boulianne GL. (2001). Identification of a novel family of putative methyltransferases that interact with human and *Drosophila* presenilins. *Gene*. 280(1): 135-144. doi: [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(01\)00770-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(01)00770-3)

Zhou W., Zhu P., Wang J., Pascual G., Ohgi K., Lozach J., Glass CK., Rosenfeld MG. (2008). Histone H2A monoubiquitination represses transcription by inhibiting RNA polymerase II transcriptional elongation. *Mol. Cell*. 29(1): 69-80. doi: [10.1016/j.molcel.2007.11.002](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.11.002)

## Anexo 1.- Alelos mutantes utilizados para los ensayos de interacción genética

En esta sección se hace una descripción de los alelos mutantes utilizados en este trabajo para los ensayos de interacción genética.

A continuación, se muestra una representación de los alelos mutantes (sin escala) correspondientes a *dAdd1*, *dxnp*, *dCTCF* y *Mod(mdg4)*. Estos alelos fueron construidos mediante la inserción de elementos transponibles ya sea cerca del sitio de inicio de transcripción, en las regiones UTR o dentro de exones.

En la figura A1.1 se muestra los alelos descritos para *dxnp*, en ella se observa que está alelo *dxnp*<sup>1</sup> el cual nulo, ya que en él se eliminó totalmente la secuencia de *dxnp*. Adicionalmente en este alelo se eliminó completamente las secuencias de dos genes adyacentes los cuales son *Med28* y *CG4553* y se generó una deleción del extremo 5' del gen *VPS33B*.

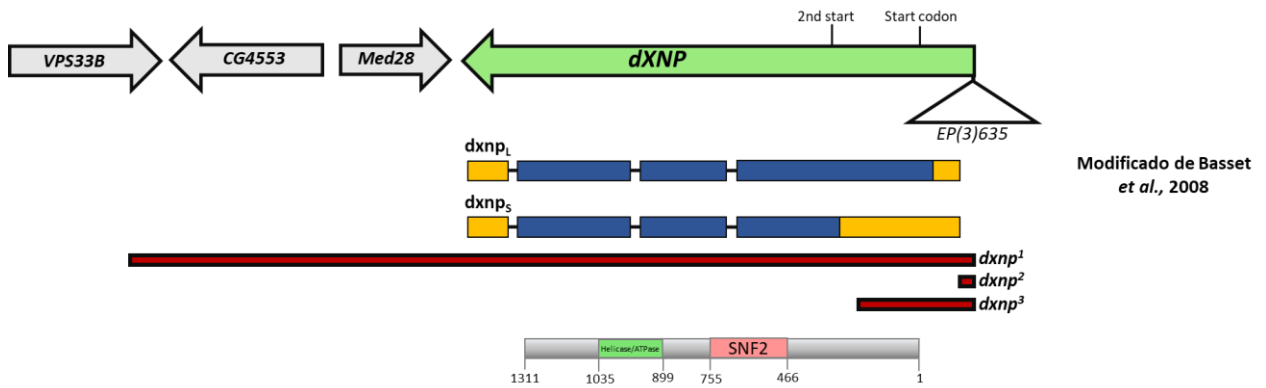
El segundo alelo conocido como *dxnp*<sup>2</sup> posee una deleción de la región promotora la cual afecta a ambas isoformas de *dxnp*, generando un alelo nulo y, por último, el tercer alelo es *dxnp*<sup>3</sup> el cual posee una deleción de la región que contiene el primer codón de inicio, por lo que este alelo sólo afecta a la isoforma larga de la proteína ya que permanece intacta la región que codifica para la isoforma corta.

En la figura A1.2 se muestran los alelos descritos para *dAdd1* originalmente reportados en el trabajo de Alekseyenko *et al.*, 2014. Estos alelos fueron construidos mediante la inserción del retrotransposón *P{GawB}cg8290*<sup>NP0793</sup> en la posición +68 del sitio de inicio de transcripción de *dAdd1*.

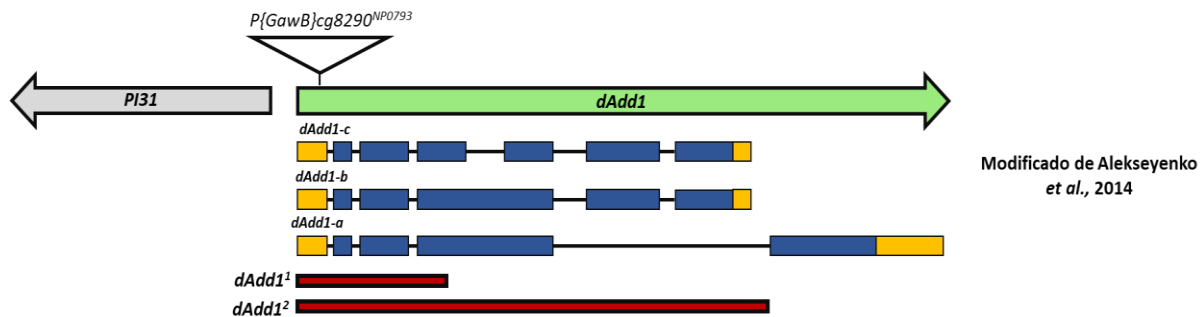
El primer alelo es conocido como *dAdd1*<sup>1</sup> el cual cuenta con una deleción que va del 5' UTR (amarillo) hasta el tercer exón, lo que genera una proteína que carece del extremo N-terminal incluyendo el dominio ADD. El segundo alelo denominado *dAdd1*<sup>2</sup> contiene una deleción que va desde el 5' UTR hasta el exón 7 lo cual genera una proteína trunca que es dirigida a degradación vía proteasoma por lo cual este alelo se considera como nulo para *dAdd1*.

Por otro lado, en la figura A1.3 se presenta el alelo *dCTCF*<sup>30</sup>, el cual fue construido mediante la inserción del retrotransposón *P{EPgy2}* a +26 pb después del sitio de inicio de transcripción de *dCTCF*, donde posteriormente se hizo una escisión del extremo 5' del retrotransposón (rojo), pero conservando 4680 pb que quedó insertada dentro de *dCTCF*.

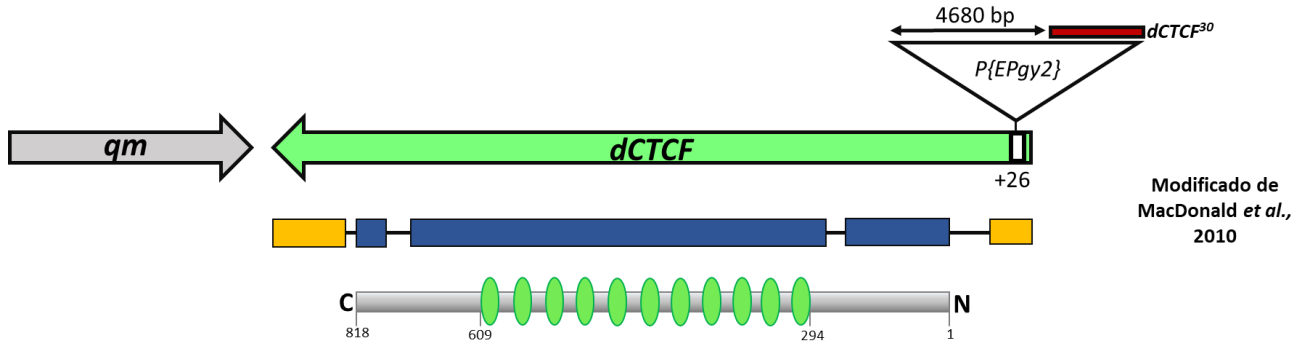
Por último, en la figura A1.4 se muestra el alelo *Mod(mdg4)*<sup>u1</sup>, que se generó mediante la inserción de un retrotransposón *P{EPgy2}* en el último exón, lo cual genera una proteína trunca que carece de dos dominios localizados en el extremo C-terminal conocidos como FLYWCH y el dominio de unión de Su(Hw).



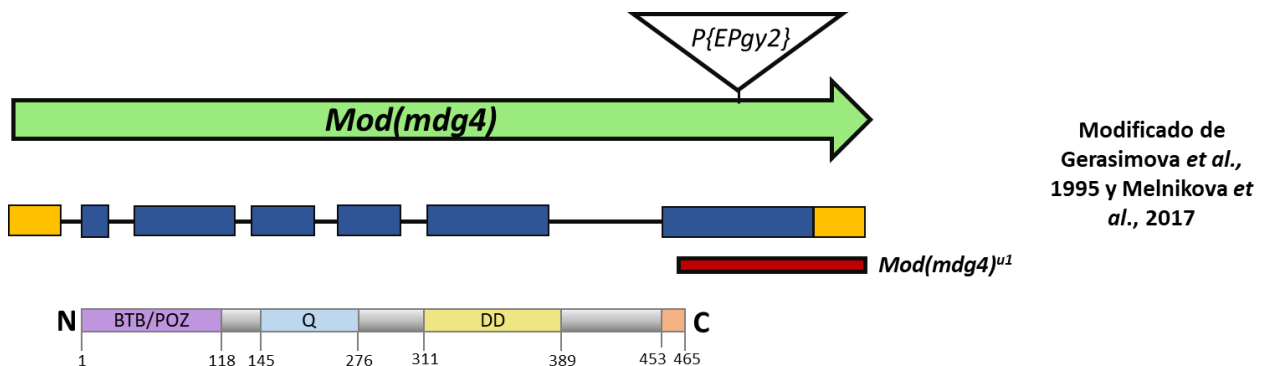
**Figura A1.1:** Alelos mutantes para *dXNP* (modificado de Bassett *et al.*, 2008). Los genes están representados en forma de flechas que indican su dirección en la transcripción. En el nivel inferior, se muestra la secuencia transcrita; UTRs (cajas amarillas) y exones (cajas azules). Las barras rojas indican el tamaño de la deleción que genera cada alelo y finalmente se presenta un diagrama de la proteína que muestra sus dominios característicos.



**Figura A1.2:** Alelos mutantes para *dAdd1* (modificado de Alekseyenko *et al.*, 2014). Los genes están representados en forma de flechas que indican su dirección en la transcripción. En el nivel inferior, se muestra la secuencia transcrita; UTRs (cajas amarillas) y exones (cajas azules). Las barras rojas indican el tamaño de la deleción que genera cada alelo y finalmente se presenta un diagrama de la proteína que muestra sus dominios característicos.



**Figura A1.3:** Alelo mutante  $dCTCF^{30}$  (modificado de MacDonald *et al.*, 2010). Los genes están representados en forma de flechas que indican su dirección en la transcripción. En el nivel inferior, se muestra la secuencia transcrita; UTRs (cajas amarillas) y exones (cajas azules). La barra roja indica el tamaño de la deleción que genera cada alelo y finalmente se presenta un diagrama de la proteína que muestra sus dominios característicos.



**Figura A1.4:** Alelo mutante para  $Mod(mdg4)$  (modificado de Gerasimova *et al.*, 1995). Los genes están representados en forma de flechas que indican su dirección en la transcripción. En el nivel inferior, se muestra la secuencia transcrita; UTRs (cajas amarillas) y exones (cajas azules). La barra roja indica el tamaño de la deleción que genera cada alelo y finalmente se presenta un diagrama de la proteína que muestra sus dominios característicos.

## Anexo 2 Cruzas genéticas

En esta sección muestra la estrategia seguida para obtener cada uno de los diferentes genotipos evaluados en este trabajo.

Obtención del genotipo:  $\frac{dAdd1^2}{+}; +$   $\left( \frac{y'w}{y}; \frac{dAdd1^2}{dAdd1^2}; + \right) \times \left( \frac{w^{1118}}{w^{1118}}; \frac{+}{+}; + \right)$

$\frac{dAdd1^2}{+}; +$	$y'w; dAdd1^2; +$	$y'w; dAdd1^2; +$	$y'w; dAdd1^2; +$	$Y; dAdd1^2; +$	$Y; dAdd1^2; +$
$W^{1118}; +; +$	$\frac{y'w}{w^{1118}}; \frac{dAdd1^2}{+}; +$	$\frac{y'w}{w^{1118}}; \frac{dAdd1^2}{+}; +$	$\frac{y'w}{w^{1118}}; \frac{dAdd1^2}{+}; +$	$\frac{Y}{w^{1118}}; \frac{dAdd1^2}{+}; +$	$\frac{Y}{w^{1118}}; \frac{dAdd1^2}{+}; +$
$W^{1118}; +; +$	$\frac{y'w}{w^{1118}}; \frac{dAdd1^2}{+}; +$	$\frac{y'w}{w^{1118}}; \frac{dAdd1^2}{+}; +$	$\frac{y'w}{w^{1118}}; \frac{dAdd1^2}{+}; +$	$\frac{Y}{w^{1118}}; \frac{dAdd1^2}{+}; +$	$\frac{Y}{w^{1118}}; \frac{dAdd1^2}{+}; +$
$W^{1118}; +; +$	$\frac{y'w}{w^{1118}}; \frac{dAdd1^2}{+}; +$	$\frac{y'w}{w^{1118}}; \frac{dAdd1^2}{+}; +$	$\frac{y'w}{w^{1118}}; \frac{dAdd1^2}{+}; +$	$\frac{Y}{w^{1118}}; \frac{dAdd1^2}{+}; +$	$\frac{Y}{w^{1118}}; \frac{dAdd1^2}{+}; +$
$W^{1118}; +; +$	$\frac{y'w}{w^{1118}}; \frac{dAdd1^2}{+}; +$	$\frac{y'w}{w^{1118}}; \frac{dAdd1^2}{+}; +$	$\frac{y'w}{w^{1118}}; \frac{dAdd1^2}{+}; +$	$\frac{Y}{w^{1118}}; \frac{dAdd1^2}{+}; +$	$\frac{Y}{w^{1118}}; \frac{dAdd1^2}{+}; +$
	$y'w; dAdd1^2; +$	$y'w; dAdd1^2; +$	$y'w; dAdd1^2; +$	$Y; dAdd1^2; +$	$Y; dAdd1^2; +$
$W^{1118}; +; +$	$\frac{y'w}{w^{1118}}; \frac{dAdd1^2}{+}; +$	$\frac{y'w}{w^{1118}}; \frac{dAdd1^2}{+}; +$	$\frac{y'w}{w^{1118}}; \frac{dAdd1^2}{+}; +$	$\frac{Y}{w^{1118}}; \frac{dAdd1^2}{+}; +$	$\frac{Y}{w^{1118}}; \frac{dAdd1^2}{+}; +$
$W^{1118}; +; +$	$\frac{y'w}{w^{1118}}; \frac{dAdd1^2}{+}; +$	$\frac{y'w}{w^{1118}}; \frac{dAdd1^2}{+}; +$	$\frac{y'w}{w^{1118}}; \frac{dAdd1^2}{+}; +$	$\frac{Y}{w^{1118}}; \frac{dAdd1^2}{+}; +$	$\frac{Y}{w^{1118}}; \frac{dAdd1^2}{+}; +$
$W^{1118}; +; +$	$\frac{y'w}{w^{1118}}; \frac{dAdd1^2}{+}; +$	$\frac{y'w}{w^{1118}}; \frac{dAdd1^2}{+}; +$	$\frac{y'w}{w^{1118}}; \frac{dAdd1^2}{+}; +$	$\frac{Y}{w^{1118}}; \frac{dAdd1^2}{+}; +$	$\frac{Y}{w^{1118}}; \frac{dAdd1^2}{+}; +$

Para obtener este genotipo se tomaron machos del stock  $dAdd1^2/dAdd1^2$  y se cruzaron con hembras vírgenes del stock WT.

- 1) Se analizaron tanto machos como hembras (azul).

Obtención del genotipo:  $\frac{+}{Y}; \frac{+}{TM6B.Tb} X \frac{w^{1118}}{w^{1118}}; \frac{+}{+}$

$(\frac{+}{Y}; \frac{+}{TM6B.Tb} X \frac{w^{1118}}{w^{1118}}; \frac{+}{+})$



	$\frac{+}{Y}; \frac{+}{TM6B.Tb} X \frac{w^{1118}}{w^{1118}}; \frac{+}{+}$	$\frac{+}{Y}; \frac{+}{TM6B.Tb} X \frac{w^{1118}}{w^{1118}}; \frac{+}{+}$	$Y; +; dxnp^2$
$W^{1118}; +; +$	$\frac{+}{w^{1118}}; \frac{+}{+}$	$\frac{+}{w^{1118}}; \frac{+}{+}$	$Y; +; dxnp^2$
$W^{1118}; +; +$	$\frac{+}{w^{1118}}; \frac{+}{+}$	$\frac{+}{w^{1118}}; \frac{+}{+}$	$\frac{Y}{w^{1118}}; \frac{+}{+}$
$W^{1118}; +; +$	$\frac{+}{w^{1118}}; \frac{+}{+}$	$\frac{+}{w^{1118}}; \frac{+}{+}$	$\frac{Y}{w^{1118}}; \frac{+}{+}$
$W^{1118}; +; +$	$\frac{+}{w^{1118}}; \frac{+}{+}$	$\frac{+}{w^{1118}}; \frac{+}{+}$	$\frac{Y}{w^{1118}}; \frac{+}{+}$
	$\frac{+}{Y}; \frac{+}{TM6B.Tb} X \frac{w^{1118}}{w^{1118}}; \frac{+}{+}$	$\frac{+}{Y}; \frac{+}{TM6B.Tb} X \frac{w^{1118}}{w^{1118}}; \frac{+}{+}$	$Y; +; dxnp^2$
$W^{1118}; +; +$	$\frac{+}{w^{1118}}; \frac{+}{+}$	$\frac{+}{w^{1118}}; \frac{+}{+}$	$\frac{Y}{w^{1118}}; \frac{+}{+}$
$W^{1118}; +; +$	$\frac{+}{w^{1118}}; \frac{+}{+}$	$\frac{+}{w^{1118}}; \frac{+}{+}$	$\frac{Y}{w^{1118}}; \frac{+}{+}$
$W^{1118}; +; +$	$\frac{+}{w^{1118}}; \frac{+}{+}$	$\frac{+}{w^{1118}}; \frac{+}{+}$	$\frac{Y}{w^{1118}}; \frac{+}{+}$
$W^{1118}; +; +$	$\frac{+}{w^{1118}}; \frac{+}{+}$	$\frac{+}{w^{1118}}; \frac{+}{+}$	$\frac{Y}{w^{1118}}; \frac{+}{+}$

Para obtener este genotipo se tomaron machos del stock  $dxnp^2/TM6B, Tb$  y se cruzaron con hembras vírgenes del stock WT.

- 1) Se analizaron tanto machos como hembras que no presentaran el balancer  $TM6B, Tb$  (azul).
- 2) Se descartaron los individuos que tuvieran el balancer  $TM6B, Tb$  (Gris).

Obtención del genotipo:  $\frac{dCTCF^{30}}{+}$

$\left(\frac{y^1w^+}{Y}; +; \frac{dCTCF^{30}}{TM6B,Tb} \times \frac{w^{1118}}{w^{1118}}; +; \frac{+}{+}\right)$

	$y^1w^*; +; dCTCF^{30}$	$y^1w^*; +; TM6B, Tb$	$Y; +; TM6B, Tb$	$Y; +; dCTCF^{30}$
$W^{1118}; +; +$	$\frac{y^1w^+}{w^{1118}}; +; \frac{dCTCF^{30}}{+}$	$\frac{y^1w^+}{w^{1118}}; +; \frac{TM6B, Tb}{+}$	$\frac{Y}{w^{1118}}; +; \frac{TM6B, Tb}{+}$	$\frac{Y}{w^{1118}}; +; \frac{dCTCF^{30}}{+}$
$W^{1118}; +; +$	$\frac{y^1w^+}{w^{1118}}; +; \frac{dCTCF^{30}}{+}$	$\frac{y^1w^+}{w^{1118}}; +; \frac{TM6B, Tb}{+}$	$\frac{Y}{w^{1118}}; +; \frac{TM6B, Tb}{+}$	$\frac{Y}{w^{1118}}; +; \frac{dCTCF^{30}}{+}$
$W^{1118}; +; +$	$\frac{y^1w^+}{w^{1118}}; +; \frac{dCTCF^{30}}{+}$	$\frac{y^1w^+}{w^{1118}}; +; \frac{TM6B, Tb}{+}$	$\frac{Y}{w^{1118}}; +; \frac{TM6B, Tb}{+}$	$\frac{Y}{w^{1118}}; +; \frac{dCTCF^{30}}{+}$
$W^{1118}; +; +$	$\frac{y^1w^+}{w^{1118}}; +; \frac{dCTCF^{30}}{+}$	$\frac{y^1w^+}{w^{1118}}; +; \frac{TM6B, Tb}{+}$	$\frac{Y}{w^{1118}}; +; \frac{TM6B, Tb}{+}$	$\frac{Y}{w^{1118}}; +; \frac{dCTCF^{30}}{+}$
	$y^1w^*; +; dCTCF^{30}$		$Y; +; TM6B, Tb$	$Y; +; dCTCF^{30}$
$W^{1118}; +; +$	$\frac{y^1w^+}{w^{1118}}; +; \frac{dCTCF^{30}}{+}$	$\frac{y^1w^+}{w^{1118}}; +; \frac{TM6B, Tb}{+}$	$\frac{Y}{w^{1118}}; +; \frac{TM6B, Tb}{+}$	$\frac{Y}{w^{1118}}; +; \frac{dCTCF^{30}}{+}$
$W^{1118}; +; +$	$\frac{y^1w^+}{w^{1118}}; +; \frac{dCTCF^{30}}{+}$	$\frac{y^1w^+}{w^{1118}}; +; \frac{TM6B, Tb}{+}$	$\frac{Y}{w^{1118}}; +; \frac{TM6B, Tb}{+}$	$\frac{Y}{w^{1118}}; +; \frac{dCTCF^{30}}{+}$
$W^{1118}; +; +$	$\frac{y^1w^+}{w^{1118}}; +; \frac{dCTCF^{30}}{+}$	$\frac{y^1w^+}{w^{1118}}; +; \frac{TM6B, Tb}{+}$	$\frac{Y}{w^{1118}}; +; \frac{TM6B, Tb}{+}$	$\frac{Y}{w^{1118}}; +; \frac{dCTCF^{30}}{+}$
$W^{1118}; +; +$	$\frac{y^1w^+}{w^{1118}}; +; \frac{dCTCF^{30}}{+}$	$\frac{y^1w^+}{w^{1118}}; +; \frac{TM6B, Tb}{+}$	$\frac{Y}{w^{1118}}; +; \frac{TM6B, Tb}{+}$	$\frac{Y}{w^{1118}}; +; \frac{dCTCF^{30}}{+}$

Para obtener este genotipo se tomaron machos del stock  $dCTCF^{30}/TM6B, Tb$  (Bloomington #33480) y cruzaron con hembras vírgenes  $WT$ .

- 1) Se analizaron tanto machos como hembras que no presentaron el balancer  $TM6B, Tb$  (azul).
- 2) Se descartaron los individuos que tuvieran el balancer  $TM6B, Tb$  (Gris).





$$\text{Obtención del genotipo: } \frac{dAdd1^2}{+} + \frac{dxnp^2}{dCTCF30}$$

$$\left( \frac{y^1w}{Y} \frac{dAdd1^2}{CyO} ; \frac{dxnp^2}{TM6B/Tb} \right) \times \left( \frac{y^1w^*}{w} + \frac{dCTCF30}{TM6B/Tb} \right)$$

	$y^1w$ ; $dAdd1^2$ ; $dxnp^2$	$y^1w$ ; $dAdd1^2$ ; $TM6B, Tb$	$y^1w$ ; $CyO$ ; $TM6B, Tb$	$Y$ ; $CyO$ ; $dxnp^2$
$y^1w^*$ ; +; $dCTCF30$	$\frac{y^1w}{y^1w^*} \frac{dAdd1^2}{+} + \frac{dxnp^2}{dCTCF30}$	$\frac{y^1w}{y^1w^*} \frac{dAdd1^2}{+} + \frac{TM6B, Tb}{dCTCF30}$	$\frac{Y}{y^1w^*} \frac{CyO}{+} + \frac{TM6B, Tb}{dCTCF30}$	$\frac{Y}{y^1w^*} \frac{CyO}{+} + \frac{dxnp^2}{dCTCF30}$
$y^1w^*$ ; +; $TM6B, Tb$	$\frac{y^1w}{y^1w^*} \frac{dAdd1^2}{+} + \frac{dxnp^2}{TM6B, Tb}$	$\frac{y^1w}{y^1w^*} \frac{dAdd1^2}{+} + \frac{TM6B, Tb}{TM6B, Tb}$	$\frac{Y}{y^1w^*} \frac{CyO}{+} + \frac{TM6B, Tb}{TM6B, Tb}$	$\frac{Y}{y^1w^*} \frac{CyO}{+} + \frac{dxnp^2}{TM6B, Tb}$
$w$ ; +; $TM6B, Tb$	$\frac{y^1w}{w} \frac{dAdd1^2}{+} + \frac{dxnp^2}{TM6B, Tb}$	$\frac{y^1w}{w} \frac{dAdd1^2}{+} + \frac{TM6B, Tb}{TM6B, Tb}$	$\frac{Y}{w} \frac{CyO}{+} + \frac{TM6B, Tb}{TM6B, Tb}$	$\frac{Y}{w} \frac{CyO}{+} + \frac{dxnp^2}{TM6B, Tb}$
$w$ ; +; $dCTCF30$	$\frac{y^1w}{w} \frac{dAdd1^2}{+} + \frac{dxnp^2}{dCTCF30}$	$\frac{y^1w}{w} \frac{dAdd1^2}{+} + \frac{TM6B, Tb}{dCTCF30}$	$\frac{Y}{w} \frac{CyO}{+} + \frac{TM6B, Tb}{dCTCF30}$	$\frac{Y}{w} \frac{CyO}{+} + \frac{dxnp^2}{dCTCF30}$
	$y^1w$ ; $CyO$ ; $dxnp^2$	$y^1w$ ; $CyO$ ; $TM6B, Tb$	$y^1w$ ; $CyO$ ; $TM6B, Tb$	$Y$ ; $dAdd1^2$ ; $dxnp^2$
$y^1w^*$ ; +; $dCTCF30$	$\frac{y^1w}{y^1w^*} \frac{CyO}{+} + \frac{dxnp^2}{dCTCF30}$	$\frac{y^1w}{y^1w^*} \frac{CyO}{+} + \frac{TM6B, Tb}{dCTCF30}$	$\frac{Y}{y^1w^*} \frac{dAdd1^2}{+} + \frac{TM6B, Tb}{dCTCF30}$	$\frac{Y}{y^1w^*} \frac{dAdd1^2}{+} + \frac{dxnp^2}{dCTCF30}$
$y^1w^*$ ; +; $TM6B, Tb$	$\frac{y^1w}{y^1w^*} \frac{CyO}{+} + \frac{dxnp^2}{TM6B, Tb}$	$\frac{y^1w}{y^1w^*} \frac{CyO}{+} + \frac{TM6B, Tb}{TM6B, Tb}$	$\frac{Y}{y^1w^*} \frac{dAdd1^2}{+} + \frac{TM6B, Tb}{TM6B, Tb}$	$\frac{Y}{y^1w^*} \frac{dAdd1^2}{+} + \frac{dxnp^2}{TM6B, Tb}$
$w$ ; +; $TM6B, Tb$	$\frac{y^1w}{w} \frac{CyO}{+} + \frac{dxnp^2}{TM6B, Tb}$	$\frac{y^1w}{w} \frac{CyO}{+} + \frac{TM6B, Tb}{TM6B, Tb}$	$\frac{Y}{w} \frac{dAdd1^2}{+} + \frac{TM6B, Tb}{TM6B, Tb}$	$\frac{Y}{w} \frac{dAdd1^2}{+} + \frac{dxnp^2}{TM6B, Tb}$
$w$ ; +; $dCTCF30$	$\frac{y^1w}{w} \frac{CyO}{+} + \frac{dxnp^2}{dCTCF30}$	$\frac{y^1w}{w} \frac{CyO}{+} + \frac{TM6B, Tb}{dCTCF30}$	$\frac{Y}{w} \frac{dAdd1^2}{+} + \frac{TM6B, Tb}{dCTCF30}$	$\frac{Y}{w} \frac{dAdd1^2}{+} + \frac{dxnp^2}{dCTCF30}$

Para obtener este genotipo se tomaron machos del stock  $dAdd1^2/CyO$ ;  $dxnp^2/TM6B, Tb$  y se cruzaron con hembras vírgenes del stock  $dCTCF30/TM6B, Tb$  (Bloomington #33480).

- 1) Se analizaron los individuos que NO presentaron fenotipos  $CyO$  y/o  $TM6B, Tb$  (azul).
- 2) Se ignoraron los individuos que presentaron fenotipos  $CyO$  y/o  $TM6B, Tb$  (gris).
- 3) \*Los individuos marcados en rojo son inviábiles debido a la letalidad del balancer  $TM6B, Tb$  en homocigosis.

Obtención del genotipo:  $\frac{dAdd1^2}{y} + \frac{dxnp^3}{dCTCF^{30}}$

$\left( \frac{y^1w^*}{y}; \frac{dAdd1^2}{CyO}; \frac{dxnp^3}{TM6B,Tb} \right) \times \left( \frac{y^1w^*}{w}; \frac{dCTCF^{30}}{TM6B,Tb} \right)$

	$y^1w^*; dAdd1^2; dxnp^3$	$y^1w^*; dAdd1^2; TM6B, Tb$	$Y; CyO; TM6B, Tb$	$Y; CyO; dxnp^2$
$y^1w^*; +; dCTCF^{30}$	$\frac{y^1w^*}{y^1w^*}; \frac{dAdd1^2}{dCTCF^{30}} + \frac{dxnp^3}{dCTCF^{30}}$	$\frac{y^1w^*}{y^1w^*}; \frac{dAdd1^2}{dCTCF^{30}} + \frac{TM6B, Tb}{dCTCF^{30}}$	$\frac{Y}{y^1w^*}; \frac{CyO}{dCTCF^{30}} + \frac{TM6B, Tb}{dCTCF^{30}}$	$\frac{Y}{y^1w^*}; \frac{CyO}{dCTCF^{30}} + \frac{dxnp^3}{dCTCF^{30}}$
$y^1w^*; +; TM6B, Tb$	$\frac{y^1w^*}{y^1w^*}; \frac{dAdd1^2}{dCTCF^{30}} + \frac{dxnp^3}{TM6B, Tb}$	$\frac{y^1w^*}{y^1w^*}; \frac{dAdd1^2}{dCTCF^{30}} + \frac{TM6B, Tb}{TM6B, Tb}$	$\frac{Y}{y^1w^*}; \frac{CyO}{dCTCF^{30}} + \frac{TM6B, Tb}{TM6B, Tb}$	$\frac{Y}{y^1w^*}; \frac{CyO}{dCTCF^{30}} + \frac{dxnp^3}{TM6B, Tb}$
$w; +; TM6B, Tb$	$\frac{y^1w^*}{w}; \frac{dAdd1^2}{dCTCF^{30}} + \frac{dxnp^3}{TM6B, Tb}$	$\frac{y^1w^*}{w}; \frac{dAdd1^2}{dCTCF^{30}} + \frac{TM6B, Tb}{TM6B, Tb}$	$\frac{Y}{w}; \frac{CyO}{dCTCF^{30}} + \frac{TM6B, Tb}{TM6B, Tb}$	$\frac{Y}{w}; \frac{CyO}{dCTCF^{30}} + \frac{dxnp^3}{TM6B, Tb}$
$w; +; dCTCF^{30}$	$\frac{y^1w^*}{w}; \frac{dAdd1^2}{dCTCF^{30}} + \frac{dxnp^3}{dCTCF^{30}}$	$\frac{y^1w^*}{w}; \frac{dAdd1^2}{dCTCF^{30}} + \frac{TM6B, Tb}{dCTCF^{30}}$	$\frac{Y}{w}; \frac{CyO}{dCTCF^{30}} + \frac{TM6B, Tb}{dCTCF^{30}}$	$\frac{Y}{w}; \frac{CyO}{dCTCF^{30}} + \frac{dxnp^3}{dCTCF^{30}}$
	$y^1w^*; CyO; dxnp^2$	$y^1w^*; CyO; TM6B, Tb$	$Y; dAdd1^2; TM6B, Tb$	$Y; dAdd1^2; dxnp^2$
$y^1w^*; +; dCTCF^{30}$	$\frac{y^1w^*}{y^1w^*}; \frac{CyO}{dCTCF^{30}} + \frac{dxnp^2}{dCTCF^{30}}$	$\frac{y^1w^*}{y^1w^*}; \frac{CyO}{dCTCF^{30}} + \frac{TM6B, Tb}{dCTCF^{30}}$	$\frac{Y}{y^1w^*}; \frac{dAdd1^2}{dCTCF^{30}} + \frac{TM6B, Tb}{dCTCF^{30}}$	$\frac{Y}{y^1w^*}; \frac{dAdd1^2}{dCTCF^{30}} + \frac{dxnp^2}{dCTCF^{30}}$
$y^1w^*; +; TM6B, Tb$	$\frac{y^1w^*}{y^1w^*}; \frac{CyO}{dCTCF^{30}} + \frac{dxnp^2}{TM6B, Tb}$	$\frac{y^1w^*}{y^1w^*}; \frac{CyO}{dCTCF^{30}} + \frac{TM6B, Tb}{TM6B, Tb}$	$\frac{Y}{y^1w^*}; \frac{dAdd1^2}{dCTCF^{30}} + \frac{TM6B, Tb}{TM6B, Tb}$	$\frac{Y}{y^1w^*}; \frac{dAdd1^2}{dCTCF^{30}} + \frac{dxnp^2}{TM6B, Tb}$
$w; +; TM6B, Tb$	$\frac{y^1w^*}{w}; \frac{CyO}{dCTCF^{30}} + \frac{dxnp^2}{TM6B, Tb}$	$\frac{y^1w^*}{w}; \frac{CyO}{dCTCF^{30}} + \frac{TM6B, Tb}{TM6B, Tb}$	$\frac{Y}{w}; \frac{dAdd1^2}{dCTCF^{30}} + \frac{TM6B, Tb}{TM6B, Tb}$	$\frac{Y}{w}; \frac{dAdd1^2}{dCTCF^{30}} + \frac{dxnp^2}{TM6B, Tb}$
$w; +; dCTCF^{30}$	$\frac{y^1w^*}{w}; \frac{CyO}{dCTCF^{30}} + \frac{dxnp^2}{dCTCF^{30}}$	$\frac{y^1w^*}{w}; \frac{CyO}{dCTCF^{30}} + \frac{TM6B, Tb}{dCTCF^{30}}$	$\frac{Y}{w}; \frac{dAdd1^2}{dCTCF^{30}} + \frac{TM6B, Tb}{dCTCF^{30}}$	$\frac{Y}{w}; \frac{dAdd1^2}{dCTCF^{30}} + \frac{dxnp^2}{dCTCF^{30}}$

Para obtener este genotipo se tomaron machos del stock  $dAdd1^2/CyO; dxnp^3/TM6B, Tb$  y se cruzaron con hembras virgenes del stock  $dCTCF^{30}/TM6B, Tb$  (Bloomington #33480).

- 1) Se analizaron los individuos que NO presentaron fenotipos  $CyO$  y/o  $TM6B, Tb$  (azul).
- 2) Se ignoraron los individuos que presentaron fenotipos  $CyO$  y/o  $TM6B, Tb$  (grís).
- 3) \*Los individuos marcados en rojo son inviábiles debido a la letalidad del balancer  $TM6B, Tb$  en homocigosis.

$$\text{Obtención del genotipo: } \frac{y^2w'ct^6}{Y} ; \frac{dAdd1^2}{Y} ; \frac{dxnp^2}{Mod(mdg4)^{u1}} \quad \left( \frac{y^1w}{Y} ; \frac{dAdd1^2}{CyO} ; \frac{dxnp^2}{TM6B,Tb} \quad X \quad \frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}} \right)$$



	$\frac{y^1w}{y^2w'ct^6} ; \frac{dAdd1^2}{Y} ; \frac{dxnp^2}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{y^1w}{y^2w'ct^6} ; \frac{dAdd1^2}{CyO} ; \frac{dxnp^2}{TM6B,Tb}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6} ; \frac{CyO}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$Y ; CyO ; TM6B, Tb$	$Y ; CyO ; dxnp^2$
$y^2w'ct^6 ; + ; Mod(mdg4)^{u1}$	$\frac{y^1w}{y^2w'ct^6} ; \frac{dAdd1^2}{Y} ; \frac{dxnp^2}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{y^1w}{y^2w'ct^6} ; \frac{dAdd1^2}{TM6B,Tb} ; \frac{dxnp^2}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6} ; \frac{CyO}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$Y ; CyO ; TM6B, Tb$	$Y ; CyO ; dxnp^2$
$y^2w'ct^6 ; + ; Mod(mdg4)^{u1}$	$\frac{y^1w}{y^2w'ct^6} ; \frac{dAdd1^2}{Y} ; \frac{dxnp^2}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{y^1w}{y^2w'ct^6} ; \frac{dAdd1^2}{TM6B,Tb} ; \frac{dxnp^2}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6} ; \frac{CyO}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$Y ; CyO ; TM6B, Tb$	$Y ; CyO ; dxnp^2$
$y^2w'ct^6 ; + ; Mod(mdg4)^{u1}$	$\frac{y^1w}{y^2w'ct^6} ; \frac{dAdd1^2}{Y} ; \frac{dxnp^2}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{y^1w}{y^2w'ct^6} ; \frac{dAdd1^2}{TM6B,Tb} ; \frac{dxnp^2}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6} ; \frac{CyO}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$Y ; CyO ; TM6B, Tb$	$Y ; CyO ; dxnp^2$
$y^2w'ct^6 ; + ; Mod(mdg4)^{u1}$	$\frac{y^1w}{y^2w'ct^6} ; \frac{dAdd1^2}{Y} ; \frac{dxnp^2}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{y^1w}{y^2w'ct^6} ; \frac{dAdd1^2}{TM6B,Tb} ; \frac{dxnp^2}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6} ; \frac{CyO}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$Y ; CyO ; TM6B, Tb$	$Y ; CyO ; dxnp^2$
	$\frac{y^1w}{y^2w'ct^6} ; \frac{CyO}{Mod(mdg4)^{u1}} ; \frac{dxnp^2}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$Y ; dAdd1^2 ; TM6B, Tb$		$Y ; dAdd1^2 ; TM6B, Tb$	$Y ; dAdd1^2 ; dxnp^2$
$y^2w'ct^6 ; + ; Mod(mdg4)^{u1}$	$\frac{y^1w}{y^2w'ct^6} ; \frac{CyO}{Mod(mdg4)^{u1}} ; \frac{dxnp^2}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{y^1w}{y^2w'ct^6} ; \frac{CyO}{Mod(mdg4)^{u1}} ; \frac{TM6B,Tb}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6} ; \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{u1}} ; \frac{dxnp^2}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$Y ; dAdd1^2 ; TM6B, Tb$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6} ; \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{u1}} ; \frac{dxnp^2}{Mod(mdg4)^{u1}}$
$y^2w'ct^6 ; + ; Mod(mdg4)^{u1}$	$\frac{y^1w}{y^2w'ct^6} ; \frac{CyO}{Mod(mdg4)^{u1}} ; \frac{dxnp^2}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{y^1w}{y^2w'ct^6} ; \frac{CyO}{Mod(mdg4)^{u1}} ; \frac{TM6B,Tb}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6} ; \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{u1}} ; \frac{dxnp^2}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$Y ; dAdd1^2 ; TM6B, Tb$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6} ; \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{u1}} ; \frac{dxnp^2}{Mod(mdg4)^{u1}}$
$y^2w'ct^6 ; + ; Mod(mdg4)^{u1}$	$\frac{y^1w}{y^2w'ct^6} ; \frac{CyO}{Mod(mdg4)^{u1}} ; \frac{dxnp^2}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{y^1w}{y^2w'ct^6} ; \frac{CyO}{Mod(mdg4)^{u1}} ; \frac{TM6B,Tb}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6} ; \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{u1}} ; \frac{dxnp^2}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$Y ; dAdd1^2 ; TM6B, Tb$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6} ; \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{u1}} ; \frac{dxnp^2}{Mod(mdg4)^{u1}}$

Para obtener este genotipo se tomaron machos del stock  $dAdd1^2/CyO ; dxnp^2/TM6B, Tb$  y se cruzaron con hembras virgenes del stock  $Mod(mdg4)^{u1}/Mod(mdg4)^{u1}$  (Bloomington #59960).

- 1) Se analizaron los machos que NO presentaron fenotipos  $CyO$  ni  $TM6B, Tb$  (azul).
- 2) Se ignoraron los individuos que presentaron fenotipos  $CyO$  y/o  $TM6B, Tb$  (gris).
- 3) Se ignoraron las hembras que no presentaron fenotipo s  $CyO$  ni  $TM6B, Tb$  (blanco).

**Obtención del genotipo:**  $\frac{y^2w'ct^6}{Y}; \frac{dAdd1^2}{Y} + \frac{dAdd1^2}{Cyo}; \frac{dxnp^3}{Mod(mdg4)^{u1}} + \frac{dxnp^3}{Mod(mdg4)^{u1}}$   $\left( \frac{y^2w'ct^6}{Y}; \frac{dAdd1^2}{Cyo}; \frac{dxnp^3}{TM6B,Tb} X \frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6}; +; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}} \right)$



	$\frac{y^2w'ct^6}{Y}; \frac{dAdd1^2}{Y} + \frac{dAdd1^2}{Cyo}; \frac{dxnp^3}{Mod(mdg4)^{u1}} + \frac{dxnp^3}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{Y}; \frac{dAdd1^2}{Cyo}; \frac{dxnp^3}{TM6B,Tb}$	$\frac{y^2w'ct^6}{Y}; \frac{dAdd1^2}{Cyo}; \frac{dxnp^3}{TM6B,Tb}$	$\frac{y^2w'ct^6}{Y}; \frac{dAdd1^2}{Cyo}; \frac{dxnp^3}{TM6B,Tb}$
$y^2w'ct^6; +; Mod(mdg4)^{u1}$	$\frac{y^2w'ct^6}{Y}; \frac{dAdd1^2}{Y} + \frac{dAdd1^2}{Cyo}; \frac{dxnp^3}{Mod(mdg4)^{u1}} + \frac{dxnp^3}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{Y}; \frac{dAdd1^2}{Cyo}; \frac{dxnp^3}{TM6B,Tb}$	$\frac{y^2w'ct^6}{Y}; \frac{dAdd1^2}{Cyo}; \frac{dxnp^3}{TM6B,Tb}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{Cyo}{+}; \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{u1}} + \frac{dxnp^3}{Mod(mdg4)^{u1}}$
$y^2w'ct^6; +; Mod(mdg4)^{u1}$	$\frac{y^2w'ct^6}{Y}; \frac{dAdd1^2}{Y} + \frac{dAdd1^2}{Cyo}; \frac{dxnp^3}{Mod(mdg4)^{u1}} + \frac{dxnp^3}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{Y}; \frac{dAdd1^2}{Cyo}; \frac{dxnp^3}{TM6B,Tb}$	$\frac{y^2w'ct^6}{Y}; \frac{dAdd1^2}{Cyo}; \frac{dxnp^3}{TM6B,Tb}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{Cyo}{+}; \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{u1}} + \frac{dxnp^3}{Mod(mdg4)^{u1}}$
$y^2w'ct^6; +; Mod(mdg4)^{u1}$	$\frac{y^2w'ct^6}{Y}; \frac{dAdd1^2}{Y} + \frac{dAdd1^2}{Cyo}; \frac{dxnp^3}{Mod(mdg4)^{u1}} + \frac{dxnp^3}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{Y}; \frac{dAdd1^2}{Cyo}; \frac{dxnp^3}{TM6B,Tb}$	$\frac{y^2w'ct^6}{Y}; \frac{dAdd1^2}{Cyo}; \frac{dxnp^3}{TM6B,Tb}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{Cyo}{+}; \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{u1}} + \frac{dxnp^3}{Mod(mdg4)^{u1}}$
$y^2w'ct^6; +; Mod(mdg4)^{u1}$	$\frac{y^2w'ct^6}{Y}; \frac{dAdd1^2}{Y} + \frac{dAdd1^2}{Cyo}; \frac{dxnp^3}{Mod(mdg4)^{u1}} + \frac{dxnp^3}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{Y}; \frac{dAdd1^2}{Cyo}; \frac{dxnp^3}{TM6B,Tb}$	$\frac{y^2w'ct^6}{Y}; \frac{dAdd1^2}{Cyo}; \frac{dxnp^3}{TM6B,Tb}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{Cyo}{+}; \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{u1}} + \frac{dxnp^3}{Mod(mdg4)^{u1}}$
				$Y; dAdd1^2; dxnp^3$
$y^2w'ct^6; +; Mod(mdg4)^{u1}$	$\frac{y^2w'ct^6}{Y}; \frac{dAdd1^2}{Y} + \frac{dAdd1^2}{Cyo}; \frac{dxnp^3}{Mod(mdg4)^{u1}} + \frac{dxnp^3}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{Y}; \frac{dAdd1^2}{Cyo}; \frac{dxnp^3}{TM6B,Tb}$	$\frac{y^2w'ct^6}{Y}; \frac{dAdd1^2}{Cyo}; \frac{dxnp^3}{TM6B,Tb}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{+}; \frac{Cyo}{Mod(mdg4)^{u1}} + \frac{dxnp^3}{Mod(mdg4)^{u1}}$
$y^2w'ct^6; +; Mod(mdg4)^{u1}$	$\frac{y^2w'ct^6}{Y}; \frac{dAdd1^2}{Y} + \frac{dAdd1^2}{Cyo}; \frac{dxnp^3}{Mod(mdg4)^{u1}} + \frac{dxnp^3}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{Y}; \frac{dAdd1^2}{Cyo}; \frac{dxnp^3}{TM6B,Tb}$	$\frac{y^2w'ct^6}{Y}; \frac{dAdd1^2}{Cyo}; \frac{dxnp^3}{TM6B,Tb}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{+}; \frac{Cyo}{Mod(mdg4)^{u1}} + \frac{dxnp^3}{Mod(mdg4)^{u1}}$
$y^2w'ct^6; +; Mod(mdg4)^{u1}$	$\frac{y^2w'ct^6}{Y}; \frac{dAdd1^2}{Y} + \frac{dAdd1^2}{Cyo}; \frac{dxnp^3}{Mod(mdg4)^{u1}} + \frac{dxnp^3}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{Y}; \frac{dAdd1^2}{Cyo}; \frac{dxnp^3}{TM6B,Tb}$	$\frac{y^2w'ct^6}{Y}; \frac{dAdd1^2}{Cyo}; \frac{dxnp^3}{TM6B,Tb}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{+}; \frac{Cyo}{Mod(mdg4)^{u1}} + \frac{dxnp^3}{Mod(mdg4)^{u1}}$
$y^2w'ct^6; +; Mod(mdg4)^{u1}$	$\frac{y^2w'ct^6}{Y}; \frac{dAdd1^2}{Y} + \frac{dAdd1^2}{Cyo}; \frac{dxnp^3}{Mod(mdg4)^{u1}} + \frac{dxnp^3}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{Y}; \frac{dAdd1^2}{Cyo}; \frac{dxnp^3}{TM6B,Tb}$	$\frac{y^2w'ct^6}{Y}; \frac{dAdd1^2}{Cyo}; \frac{dxnp^3}{TM6B,Tb}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{+}; \frac{Cyo}{Mod(mdg4)^{u1}} + \frac{dxnp^3}{Mod(mdg4)^{u1}}$

Para obtener este genotipo se tomaron machos del stock  $dAdd1^2/Cyo; dxnp^3/TM6B, Tb$  y se cruzaron con hembras virgenes del stock  $Mod(mdg4)^{u1}/Mod(mdg4)^{u1}$  (Bloomington #59960).

- 1) Se analizaron los machos que NO presentaron fenotipos CyO ni TM6B, Tb (azul).
- 2) Se ignoraron los individuos que presentaron fenotipos CyO y/o TM6B, Tb (gris).
- 3) Se ignoraron las hembras que no presentaron fenotipo s CyO ni TM6B, Tb (blanco).

**Obtención del genotipo:**  $\frac{y^2w'ct^6}{y}; \frac{dAdd1^2}{y} + \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}} + \frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6} + X \frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6} + \frac{Mod(mdg4)^{ju1}}{Mod(mdg4)^{ju1}}$

$y^2w'ct^6; +; Mod(mdg4)^{ju1}$	$y^2w'ct^6; +; Mod(mdg4)^{ju1}$	$y^2w'ct^6; +; Mod(mdg4)^{ju1}$	$y^2w'ct^6; +; Mod(mdg4)^{ju1}$	$y^2w'ct^6; +; Mod(mdg4)^{ju1}$	$y^2w'ct^6; +; Mod(mdg4)^{ju1}$
$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}} + \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}} + \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}} + \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}} + \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}} + \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}} + \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}}$
$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}} + \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}} + \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}} + \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}} + \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}} + \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}} + \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}}$
$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}} + \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}} + \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}} + \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}} + \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}} + \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}} + \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}}$
$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}} + \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}} + \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}} + \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}} + \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}} + \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}} + \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}}$
$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}} + \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}} + \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}} + \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}} + \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}} + \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}} + \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{ju1}}$

Para obtener este genotipo se tomaron machos del stock  $dAdd1^2/dAdd1^2$  y se cruzaron con hembras vírgenes del stock  $Mod(mdg4)^{ju1}/Mod(mdg4)^{ju1}$  (Bloomington #59960).

- 1) Se analizaron los únicamente los machos que ya que contenían una copia de los alelos reporteros  $y^2w'ct^6$  lo cual es suficiente para ver un fenotipo (azul).
- 2) Se ignoraron todas las hembras (blanco).

$$\text{Obtención del genotipo: } \frac{y^2w'ct^6}{Y} + \frac{dxnp^2}{TM6B, Tb} + \frac{dxnp^2}{Mod(mdg4)^{u1}} \quad \left( \frac{w}{Y} + \frac{dxnp^2}{TM6B, Tb} + \frac{y^2w'ct^6}{Mod(mdg4)^{u1}} + \frac{dxnp^2}{Mod(mdg4)^{u1}} \right)$$

	$w; +; dxnp^2$	$w; +; TM6B, Tb$	$Y; +; TM6B, Tb$	$Y; +; dxnp^2$
$y^2w'ct^6, +; Mod(mdg4)^{u1}$	$\frac{w}{y^2w'ct^6} + \frac{dxnp^2}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{y'w}{y^2w'ct^6} + \frac{TM6B, Tb}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6} + \frac{TM6B, Tb}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6} + \frac{dxnp^2}{Mod(mdg4)^{u1}}$
$y^2w'ct^6, +; Mod(mdg4)^{u1}$	$\frac{w}{y^2w'ct^6} + \frac{dxnp^2}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{y'w}{y^2w'ct^6} + \frac{TM6B, Tb}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6} + \frac{TM6B, Tb}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6} + \frac{dxnp^2}{Mod(mdg4)^{u1}}$
$y^2w'ct^6, +; Mod(mdg4)^{u1}$	$\frac{w}{y^2w'ct^6} + \frac{dxnp^2}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{y'w}{y^2w'ct^6} + \frac{TM6B, Tb}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6} + \frac{TM6B, Tb}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6} + \frac{dxnp^2}{Mod(mdg4)^{u1}}$
$y^2w'ct^6, +; Mod(mdg4)^{u1}$	$\frac{w}{y^2w'ct^6} + \frac{dxnp^2}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{y'w}{y^2w'ct^6} + \frac{TM6B, Tb}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6} + \frac{TM6B, Tb}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6} + \frac{dxnp^2}{Mod(mdg4)^{u1}}$
	$w; +; dxnp^2$	$w; +; TM6B, Tb$	$Y; +; TM6B, Tb$	$Y; +; dxnp^2$
$y^2w'ct^6, +, Mod(mdg4)^{u1}$	$\frac{w}{y^2w'ct^6} + \frac{dxnp^2}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{y'w}{y^2w'ct^6} + \frac{TM6B, Tb}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6} + \frac{TM6B, Tb}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6} + \frac{dxnp^2}{Mod(mdg4)^{u1}}$
$y^2w'ct^6, +, Mod(mdg4)^{u1}$	$\frac{w}{y^2w'ct^6} + \frac{dxnp^2}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{y'w}{y^2w'ct^6} + \frac{TM6B, Tb}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6} + \frac{TM6B, Tb}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6} + \frac{dxnp^2}{Mod(mdg4)^{u1}}$
$y^2w'ct^6, +, Mod(mdg4)^{u1}$	$\frac{w}{y^2w'ct^6} + \frac{dxnp^2}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{y'w}{y^2w'ct^6} + \frac{TM6B, Tb}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6} + \frac{TM6B, Tb}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6} + \frac{dxnp^2}{Mod(mdg4)^{u1}}$

Para obtener este genotipo se tomaron machos del stock  $dxnp^2/TM6B, Tb$  y se cruzaron con hembras vírgenes del stock  $Mod(mdg4)^{u1}/Mod(mdg4)^{u1}$  (Bloomington #59960).

- 1) Se analizaron los machos que NO presentaron fenotipos  $TM6B, Tb$  (azul).
- 2) Se ignoraron los individuos que presentaron fenotipos  $TM6B, Tb$  (gris).
- 3) Se ignoraron las hembras sin fenotipo  $TM6B, Tb$  (blanco).

$$\text{Obtención del genotipo: } \frac{y^2}{y} ; \frac{dAdd1^2}{+} ; \frac{+}{+} ; \frac{+}{+}$$

$$\left( \frac{y^2}{y} ; \frac{dAdd1^2}{+} ; \frac{+}{+} ; \frac{+}{+} \right) \times \left( \frac{y^2}{y^2} ; \frac{+}{+} ; \frac{+}{+} ; \frac{+}{+} \right)$$

	$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$
$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$
$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$
$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$
$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$
$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$
$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$
$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$	$y^2 ; + ; +$

Para obtener este genotipo se tomaron machos del stock  $dAdd1^2/dAdd1^2$  y se cruzaron con hembras vírgenes del stock  $y^2/y^2$

- 1) Se analizaron únicamente a los machos (azul).
- 2) Se ignoraron las hembras (blanco).

Obtención del genotipo:  $\frac{+}{y^2}; \frac{+}{+}; \frac{dxnp^2}{+}$

$\left( \frac{+}{y}; \frac{+}{+}; \frac{dxnp^2}{TM6B, Tb} \times \frac{y^2}{y^2}; \frac{+}{+}; \frac{+}{+} \right)$

	$\frac{+}{y^2}; \frac{+}{+}; \frac{dxnp^2}{+}$	$\frac{+}{+}; \frac{+}{+}; \frac{TM6B, Tb}{+}$	$\frac{y^2}{y^2}; \frac{+}{+}; \frac{dxnp^2}{+}$
$y^2; +; +$	$\frac{+}{y^2}; \frac{+}{+}; \frac{dxnp^2}{+}$	$\frac{+}{y^2}; \frac{+}{+}; \frac{TM6B, Tb}{+}$	$\frac{Y}{y^2}; \frac{+}{+}; \frac{dxnp^2}{+}$
$y^2; +; +$	$\frac{+}{y^2}; \frac{+}{+}; \frac{dxnp^2}{+}$	$\frac{+}{y^2}; \frac{+}{+}; \frac{TM6B, Tb}{+}$	$\frac{Y}{y^2}; \frac{+}{+}; \frac{dxnp^2}{+}$
$y^2; +; +$	$\frac{+}{y^2}; \frac{+}{+}; \frac{dxnp^2}{+}$	$\frac{+}{y^2}; \frac{+}{+}; \frac{TM6B, Tb}{+}$	$\frac{Y}{y^2}; \frac{+}{+}; \frac{dxnp^2}{+}$
$y^2; +; +$	$\frac{+}{y^2}; \frac{+}{+}; \frac{dxnp^2}{+}$	$\frac{+}{y^2}; \frac{+}{+}; \frac{TM6B, Tb}{+}$	$\frac{Y}{y^2}; \frac{+}{+}; \frac{dxnp^2}{+}$
	$\frac{+}{+}; \frac{+}{+}; \frac{dxnp^2}{+}$	$\frac{+}{+}; \frac{+}{+}; \frac{TM6B, Tb}{+}$	$\frac{Y}{+}; \frac{+}{+}; \frac{dxnp^2}{+}$
$y^2; +; +$	$\frac{+}{y^2}; \frac{+}{+}; \frac{dxnp^2}{+}$	$\frac{+}{y^2}; \frac{+}{+}; \frac{TM6B, Tb}{+}$	$\frac{Y}{y^2}; \frac{+}{+}; \frac{dxnp^2}{+}$
$y^2; +; +$	$\frac{+}{y^2}; \frac{+}{+}; \frac{dxnp^2}{+}$	$\frac{+}{y^2}; \frac{+}{+}; \frac{TM6B, Tb}{+}$	$\frac{Y}{y^2}; \frac{+}{+}; \frac{dxnp^2}{+}$
$y^2; +; +$	$\frac{+}{y^2}; \frac{+}{+}; \frac{dxnp^2}{+}$	$\frac{+}{y^2}; \frac{+}{+}; \frac{TM6B, Tb}{+}$	$\frac{Y}{y^2}; \frac{+}{+}; \frac{dxnp^2}{+}$

Para obtener este genotipo se tomaron machos del stock  $dxnp^2/TM6B, Tb$  y se cruzaron con hembras vírgenes del stock  $y^2/y^2$

- 1) Se analizaron únicamente a los machos (azul).
- 2) Se ignoraron los individuos que presentaron fenotipos  $TM6B, Tb$  (gris).
- 3) Se ignoraron las hembras (blanco).



Obtención del genotipo:	$\frac{y^2w'ct^6}{Y}; \frac{dAdd1^2}{dAdd1^2}; \frac{dxnp^2}{Mod(mdg4)^{u1}} + \frac{dAdd1^2}{dAdd1^2}; \frac{dxnp^2}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\left( \frac{y^2w'ct^6}{Y}; \frac{dAdd1^2}{Cyo} + \frac{dxnp^2}{TM6B,Tb} \right) \times \left( \frac{y^2w'ct^6}{Y}; \frac{dAdd1^2}{Cyo} + \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}} \right)$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{CyO}{TM6B,Tb}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{CyO}{TM6B,Tb}$	$Y; CyO; dxnp^2$
$y^2w'ct^6; +; Mod(mdg4)^{u1}$	$\frac{y^2w'ct^6}{Y}; \frac{dAdd1^2}{dAdd1^2}; \frac{dxnp^2}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{CyO}{TM6B,Tb}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{CyO}{TM6B,Tb}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{CyO}{TM6B,Tb}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{dxnp^2}{Mod(mdg4)^{u1}}$
$y^2w'ct^6; +; Mod(mdg4)^{u1}$	$\frac{y^2w'ct^6}{Y}; \frac{dAdd1^2}{dAdd1^2}; \frac{dxnp^2}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{dAdd1^2}; \frac{TM6B,Tb}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{CyO}{TM6B,Tb}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{CyO}{TM6B,Tb}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{dxnp^2}{Mod(mdg4)^{u1}}$
$y^2w'ct^6; +; Mod(mdg4)^{u1}$	$\frac{y^2w'ct^6}{Y}; \frac{dAdd1^2}{dAdd1^2}; \frac{dxnp^2}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{dAdd1^2}; \frac{TM6B,Tb}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{CyO}{TM6B,Tb}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{CyO}{TM6B,Tb}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{dxnp^2}{Mod(mdg4)^{u1}}$
$y^2w'ct^6; +; Mod(mdg4)^{u1}$	$\frac{y^2w'ct^6}{Y}; \frac{dAdd1^2}{dAdd1^2}; \frac{dxnp^2}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{dAdd1^2}; \frac{TM6B,Tb}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{CyO}{TM6B,Tb}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{CyO}{TM6B,Tb}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{dxnp^2}{Mod(mdg4)^{u1}}$
$y^2w'ct^6; +; Mod(mdg4)^{u1}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{CyO}{TM6B,Tb}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{CyO}{TM6B,Tb}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{CyO}{TM6B,Tb}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{CyO}{TM6B,Tb}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{dxnp^2}{Mod(mdg4)^{u1}}$
$y^2w'ct^6; +; Mod(mdg4)^{u1}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{CyO}{TM6B,Tb}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{CyO}{TM6B,Tb}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{CyO}{TM6B,Tb}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{CyO}{TM6B,Tb}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{dxnp^2}{Mod(mdg4)^{u1}}$
$y^2w'ct^6; +; Mod(mdg4)^{u1}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{CyO}{TM6B,Tb}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{CyO}{TM6B,Tb}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{CyO}{TM6B,Tb}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{CyO}{TM6B,Tb}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{dxnp^2}{Mod(mdg4)^{u1}}$
$y^2w'ct^6; +; Mod(mdg4)^{u1}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{CyO}{TM6B,Tb}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{CyO}{TM6B,Tb}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{CyO}{TM6B,Tb}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{CyO}{TM6B,Tb}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{dxnp^2}{Mod(mdg4)^{u1}}$
$y^2w'ct^6; +; Mod(mdg4)^{u1}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{CyO}{TM6B,Tb}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{CyO}{TM6B,Tb}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{CyO}{TM6B,Tb}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{CyO}{TM6B,Tb}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{dxnp^2}{Mod(mdg4)^{u1}}$

**Cruza 1:** Para obtener este genotipo se tomaron machos del stock  $dAdd1^2/CyO; dxnp^2/TM6B, Tb$  y se cruzaron con hembras vírgenes del stock  $Mod(mdg4)^{u1}/Mod(mdg4)^{u1}$  (Bloomington #59960).

- 1) Descartar todos los individuos que no tengan TM6B, Tb (Gris)
- 2) Tomar hembras doble-balancer (Coral) y cruzarlas con machos de genotipo  $Cf; TM6B, Tb$  (Azul) (Generar línea 1)
- 3) Tomar machos doble-balancer (Verde) y cruzarlos con hembras de genotipo  $TM6B, TB$  (Rosa) (Generar línea 2)

**Obtención del genotipo:**  $\frac{y^2w'ct^6}{Y}$ ;  $\frac{dAdd1^2}{dAdd1^2}$ ;  $\frac{TM6B, Tb}{Mod(mdg4)^{u1}}$  +  $\left( \frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6} \right)$   $\frac{Y}{Y}$   $\frac{CyO}{Mod(mdg4)^{u1}}$   $\frac{TM6B, Tb}{Mod(mdg4)^{u1}}$   $\frac{X}{X}$   $\frac{Y}{Y}$   $\frac{dAdd1^2}{dAdd1^2}$ ;  $\frac{TM6B, Tb}{Mod(mdg4)^{u1}}$

	$Y; dAdd1^2; TM6B, Tb$	$Y; dAdd1^2; Mod(mdg4)^{u1}$	$y^2w'ct^6; +; Mod(mdg4)^{u1}$	$y^2w'ct^6; +; TM6B, Tb$
$Y'w; CyO; TM6B, Tb$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{CyO}; \frac{TM6B, Tb}{TM6B, Tb}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{CyO}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{TM6B, Tb}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6} + \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{CyO}; \frac{TM6B, Tb}{TM6B, Tb}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6} + \frac{TM6B, Tb}{CyO}; \frac{TM6B, Tb}{TM6B, Tb}$
$Y'w; CyO; Mod(mdg4)^{u1}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{CyO}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{CyO}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6} + \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{CyO}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6} + \frac{TM6B, Tb}{CyO}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$
$y^2w'ct^6; +; Mod(mdg4)^{u1}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{+}; \frac{TM6B, Tb}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{+}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6} + \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{+}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6} + \frac{TM6B, Tb}{+}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$
$y^2w'ct^6; +; TM6B, Tb$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{+}; \frac{TM6B, Tb}{TM6B, Tb}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{+}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{TM6B, Tb}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6}; \frac{+}{+}; \frac{TM6B, Tb}{TM6B, Tb}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6}; \frac{+}{+}; \frac{TM6B, Tb}{TM6B, Tb}$
	$Y; +; TM6B, Tb$			
$Y'w; +; TM6B, Tb$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{+}{+}; \frac{TM6B, Tb}{TM6B, Tb}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{+}{+}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{TM6B, Tb}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{+}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{+}; \frac{TM6B, Tb}{TM6B, Tb}$
$Y'w; +; Mod(mdg4)^{u1}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{+}{+}; \frac{TM6B, Tb}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{+}{+}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{+}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{+}; \frac{TM6B, Tb}{Mod(mdg4)^{u1}}$
$y^2w'ct^6; CyO; Mod(mdg4)^{u1}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{+}{CyO}; \frac{TM6B, Tb}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{+}{CyO}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{CyO}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{CyO}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$
$y^2w'ct^6; CyO; TM6B, Tb$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{+}{CyO}; \frac{TM6B, Tb}{TM6B, Tb}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6}; \frac{+}{CyO}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{TM6B, Tb}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{CyO}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{TM6B, Tb}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{CyO}; \frac{TM6B, Tb}{TM6B, Tb}$

**Línea 1**

- 1) Separar machos de hembras
- 2) En hembras, las que tengan genotipo TM6B, Tb/TM6B, Tb son inviábiles (Rojo)
- 3) Descartar hembras que no tengan fenotipo CyO (Gris)
- 4) Descartar hembras que no tengan fenotipo C<sup>+</sup> (Verde)
- 5) Apartar y conservar vírgenes hembras de genotipo C<sup>+</sup>/C<sup>+</sup>; dAdd1<sup>2</sup>/CyO; Mod<sup>u1</sup>/Mod<sup>u1</sup> (Coral)
- 6) En machos, los que tengan genotipo TM6B, Tb/TM6B, Tb son inviábiles (Rojo)
- 7) Descartar machos que no tengan fenotipo CyO (Gris) y machos doble-balancer con fenotipo C<sup>+</sup> (Verde)
- 8) Apartar y conservar machos doble-balancer sin fenotipo C<sup>+</sup> (Azul)

Obtención del genotipo:  $\frac{y^2w'ct^6}{Y} ; \frac{dAdd1^2}{dAdd1^2} ; \frac{TM6B, Tb}{Mod(mdg4)^{u1}}$  +  $\frac{Y}{y^2w'ct^6} ; \frac{TM6B, Tb}{Mod(mdg4)^{u1}}$

$\left( \frac{y^2w'ct^6}{Y} ; \frac{dAdd1^2}{dAdd1^2} ; \frac{TM6B, Tb}{Mod(mdg4)^{u1}} \right) \times \left( \frac{Y}{y^2w'ct^6} ; \frac{CyO}{Mod(mdg4)^{u1}} ; \frac{TM6B, Tb}{Mod(mdg4)^{u1}} \right)$

	Y; CyO; TM6B, Tb	Y; CyO; Mod(mdg4) <sup>u1</sup>	Y <sup>2</sup> w'ct <sup>6</sup> ; +; Mod(mdg4) <sup>u1</sup>	Y <sup>2</sup> w'ct <sup>6</sup> ; +; TM6B, Tb
$y^2w'ct^6$ ; +; TM6B, Tb	$\frac{Y}{y^2w'ct^6} ; \frac{CyO}{dAdd1^2} ; \frac{TM6B, Tb}{TM6B, Tb}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6} ; \frac{CyO}{dAdd1^2} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{TM6B, Tb}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{dAdd1^2} ; \frac{TM6B, Tb}{TM6B, Tb}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6} ; \frac{TM6B, Tb}{dAdd1^2} ; \frac{TM6B, Tb}{TM6B, Tb}$
$y^2w'ct^6$ ; +; Mod(mdg4) <sup>u1</sup>	$\frac{Y}{y^2w'ct^6} ; \frac{CyO}{dAdd1^2} ; \frac{TM6B, Tb}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6} ; \frac{CyO}{dAdd1^2} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{dAdd1^2} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6} ; \frac{TM6B, Tb}{dAdd1^2} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$
$y^2w'ct^6$ ; +; TM6B, Tb	$\frac{Y}{y^2w'ct^6} ; \frac{CyO}{dAdd1^2} ; \frac{TM6B, Tb}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6} ; \frac{CyO}{dAdd1^2} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{dAdd1^2} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6} ; \frac{TM6B, Tb}{dAdd1^2} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$
	Y; +; TM6B, Tb	Y; +; Mod(mdg4) <sup>u1</sup>	Y <sup>2</sup> w'ct <sup>6</sup> ; CyO; Mod(mdg4) <sup>u1</sup>	Y <sup>2</sup> w'ct <sup>6</sup> ; CyO; TM6B, Tb
$y^2w'ct^6$ ; +; TM6B, Tb	$\frac{Y}{y^2w'ct^6} ; \frac{TM6B, Tb}{TM6B, Tb}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{TM6B, Tb}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6} ; \frac{CyO}{Mod(mdg4)^{u1}} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{TM6B, Tb}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6} ; \frac{TM6B, Tb}{dAdd1^2} ; \frac{TM6B, Tb}{TM6B, Tb}$
$y^2w'ct^6$ ; +; Mod(mdg4) <sup>u1</sup>	$\frac{Y}{y^2w'ct^6} ; \frac{TM6B, Tb}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6} ; \frac{TM6B, Tb}{Mod(mdg4)^{u1}} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$
$y^2w'ct^6$ ; dAdd1 <sup>2</sup> ; Mod(mdg4) <sup>u1</sup>	$\frac{Y}{y^2w'ct^6} ; \frac{TM6B, Tb}{dAdd1^2} ; \frac{TM6B, Tb}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{dAdd1^2} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{dAdd1^2} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6} ; \frac{TM6B, Tb}{dAdd1^2} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$
$y^2w'ct^6$ ; dAdd1 <sup>2</sup> ; TM6B, Tb	$\frac{Y}{y^2w'ct^6} ; \frac{TM6B, Tb}{dAdd1^2} ; \frac{TM6B, Tb}{TM6B, Tb}$	$\frac{Y}{y^2w'ct^6} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{dAdd1^2} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{TM6B, Tb}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{dAdd1^2} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{TM6B, Tb}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6} ; \frac{TM6B, Tb}{dAdd1^2} ; \frac{TM6B, Tb}{TM6B, Tb}$

### Línea 2:

- 1) Separar machos de hembras
- 2) En hembras, las que tengan genotipo TM6B, Tb/TM6B, Tb son inviábiles (Rojo)
- 3) Descartar hembras que no tengan fenotipo CyO (Gris)
- 4) Descartar hembras que no tengan fenotipo Cf<sup>6</sup> (Verde)
- 5) Apartar y conservar vírgenes hembras de genotipo Cf<sup>6</sup>/Cf<sup>6</sup>; dAdd1<sup>2</sup>/CyO; Mod<sup>u1</sup>/Mod<sup>u1</sup> (Coral)

$$\text{Obtención del genotipo: } \frac{y^2w'ct^6}{Y} ; \frac{dAdd1^2}{dAdd1^2} ; \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{u1}} + \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{u1}} \quad X \quad \frac{Y}{y^2w'ct^6} ; \frac{dAdd1^2}{CyO} ; \frac{dAdd1^2}{Mod(mdg4)^{u1}} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{TM6B,Tb}$$

	Y; dAdd1 <sup>2</sup> ; Mod(mdg4) <sup>u1</sup>	Y; dAdd1 <sup>2</sup> ; TM6B, Tb	<u>Y</u> ; CyO; TM6B, Tb	<u>Y</u> 'w; CyO; Mod(mdg4) <sup>u1</sup>
y <sup>2</sup> w'ct <sup>6</sup> ; dAdd1 <sup>2</sup> ; Mod(mdg4) <sup>u1</sup>	<u>Y</u> ; $\frac{dAdd1^2}{y^2w'ct^6} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{dAdd1^2} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	<u>Y</u> ; $\frac{dAdd1^2}{y^2w'ct^6} ; \frac{TM6B, Tb}{dAdd1^2} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	<u>Y</u> ; $\frac{dAdd1^2}{y^2w'ct^6} ; \frac{TM6B, Tb}{dAdd1^2} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	<u>Y</u> 'w ; $\frac{dAdd1^2}{y^2w'ct^6} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{dAdd1^2} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$
y <sup>2</sup> w'ct <sup>6</sup> ; dAdd1 <sup>2</sup> ; Mod(mdg4) <sup>u1</sup>	<u>Y</u> ; $\frac{dAdd1^2}{y^2w'ct^6} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{dAdd1^2} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	<u>Y</u> ; $\frac{dAdd1^2}{y^2w'ct^6} ; \frac{TM6B, Tb}{dAdd1^2} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	<u>Y</u> ; $\frac{dAdd1^2}{y^2w'ct^6} ; \frac{TM6B, Tb}{dAdd1^2} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	<u>Y</u> 'w ; $\frac{dAdd1^2}{y^2w'ct^6} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{dAdd1^2} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$
y <sup>2</sup> w'ct <sup>6</sup> ; CyO; Mod(mdg4) <sup>u1</sup>	<u>Y</u> ; $\frac{dAdd1^2}{y^2w'ct^6} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{CyO} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	<u>Y</u> ; $\frac{dAdd1^2}{y^2w'ct^6} ; \frac{TM6B, Tb}{CyO} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	<u>Y</u> ; $\frac{dAdd1^2}{y^2w'ct^6} ; \frac{TM6B, Tb}{CyO} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	<u>Y</u> 'w ; $\frac{dAdd1^2}{y^2w'ct^6} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{CyO} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$
y <sup>2</sup> w'ct <sup>6</sup> ; CyO; Mod(mdg4) <sup>u1</sup>	<u>Y</u> ; $\frac{dAdd1^2}{y^2w'ct^6} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{CyO} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	<u>Y</u> ; $\frac{dAdd1^2}{y^2w'ct^6} ; \frac{TM6B, Tb}{CyO} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	<u>Y</u> ; $\frac{dAdd1^2}{y^2w'ct^6} ; \frac{TM6B, Tb}{CyO} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	<u>Y</u> 'w ; $\frac{dAdd1^2}{y^2w'ct^6} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{CyO} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$
	<u>Y</u> ; CyO; Mod(mdg4) <sup>u1</sup>	<u>Y</u> ; CyO; TM6B, Tb	<u>Y</u> ; CyO; TM6B, Tb	<u>Y</u> 'w; dAdd1 <sup>2</sup> ; Mod(mdg4) <sup>u1</sup>
y <sup>2</sup> w'ct <sup>6</sup> ; CyO; Mod(mdg4) <sup>u</sup>	<u>Y</u> ; $\frac{CyO}{y^2w'ct^6} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{CyO} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	<u>Y</u> ; $\frac{CyO}{y^2w'ct^6} ; \frac{TM6B, Tb}{Mod(mdg4)^{u1}} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	<u>Y</u> ; $\frac{dAdd1^2}{y^2w'ct^6} ; \frac{TM6B, Tb}{CyO} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	<u>Y</u> 'w ; $\frac{dAdd1^2}{y^2w'ct^6} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{CyO} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$
y <sup>2</sup> w'ct <sup>6</sup> ; CyO; Mod(mdg4) <sup>u1</sup>	<u>Y</u> ; $\frac{CyO}{y^2w'ct^6} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{CyO} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	<u>Y</u> ; $\frac{CyO}{y^2w'ct^6} ; \frac{TM6B, Tb}{Mod(mdg4)^{u1}} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	<u>Y</u> ; $\frac{dAdd1^2}{y^2w'ct^6} ; \frac{TM6B, Tb}{CyO} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	<u>Y</u> 'w ; $\frac{dAdd1^2}{y^2w'ct^6} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{CyO} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$
y <sup>2</sup> w'ct <sup>6</sup> ; dAdd1 <sup>2</sup> ; Mod(mdg4) <sup>u1</sup>	<u>Y</u> ; $\frac{CyO}{y^2w'ct^6} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{dAdd1^2} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	<u>Y</u> ; $\frac{CyO}{y^2w'ct^6} ; \frac{TM6B, Tb}{dAdd1^2} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	<u>Y</u> ; $\frac{dAdd1^2}{y^2w'ct^6} ; \frac{TM6B, Tb}{dAdd1^2} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	<u>Y</u> 'w ; $\frac{dAdd1^2}{y^2w'ct^6} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{dAdd1^2} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$

**Cruza 2:** Esta progenie se obtiene cruzando hermanos de la línea 1 (Azul) y (Coral)

- 1) Las hembras y machos, las que tengan genotipo CyO/CyO son inviábiles (Rojo)
- 2) Descartar machos que tengan fenotipo CyO (Gris)
- 3) Descartar machos que tengan fenotipo TM6B, Tb (Verde)
- 4) Quedarse con los machos que no tengan balancers (Azul)

$$\text{Obtención del genotipo: } \frac{y^2w'ct^6}{Y} ; \frac{dAdd1^2}{dAdd1^2} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}} + \frac{Y}{y^2w'ct^6} ; \frac{dAdd1^2}{dAdd1^2} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}} \quad \mathbf{X} \quad \frac{Y}{y^2w'ct^6} ; \frac{dAdd1^2}{dAdd1^2} ; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$$

$y^2w'ct^6; dAdd1^2; Mod(mdg4)^{u1}$	$Y; dAdd1^2; Mod(mdg4)^{u1}$	$y^2w'ct^6; dAdd1^2; Mod(mdg4)^{u1}$	$y^2w'ct^6; dAdd1^2; Mod(mdg4)^{u1}$	$y^2w'ct^6; dAdd1^2; Mod(mdg4)^{u1}$
$y^2w'ct^6; dAdd1^2; Mod(mdg4)^{u1}$	$Y \frac{dAdd1^2}{y^2w'ct^6}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{dAdd1^2}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$Y \frac{dAdd1^2}{y^2w'ct^6}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{dAdd1^2}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$Y \frac{dAdd1^2}{y^2w'ct^6}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{dAdd1^2}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{dAdd1^2}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$
$y^2w'ct^6; dAdd1^2; Mod(mdg4)^{u1}$	$Y \frac{dAdd1^2}{y^2w'ct^6}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{dAdd1^2}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$Y \frac{dAdd1^2}{y^2w'ct^6}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{dAdd1^2}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$Y \frac{dAdd1^2}{y^2w'ct^6}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{dAdd1^2}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{dAdd1^2}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$
$y^2w'ct^6; CyO; Mod(mdg4)^{u1}$	$Y \frac{dAdd1^2}{y^2w'ct^6}; \frac{CyO}{CyO}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$Y \frac{dAdd1^2}{y^2w'ct^6}; \frac{CyO}{CyO}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$Y \frac{dAdd1^2}{y^2w'ct^6}; \frac{CyO}{CyO}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{dAdd1^2}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$
$y^2w'ct^6; CyO; Mod(mdg4)^{u1}$	$Y \frac{dAdd1^2}{y^2w'ct^6}; \frac{CyO}{CyO}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$Y \frac{dAdd1^2}{y^2w'ct^6}; \frac{CyO}{CyO}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$Y \frac{dAdd1^2}{y^2w'ct^6}; \frac{CyO}{CyO}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{dAdd1^2}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$
$y^2w'ct^6; dAdd1^2; Mod(mdg4)^{u1}$	$Y; dAdd1^2; Mod(mdg4)^{u1}$	$y^2w'ct^6; dAdd1^2; Mod(mdg4)^{u1}$	$y^2w'ct^6; dAdd1^2; Mod(mdg4)^{u1}$	$y^2w'ct^6; dAdd1^2; Mod(mdg4)^{u1}$
$y^2w'ct^6; dAdd1^2; Mod(mdg4)^{u1}$	$Y \frac{dAdd1^2}{y^2w'ct^6}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{dAdd1^2}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$Y \frac{dAdd1^2}{y^2w'ct^6}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{dAdd1^2}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$Y \frac{dAdd1^2}{y^2w'ct^6}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{dAdd1^2}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{dAdd1^2}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$
$y^2w'ct^6; dAdd1^2; Mod(mdg4)^{u1}$	$Y \frac{dAdd1^2}{y^2w'ct^6}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{dAdd1^2}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$Y \frac{dAdd1^2}{y^2w'ct^6}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{dAdd1^2}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$Y \frac{dAdd1^2}{y^2w'ct^6}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{dAdd1^2}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{dAdd1^2}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$
$y^2w'ct^6; CyO; Mod(mdg4)^{u1}$	$Y \frac{dAdd1^2}{y^2w'ct^6}; \frac{CyO}{CyO}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$Y \frac{dAdd1^2}{y^2w'ct^6}; \frac{CyO}{CyO}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$Y \frac{dAdd1^2}{y^2w'ct^6}; \frac{CyO}{CyO}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$	$\frac{y^2w'ct^6}{y^2w'ct^6}; \frac{dAdd1^2}{dAdd1^2}; \frac{Mod(mdg4)^{u1}}{Mod(mdg4)^{u1}}$

**Cruza 3:** Esta progenie se obtiene al cruzar los machos obtenidos de la cruz 2 (Azul) y las hembras generadas en la línea 2 (Coral)

- 1) Se obtiene una línea estable.