



Centro de
Investigación en
Dinámica Celular



Instituto de
Investigación en
Ciencias
Básicas y
Aplicadas

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y
APLICADAS

Área Terminal en Bioquímica y Biología Molecular

Determinación de la interacción (o formación de un complejo) entre dADD1, dXNP y proteínas de arquitectura Mod(mdg4) y CTCF en tejidos en proliferación de *Drosophila melanogaster*

TESIS

QUE PRESENTA:

ZAZIL RENEE VELAZQUEZ SOLIS

Para obtener el Grado de
LICENCIADO EN CIENCIAS

Director de la Tesis:

Dra. Viviana del Carmen Valadez Graham (IBT)

Sinodales:

Presidente: Dra. Carmen Nina Pastor Colón (CIDC)

Secretario: Dra. Verónica Mercedes Narváez Padilla (CIDC)

CUERNAVACA, MORELOS

DICIEMBRE 2022

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, le doy gracias a la Universidad Autónoma del Estado de Morelos por permitirme estudiar la carrera en sus instalaciones.

A todos los buenos doctores que tuve como profesores, quienes me otorgaron los conocimientos que me hicieron enamorarme de la ciencia.

Al Instituto de Biotecnología de la UNAM por permitirme utilizar sus instalaciones para llevar a cabo este proyecto. Así como el financiamiento DGAPA-PAPIIT/UNAM No. IN203521.

A la Dra. Viviana Valadez por aceptarme como alumna y recibirme en su equipo de trabajo, así como su tolerancia y enseñanzas.

A mi compañero de laboratorio Mauro, por enseñarme lo esencial para sobrevivir en el mundo de la ciencia y acompañarme en las largas jornadas de trabajo.

A mis padres, Matty y Rene por darme su cariño, comprensión y apoyo incondicional, desde que empecé este camino hace 4 años y medio.

A mi hermana, Yare, por soportarme y aligerar la tensión de la universidad con tan solo su presencia. Por ser mi compañera de clases en línea y distraerme en mis ratos libres.

A mi pareja, Zabid, por estar ahí siempre que lo necesité, animarme y no dejar que se me fuera la vida en trabajo. Gracias por mostrarme siempre la parte positiva de las cosas y brindarme las mejores experiencias.

A mis amigas Karen, Kass y Andy, por su comprensión y las pláticas de apoyo. Por los buenos ratos y sus consejos.

Y a todos mis compañeros de la universidad, en especial a mis amigos Jony, May y Sashe, que fueron mi pilar los primeros semestres de la carrera.

RESUMEN

El genoma nuclear en eucariontes está organizado en forma de un complejo ADN-proteínas llamado cromatina. Existen diferentes tipos de proteínas encargadas de su organización, empaquetamiento y estructura. Como, por ejemplo, los complejos remodeladores de cromatina. En humanos, la proteína ATRX es una subunidad que forma parte de la familia SWI/SNF2 de dichos complejos. Mutaciones en el gen que codifica a ATRX está asociado a un síndrome con el mismo nombre, donde los pacientes presentan problemas en el desarrollo, como pueden ser; anomalías craneofaciales y/o urogenitales, además de alfa talasemia. ATRX es una proteína con una función conservada en la evolución, en *Drosophila melanogaster* existen dos genes que codifican dos proteínas que contienen los dominios conservados de ATRX; las proteínas dAdd1 y dXNP. Las cuales pueden realizar una función equiparable a la proteína en humanos. Ensayos de ChIP-seq en células embrionarias mostraron que dAdd1 co-localiza en el 70% de los sitios con las proteínas de arquitectura, como Mod(mdg4), dCTCF y CP190. Además, existen datos de doble híbrido que sugieren la interacción entre dXNP y Mod(mdg4). Lo anterior sugiere que diversas proteínas de arquitectura pudieran formar complejos con diferentes proteínas remodeladoras de la cromatina.

En este estudio se determinó mediante ensayos de co-inmunoprecipitación en extractos proteicos nucleares de embriones, que dAdd1 y Mod(mdg4) pueden formar complejos. Por otra parte, dXNP_L no co-inmunoprecipita con Mod(mdg4) ni dCTCF, lo cual sugiere que dichas proteínas no se encuentran en un mismo complejo. Finalmente, por medio de inmunofluorescencias en discos imagales de ala, pata y halterio, obtenidos a partir de larvas de tercer instar, se encontró que dAdd1, dXNP, dCTCF y CP190 presentan una distribución ubicua, lo que sugiere que estas proteínas participan en la especificación de todos los compartimentos en dichos discos para dar origen a las estructuras del cuerpo del adulto.

Índice

1. Introducción.....	1
1.1 Organización del genoma	1
1.2 Niveles de organización de la cromatina	2
1.2.1 Nucleosomas y Clutches de nucleosomas	3
1.2.2 Loops de cromatina.....	3
1.2.3 Dominios topológicamente asociados (TADs).....	4
1.2.4 Compartimentos A/B.....	5
1.2.5 Territorios cromosómicos	5
1.3 Proteínas de arquitectura	6
1.3.1 dCTCF.....	7
1.4 Proteínas de arquitectura en <i>D. melanogaster</i>	8
1.4.1 Mod(mdg4).....	9
1.4.2 CP190	10
1.5 Insulator bodies.....	10
1.6 Complejos remodeladores de la cromatina	11
1.6.1 ATRX en mamíferos.....	12
1.6.2 dAdd1 y dXNP	13
1.7 Relación entre remodeladores de cromatina y proteínas estructurales.....	14
2 Antecedentes	14
3. Objetivo	16
3.1 Objetivo general.....	16
3.2 Objetivos particulares	16
4. Hipótesis.....	16
5. Justificación.....	16
6. Metodología	17
6.1 Co-inmunoprecipitaciones (Co-IP)	17
6.1.1 Extracción de proteínas nucleares	17
6.1.2 Co-IP	17
6.1.3 Transferencia y revelado	18
6.2 Inmunofluorescencia en discos imagales	18
7. Resultados y discusión	19

7.1	dAdd1 y Mod(mdg4) forman complejos	20
7.2	dAdd1 y dCTCF no se encuentran en los mismos complejos	22
7.3	dXNP y Mod(mdg4) no se encuentran en los mismos complejos	23
7.4	dXNP y dCTCF no se encuentran en los mismos complejos	24
7.5	Localización ubicua de dAdd1 y dCTCF en discos imagales	25
8.	Conclusiones	29
9.	Perspectivas.....	29
10.	Referencias	30
11.	Anexo.....	32
11.1	Anexo 1. Soluciones.....	32
11.1.1	Soluciones para la extracción de proteínas nucleares	32
11.1.2	Soluciones para Co-IP.....	33
11.1.3	Soluciones para inmunofluorescencias en discos imagales	33
11.2	Anexo 2. Anticuerpos	34
11.3	Anexo 3. Isoformas de Mod(mdg4).....	34
11.4	Anexo 4. Alineamiento de las proteínas SuUR y XNP _L	35
11.5	Anexo 5. Inmunofluorescencias y Mocks	36

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

A	Amperes
ADD	ATRX-DNMT3-DNMT3L
ATRX protein	Alpha Thalassemia and mental Retardation Syndrome X related
BEAF-32	Boundary element-associated factor of 32kDa
BTB/POZ finger	Bric-a-brac, Tramtrack and Broad complex/ Poxvirus and Zing
ChIP-seq	Chromatin Immunoprecipitation Sequencing
CP190	Centrosomal Protein 190kD
CTCF	Factor de unión a CCCTC
DAXX	Death Domain Associated Protein
DD	Dimerization Domain
DREF	DNA Related Element Factor
dXNP	<i>Drosophila</i> X-linked Nuclear Protein
EAST	Enhanced Adult Sensory Threshold
EZH2	Enhancer de Zeste 2
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
HeT-A	Healing Transposon

HP1a	Heterochromatin Protein 1a
HTT	Het-A, TART & TAHRE
H3K9me3	Trimetilación de la lisina 9 de la histona H3
LTR	Long Terminal Repeat
MADF	myb-SANT-like domain in Adf1
MeCP2	Methyl-CpG Binding Protein 2
Mod(mdg4)	Modifier of mdg4
PSA	Persulfato de amonio
TAD	Topologically Associating Domain
TART	Telomere Associated Retrotransposon
TAHRE	Telomere Associated and Het-A Related
TERT	Telomeric Reverse Transcriptase
DSHB	Developmental Studies Hybridoma Bank
RAD21	Double-strand-break repair rad21 homolog
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SID	Supressor of Hairy Wing Interacting Domain
SMC	Structural Maintenance of Chromosome
SNF2	Sucrose Non-Fermentable 2

Su (var) Supresor de variegación

Su (Hw) Suppresor of Hairy wing

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Proteínas de arquitectura unión a ADN (Binding proteins, BP) y proteínas de arquitectura accesorias (PAA) identificadas en <i>D. melanogaster</i>	8
Tabla 2. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para inmunofluorescencias*	19
Tabla 3. Pesos, aminoácidos y nombres de las 31 isoformas de Mod(mdg4).	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Partes y composición del cromosoma mitótico	2
Figura 2. Mecanismos propuestos para la extrusión de loops por CTCF y cohesina.	4
Figura 3. Niveles de organización de la cromatina.	6
Figura 4. Funciones de las proteínas de arquitectura	7
Figura 5. Representación lineal de dCTCF (Modificado de flybase.org, 2022).	8
Figura 6. Representación lineal de la isoforma de 67.2 kDa de Mod(mdg4)	9
Figura 7. Representación lineal de CP190	10
Figura 8. Funciones de elementos Insulator	11
Figura 9. Representación lineal de las dos isoformas de hATRX.	12
Figura 10. Representación lineal de las isoformas de dXNP y dAdd1	13
Figura 11. Complejo propuesto que incluye a PA y proteínas remodeladoras de la cromatina.	20
Figura 12. Representación de complejo esperado y anticuerpos utilizados	20
Figura 13. Co-IP entre Mod(mdg4) con dAdd1	21
Figura 14. Co-IP entre Mod(mdg4) con dAdd1	22
Figura 15. Co-IP de Mod(mdg4) con dXNP_L	23
Figura 16. Co-IP de dCTCF con dXNP_L	25
Figura 17. Inmunofluorescencia de dAdd1 y HP1 en discos imagales de ala, pata y halterio	27
Figura 18. Inmunofluorescencia de dCTCF y CP190 en discos imagales de ala, pata y halterio	28
Figura 19. Pliegues del disco de ala varían señal de fluorescencia	29
Figura 20. Alineamiento de aminoácidos de las proteínas SuUR y dXNP	36
Figura 21. Patrón de expresión de cut en inmunofluorescencia.	36
Figura 22. Inmunofluorescencia de dXNP y HP1 en discos pata y halterio	37
Figura 23. Alexa Fluor 488 anti rabbit y Alexa Fluor 568 anti mouse	38

1. Introducción

1.1 Organización del genoma

El genoma en eucariontes está organizado en un complejo de DNA-proteínas llamado “cromatina”, la cual está contenida dentro del núcleo. La cromatina tiene un papel estructural que está intrínsecamente relacionado con la expresión y/o la regulación génica (Gayon, 2016).

Actualmente, está demostrado que la cromatina puede adoptar dos configuraciones diferentes; la primera, es conocida como eucromatina, que se refiere al estado en el que la cromatina se encuentra menos condensada, y por lo general los genes se encuentran activados; la segunda configuración es conocida como heterocromatina, la cual se caracteriza por presentar un tiempo de replicación tardío, tener un alto grado de compactación, poseer regiones repetitivas y presenta modificaciones post-traduccionales de histonas (HPTMs), como por ejemplo, la di o tri-metilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9me2/3) y metilación del ADN (Mistelli, 2020; Williamson & Pinto, 2017)

Existen dos tipos de heterocromatina en células: la heterocromatina facultativa, que está regulada de tal manera que, en determinado periodo del ciclo celular, se puedan expresar los genes que contiene; en cambio la heterocromatina constitutiva, no presenta este cambio de expresión, sino que, en su gran mayoría, se mantiene con una estructura que promueve el silenciamiento de sus secuencias (Fraser *et al.*, 2015).

En la división celular, el material genético de la célula se acomoda de una manera distinta. El cromosoma mitótico, es la estructura en la que se encuentra el material genético durante la mitosis. Su estructura incluye: el centrómero, cromátidas (con un brazo largo y uno pequeño) y los telómeros (Buchwalter *et al.*, 2019) .

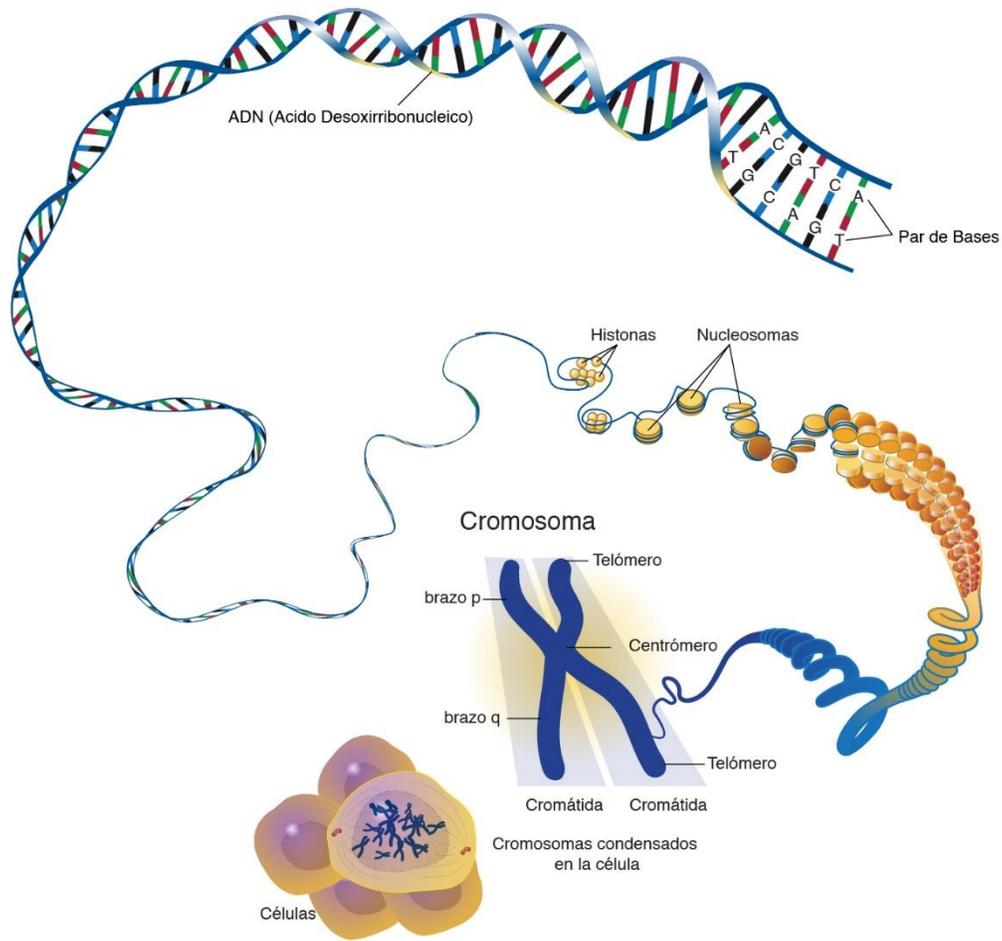


Figura 1. Partes y composición del cromosoma mitótico (obtenida del sitio web: genome.gov/es/genetics-glossary/Cromosoma#)(National Human Genome Research Institute, n.d.)

1.2 Niveles de organización de la cromatina

En un cromosoma en interfase, se ha observado que existen diferentes niveles de organización de forma jerárquica. En el nivel más basal de compactación se encuentra la doble hélice de ADN interactuando con un octámero de histonas (tetramero de histonas H3 y H4, unidas por dos dímeros H2A-H2B), que en conjunto forman estructuras llamadas nucleosomas,

donde se enrollan aproximadamente 146 pares de bases (pb) en 1.6 vueltas (Williamson & Pinto, 2017).

1.2.1 Nucleosomas y Clutches de nucleosomas

Se ha observado que los nucleosomas forman grupos que carecen de una estructura organizada. Estas estructuras fueron denominadas “clutches de nucleosomas”, en los que el número de nucleosomas de cada clutch es variable y se intercalan con regiones con pocos nucleosomas (Magaña-Acosta & Valadez-Graham, 2020; Ricci *et al.*, 2015).

Los nucleosomas pueden tener modificaciones postraduccionales, las cuales pueden ser reconocidas por distintos complejos proteicos que se encargan de remodelar o mantener la cromatina (Magaña-Acosta & Valadez-Graham, 2020).

1.2.2 Loops de cromatina

En un nivel de compactación a mayor escala, se ha observado que se forman estructuras en forma de bucle, los cuales se denominan “Loops de la cromatina”. Estos loops regulan la expresión génica facilitando el contacto directo entre diferentes elementos reguladores, como podría ser un contacto enhancer-promotor o silencer-promotor (Rowley & Corces, 2018).

Diversos estudios, han mostrado que existen ciertas diferencias respecto a los loops de la cromatina en diferentes organismos. Por ejemplo; en mamíferos se ha observado que es necesaria la presencia de dos proteínas, una proteína de arquitectura (PA) llamada CTCF (CCCTC-binding factor), junto al complejo de las cohesinas. Mientras que en otros organismos como *Drosophila melanogaster* se ha observado que CTCF no es esencial para la formación de los loops, pues no se ha observado gran afectación en la formación de loops a falta de esta proteína (Rowley *et al.*, 2017; Rowley & Corces, 2018).

Dichos loops se ha observado que podrían formarse mediante un proceso que ha sido denominado como “loop extrusion” por uno o varios mecanismos

que no son mutuamente excluyentes, donde el complejo de cohesinas (formadas por las subunidades SMC1, SMC3 y RAD21), es reclutado al ADN el cual comienza a pasar a través del anillo de cohesina hasta que se obstruye el paso por la presencia de CTCF (Rowley & Corces, 2018).

Los mecanismos sugeridos para la extrusión pueden ser: a) Mediante la formación de un gradiente de varias cohesinas, b) por la actividad motora de la cohesina mediante la hidrólisis del ATP, c) la cohesina es empujada por RNAPII (Rowley & Corces, 2018) (Figura 2)

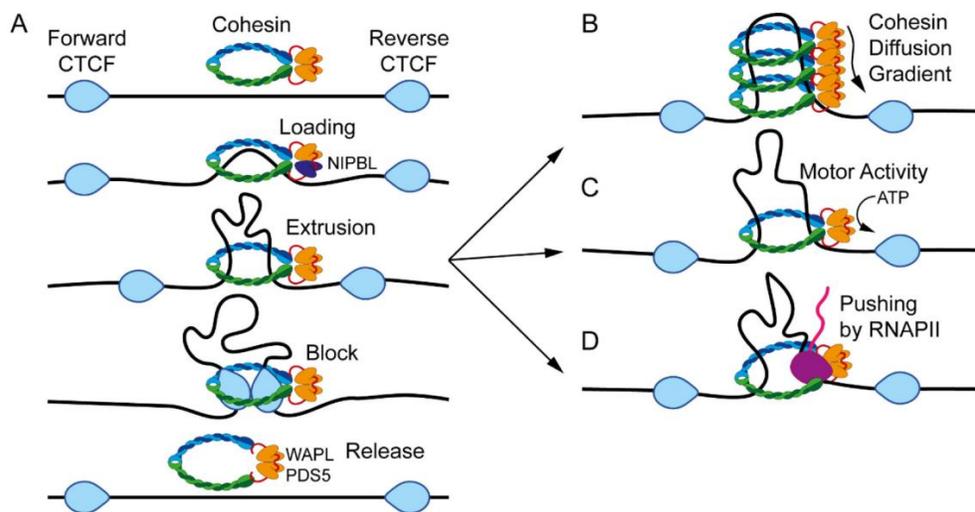


Figura 2. Mecanismos propuestos para la extrusión de loops por CTCF y cohesina (Tomado de Rowley & Corces, 2018).

1.2.3 Dominios topológicamente asociados (TADs)

Con el avance de análisis bioinformáticos acoplados a secuenciación, se encontró la existencia de estructuras a nivel de megabases (Mb), que son denominadas como “TADs” (Topological Associated Domains). Dichas estructuras están, en su mayoría, delimitadas por proteínas de arquitectura (PA), cuyas secuencias presentan interacciones con regiones que se encuentran en el mismo TAD, mientras que hay poca o nula interacción entre regiones de diferentes TADs (Rowley & Corces, 2018).

En vertebrados, estos dominios se ven mayormente delimitados por sitios de unión a CTCF. Existe un subconjunto de TADs (o dominios compartimentales), donde sus interacciones se ven promovidas por el acercamiento de dos secuencias por CTCF, pero también tiene la capacidad de disminuir la interacción entre dos dominios (Rowley & Corces, 2018).

1.2.4 Compartimentos A/B

En un nivel de compactación mayor, se han descrito la existencia de los llamados “compartimentos” que se pueden clasificar como tipo “A” y tipo “B”. Los compartimentos de tipo A se caracterizan por tener una mayor proporción de genes que son transcritos y sus regiones presentan altos niveles de HPTMs asociadas a la activación transcripcional.

Por otro lado, en los compartimentos de tipo “B”, la mayoría de los genes contenidos están inactivos y las modificaciones de histonas que posee son, en su mayoría de represión transcripcional (Rowley & Corces, 2018).

1.2.5 Territorios cromosómicos

Por último, se ha descrito la existencia de los denominados, “territorios cromosómicos”, donde se ha observado que cada cromosoma ocupa un espacio determinado dentro del núcleo, ya que los cromosomas con baja densidad génica se encuentran preferencialmente en la periferia del núcleo, mientras que los que poseen mayor densidad génica tienden a localizarse en regiones centrales del núcleo (Rowley & Corces, 2018).

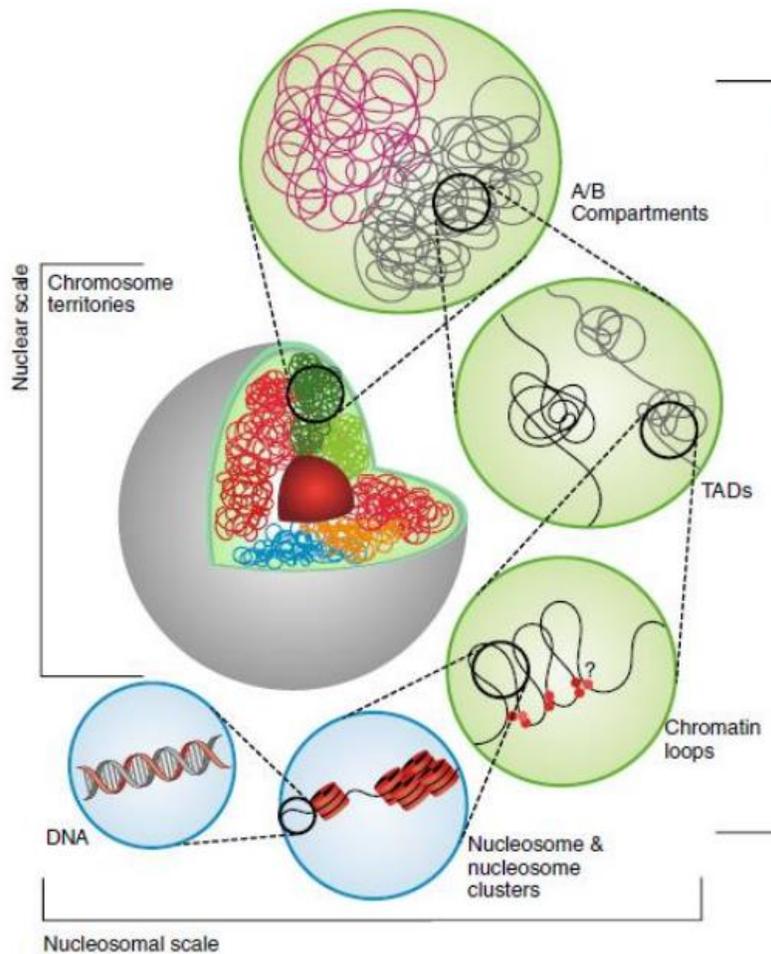


Figura 3. Niveles de organización de la cromatina (Tomado de Meyer-Nava, 2021).

1.3 Proteínas de arquitectura

Las PA fueron nombradas de esa manera, debido a que presentan una serie de funciones relacionadas con la organización y la función del genoma. Entre sus funciones están: 1) La actividad de bloqueo de enhancer, 2) actividad de barrera o insulador (delimitan regiones de heterocromatina de eucromatina) y 3) la formación de loops de la cromatina (Figura 4).

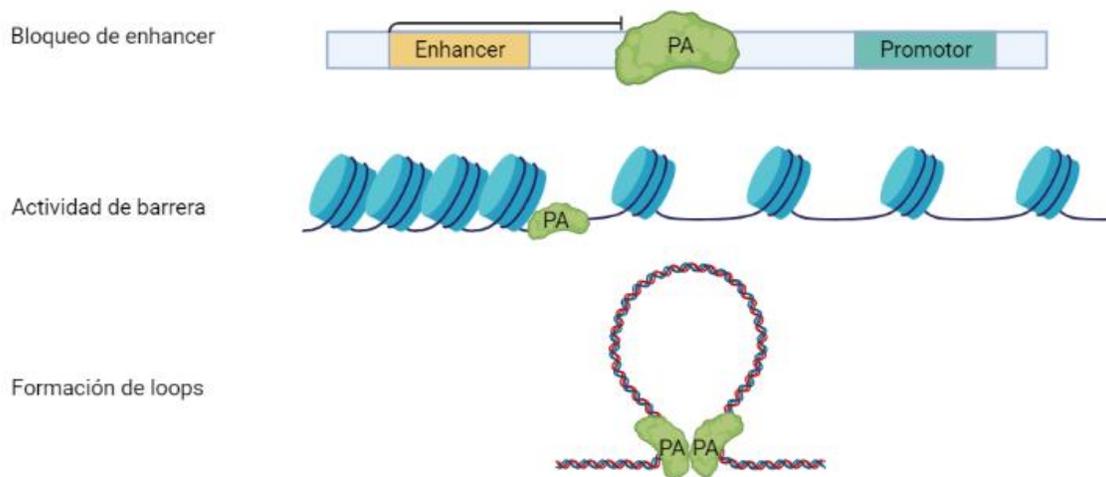


Figura 4. Funciones de las proteínas de arquitectura

A pesar de que las funciones de las PA se encuentran conservadas entre diferentes organismos, se sabe que existen ciertas diferencias en cuanto a la presencia de dichas proteínas. Por ejemplo, en vertebrados CTCF es reconocida como una proteína insulador pues se sabe forma parte de ciertos complejos de proteínas que, junto con una secuencia de ADN, delimitan las regiones de heterocromatina. Dicho complejo de proteínas-ADN se le conoce como *insulator bodies*, en los cuales, se encuentra abundantemente CTCF en el genoma de humano. CTCF está conservada en la evolución y es la proteína principal en la formación de loops de cromatina y en los límites entre TADs de vertebrados (Magaña-Acosta & Valadez-Graham, 2020).

CTCF tiene una región de 11 dedos de zinc, que está conservada en diferentes especies como en *D. melanogaster*. CTCF mediante estos dedos de zinc tiene la capacidad de unirse directamente al ADN, (Golovnin *et al.*, 2015).

1.3.1 dCTCF

dCTCF es el ortólogo en *D. melanogaster* de *CTCF*. Este gen codifica para una proteína de 93.1 kDa y tiene 11 dedos de zinc de tipo C2H2. *dCTCF* no es esencial para la formación de loops de cromatina, incluso se ha visto que hay complejos de cohesina que realizan su actividad, sin necesitar *dCTCF* (Misulovin *et al.*, 2008). Por otra parte, se ha determinado que *dCTCF* se

encuentra en regiones entre los límites de diferentes dominios, por lo que se le ha conferido la función de insulador (Magaña-Acosta & Valadez-Graham, 2020).

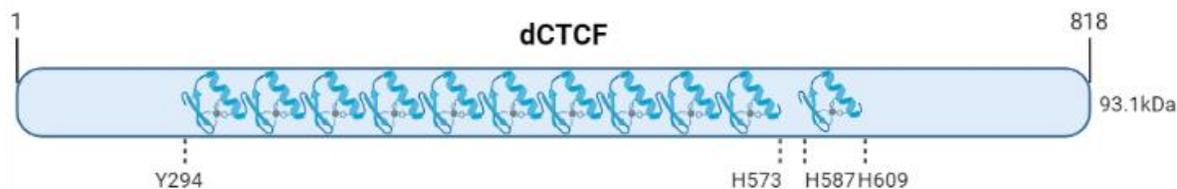


Figura 5. Representación lineal de dCTCF (Modificado de flybase.org, 2022).

Sin embargo, dCTCF no es la única proteína que participa en la formación de loops en este organismo.

1.4 Proteínas de arquitectura en *D. melanogaster*

A diferencia de los humanos, *D. melanogaster* presenta una gran variedad de PA. Como se mencionó anteriormente, dCTCF no es necesario para la formación de los loops de la cromatina. Sin embargo, dCTCF co-localiza con otras PA, como CP190, Mod (mdg4) y BEAF-32 (Bartkuhn *et al.*, 2009).

En *D. melanogaster*, se han identificado 11 proteínas de arquitectura de unión al ADN y 7 proteínas de arquitectura que no reconocen motivos de ADN, pero tienen un papel como proteínas accesorias (Bortle & Corces, 2012).

Tabla 1. Proteínas de arquitectura unión a ADN (Binding proteins, BP) y proteínas de arquitectura accesorias (PAA) identificadas en *D. melanogaster* (Modificado de Pauli *et al.*, 2016; Cubeñas-Potts & Corces, 2015).

Tipo	Proteína de arquitectura	Dominios conservados
BP	CTCF	zf-C2H2 [11]
	Su(Hw)	zf-C2H2 [12]
	BEAF-32	zf-BED [1], BESS [1]
	DREF	Zf-BED [1]
	TFIIIC	
	Z4 o Putzig	zf-C2H2 [7]
	Elba	BEN [1]
	Pita	zf-AD [1], BESS [1]

	ZIPIC	zf-C2H2 [7]
	Ibf1	zf-BED [1]
	Ibf2	zf-BED [1]
PAA	CP190	BTB [1], zf-C2H2[4]
	Mod(mdg4)	BTB [1], FLYWCH [1]
	Rad21	
	Cap-H2	
	Fs(1)h-L	
	L3mbt	
	Chromator o Chriz	

1.4.1 Mod(mdg4)

Mod(mdg4) es una proteína de arquitectura que no se encuentra en vertebrados y es considerada como una proteína accesoria debido a que no posee un dominio de unión a ADN. El gen *mod(mdg4)* codifica a 31 isoformas de la proteína, pero únicamente la isoforma de 67.2 kDa posee el dominio SID, que es esencial para su interacción con otra proteína de arquitectura llamada Supresor of Hairy-wing (*Su(Hw)*) y su presencia en los *insulator bodies*, los cuales son complejos de secuencias de ADN y proteínas de arquitectura, encargados del silenciamiento de retrotransposones en los telómeros de cromosomas (Golovnin *et al.*, 2015).

Mod(mdg4) está compuesto por los dominios BTB/POZ, FLYWCH, SID, un dominio rico en glutamina y un dominio de dimerización. Estos dominios se encuentran representados en la Figura 6 (Golovnin *et al.*, 2015).

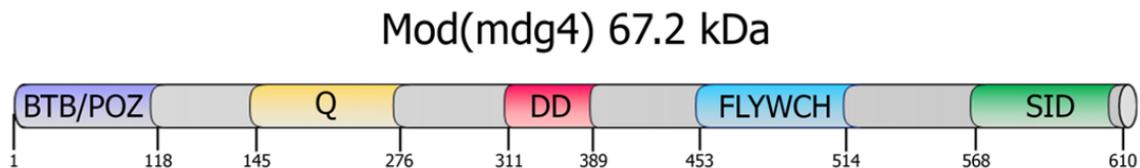


Figura 6. Representación lineal de la isoforma de 67.2 kDa de Mod(mdg4) (Tomado de Magaña-Acosta, 2020).

Se ha identificado como una proteína con actividad *insulator* que reprime los retrotransposones HeT-A en telómeros, en tejidos de células somáticas de

ovario y se ha encontrado que co-localiza con los *insulator bodies*, específicamente los que se encuentran silenciando al retrotransposón *gypsy* (Gerasimova *et al.*, 2007).

1.4.2 CP190

CP190 es otra PA que, al igual que dCTCF se encuentra en regiones entre límites de TADs; incluso ambos están presentes en regiones insulator de los genes que codifican al complejo Bithorax (Mohan *et al.*, 2007)

En cromosomas politénicos, se ha observado la presencia de CP190 en diversos sitios y tiene un papel esencial en el insulator de *gypsy*, pues a falta de CP190, las otras dos PA del insulator (Mod(mdg4) y Su(Hw)) no pueden formar *insulator bodies* (Chi-Yun Pai *et al.*, 2004).

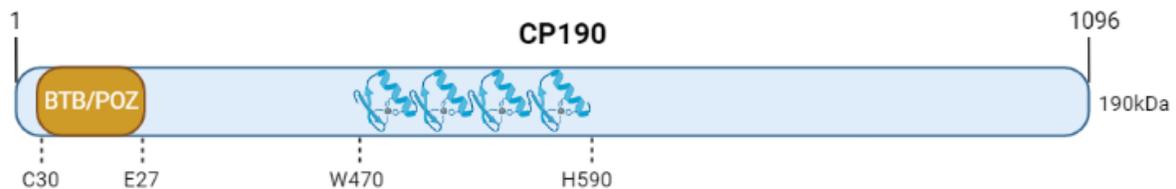


Figura 7. Representación lineal de CP190 (Modificado de Flybase, 2022).

1.5 Insulator bodies

Los *insulator bodies* son complejos de proteínas que se encuentran a lo largo de la cromatina y tienen la actividad de barrera. Se han encontrado en los bordes entre eucromatina y heterocromatina.

Además de las proteínas de arquitectura, existen secuencias dentro del genoma que son denominadas como *insulators*, que son reconocidos por proteínas de arquitectura. Estos elementos *insulator* tienen tres actividades biológicas: formación de loops de cromatina, actividad de bloqueo de enhancer y el bloqueo de la propagación de heterocromatina (Cavalheiro *et al.*, 2021).

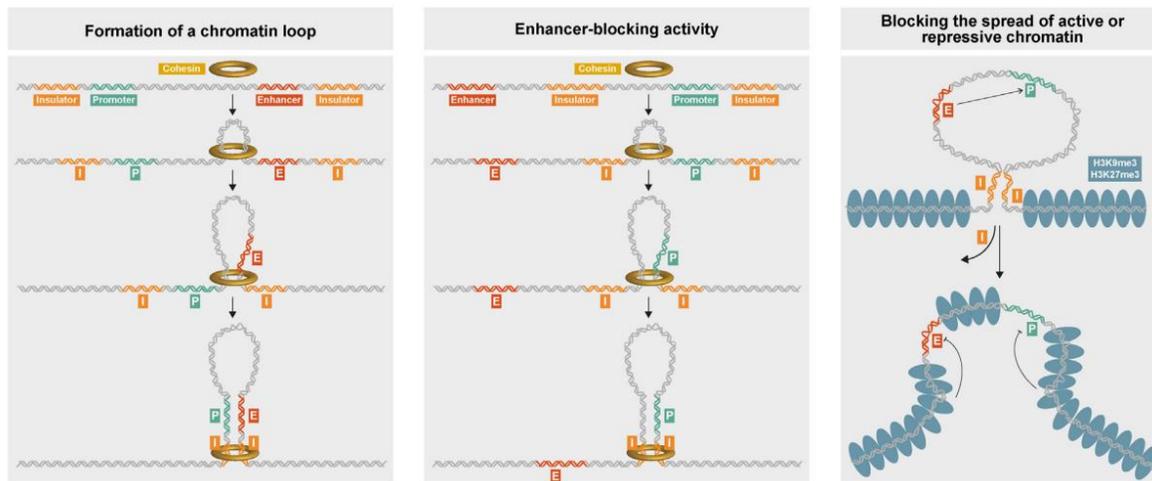


Figura 8. Funciones de elementos Insulator (Tomado de Cavalheiro *et al.*, 2021).

Cabe resaltar que en la Figura 8, solo se presentan elementos en cis, y solo la cohesina en trans, pero estos mecanismos requieren de otras PA. Las proteínas insulator, son proteínas de arquitectura capaces de intervenir en la propagación de la heterocromatización (Magaña-Acosta & Valadez-Graham, 2020).

Se ha propuesto que los *insulator bodies* que han sido observados en *D. melanogaster* son contactos del mismo dominio donde se encuentran interacciones con proteínas de arquitectura y proteínas involucradas en la transcripción (Rowley & Corces, 2018).

1.6 Complejos remodeladores de la cromatina

Los complejos remodeladores de la cromatina son complejos de proteínas nucleares, que tienen la finalidad de dar acceso al ADN, facilitando la transcripción o el reconocimiento de una secuencia de nucleótidos. Estas proteínas alteran temporalmente la estructura, posición o expulsión de nucleosomas utilizando el ATP para estas funciones (Magaña-Acosta & Valadez-Graham, 2020) .

Una proteína ampliamente conocida por su actividad en el establecimiento y mantenimiento de la heterocromatina, es HP1a (Heterochromatin Protein 1a),

la cual, es un ortólogo de la proteína de mamíferos CBX5, que es capaz de mantener el estado heterocromático por la actividad de su cromodominio que reconoce modificaciones postraduccionales en histonas, como H3K9me3. En mamíferos, CBX5 interactúa con ATRX, lo que da estabilidad a telómeros y regiones pericéntricas. ATRX es una proteína remodeladora de cromatina, cuyas mutaciones pueden causar el síndrome ATRX. (Chavez *et al.*, 2017).

1.6.1 ATRX en mamíferos

ATRX es una proteína remodeladora de la cromatina de vertebrados, que obtiene su nombre por el síndrome Alfa-talasemia con retraso mental ligado al cromosoma X. El gen que codifica a esta proteína es *hATRX* y se encuentra en el cromosoma X en la posición Xq13.1-q21.1 (López-Falcón *et al.*, 2014)

Esta proteína se clasificó como una proteína del grupo SNF2 por la similitud y conservación de sus dominios Helicasa y ATPasa (Picketts *et al.*, 1996). La proteína también posee un dominio ADD en su extremo amino terminal y el dominio Helicasa/ATPasa en el carboxilo. El dominio ADD promueve la unión a heterocromatina, al reconocer la marca H3K9me3, siempre y cuando la lisina 4 de la histona 3 no esté metilada; mientras que el dominio SNF tiene actividad de translocasa y de remodelador de cromatina (Chávez *et al.*, 2017).

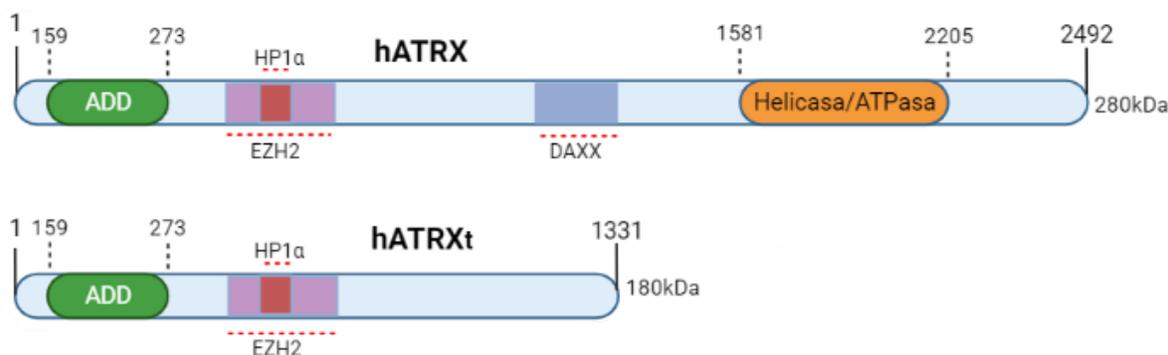


Figura 9. Representación lineal de las dos isoformas de hATRX (Modificado de Meyer-Nava, 2021; Magaña-Acosta, 2020).

ATRX interactúa con varias proteínas nucleares, como DAXX, HP1 y MeCP2. MeCP2 es esencial para la localización de ATRX en regiones de heterocromatina pericentromérica. Se ha determinado que al perder ATRX o

MeCP2, los sitios de unión a CTCF se encuentran más condensados, evitando la unión de esta proteína. Ahora se sabe que, en etapas tempranas del cerebro de ratón, ATRX reposiciona nucleosomas generando una región extendida para que CTCF sea capaz de unirse al ADN, para la formación de bucles junto con Cohesina (Kernohan *et al.*, 2014).

1.6.2 dAdd1 y dXNP

En *D. melanogaster* se tienen dos proteínas ortólogas de los dominios ADD y Helicasa/ATPasa de ATRX, dAdd1 y dXNP, respectivamente. El gen *dXNP* codifica para dos isoformas de la proteína, una larga de 148 kDa (XNP_L) y una corta de 119 kDa (XNP_S), dando lugar a la isoforma corta por un codón de inicio alternativo dentro del marco de lectura de la isoforma XNP_L. *dAdd1* codifica para 3 isoformas: dAdd1a, dAdd1b y dAdd1c. Estas isoformas se forman por splicing alternativo, y cabe mencionar que, a diferencia de la isoforma a, la isoforma b y c, poseen dominios MADF en su extremo C-terminal, que se considera podrían estar uniéndose al ADN, sin embargo, no se ha encontrado que tengan tal función (López-Falcón *et al.*, 2014).

El gen *dXNP* se encuentra en el cromosoma 3R, mientras que dAdd1 se localiza en el cromosoma 2R, esta separación facilita su estudio (López-Falcón *et al.*, 2014).

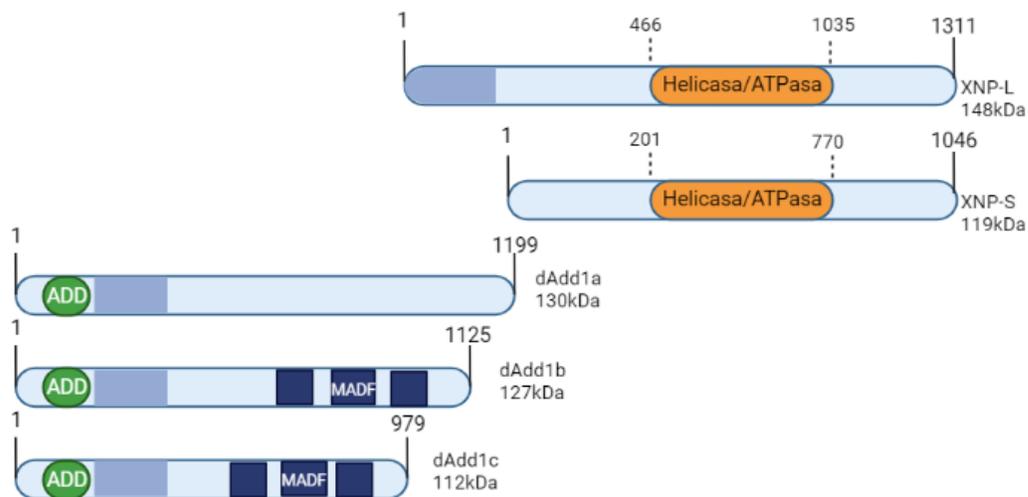


Figura 10. Representación lineal de las isoformas de dXNP y dAdd1 (Modificado de Meyer-Nava, 2021)

Saber la función de proteínas remodeladoras e insulador de la cromatina, es importante para la comprensión de los procesos estructurales y epigenéticos que sufre el material genético eucariote, sin embargo, no revela el mecanismo molecular por el cual las proteínas realizan dicha actividad. Para ello se debe conocer los complejos proteicos en las que las proteínas remodeladoras y de arquitectura participan.

1.7 Relación entre remodeladores de cromatina y proteínas estructurales

En diferentes estudios se ha determinado que proteínas de arquitectura y proteínas de remodelación de cromatina, trabajan en conjunto para su actividad.

Se sabe que, en mamíferos, específicamente en ratones, en etapas posteriores a la etapa embrionaria, ATRX es esencial para la unión de CTCF al ADN; Kernohan y sus colaboradores, sugieren que ATRX, después de ser reclutado por MeCP2, reposiciona nucleosomas y crea una región extendida para hacer posible la unión de CTCF, sin embargo, no se descarta la posibilidad de que CTCF se encuentre unida a ATRX (Kernohan *et al.*, 2014).

2 Antecedentes

En mamíferos, específicamente en ratones, en etapas posteriores a la etapa embrionaria, ATRX es esencial para la unión de CTCF al ADN; Kernohan y sus colaboradores, sugieren que ATRX, después de ser reclutado por MeCP2, reposiciona nucleosomas y crea una región extendida para hacer posible la unión de CTCF. (Kernohan *et al.*, 2014). Sabiendo que, ATRX es necesario para la unión de CTCF al ADN, no se descarta que CTCF y ATRX formen un complejo anterior a la remodelación de la cromatina.

En estudios anteriores se determinó que dAdd1 interactúa con dXNP, y co-localizan en regiones heterocromáticas junto a HP1a. En estudios de nuestro grupo de trabajo, se realizaron co-inmunoprecipitaciones para determinar la interacción entre dAdd1 y dXNP en *D. melanogaster*. Se utilizó el anticuerpo pan-Add, que reconoce las 3 isoformas de la proteína; y utilizaron un anticuerpo anti-dATRX_L para un ensayo recíproco. El extracto nuclear de

proteínas se obtuvo de embriones, mientras que el extracto total se obtuvo del tipo celular S2R+ que es derivado de embriones tardíos de entre 18-22 hrs (López-Falcón *et al.*, 2014).

En un estudio donde se observó el papel de dCTCF, Mod(mdg4) y CP190, en el control de los genes homeóticos del complejo Bithorax de *D. melanogaster* (*Ubx*, *Abd-A* y *Abd-B*), se determinó que dCTCF y Mod(mdg4) cooperan para promover la expresión del gen *Abd-B*, ya sea de forma directa o indirecta. (Savitsky *et al.*, 2016). *Abd-B* es un gen homeótico necesario para la especificación de la región posterior del abdomen, por lo que, la cooperación entre dCTCF y Mod(mdg4), para promover la expresión de un gen importante en el desarrollo, sugiere que ambas proteínas interactúan ya sea directa o indirectamente en tejidos en proliferación.

En células S2, dCTCF se co-localiza junto con Su(Hw) y Mod(mdg4)-67.2. En este mismo estudio, se obtuvieron resultados de co-inmunoprecipitación entre Su(Hw) y EAST (una proteína involucrada en la segregación cromosómica durante la división celular) los autores sugirieron que la formación de un complejo entre las proteínas CP190, Mod(mdg4)-67.2 y Su(Hw) (Golovnin *et al.*, 2015). La co-localización de dCTCF con Su(Hw) y Mod(mdg4), sugiere que hace agregados con estas proteínas insulator. Posteriormente sugirieron que el complejo formado por Su(Hw), CP190 y Mod(mdg4)-67.2, debía su localización en el ADN por la interacción entre CP190 y Mod(mdg4)-67.2, con proteínas que podían reconocer una secuencia en el ADN, como dCTCF; o ya sea proteínas capaces de reconocer marcas de histonas, como dAdd1 (Melnikova *et al.*, 2017).

En un estudio se determinó que dCTCF está presente en los mismos insulator bodies que las proteínas aislantes de *gypsy*. Donde se examinó el patrón de localización de dCTCF en núcleos de células de discos imagales. Esto sugiere que dCTCF también puede formar parte de estos insulator bodies. Cabe destacar que no hubo co-localización de dCTCF y Mod(mdg4)2.2 en cromosomas politénicos, sin embargo, en discos imagales, si co-localizan (Gerasimova *et al.*, 2007).

En este mismo estudio se analizó el efecto en la localización de dCTCF y Mod(mdg4) al mutar sus genes. En este análisis no se vio afectada la

presencia de ninguna de las dos proteínas, ni de CP190. Pero al mutar CP190; tanto dCTCF como Mod(mdg4) no son capaces de formar *insulator bodies* (Gerasimova *et al.*, 2007)

Datos no publicados del laboratorio, mostraron que en cromosomas politénicos de glándulas salivales de larvas del tercer estadio, la localización de dCTCF en el genoma depende en ocasiones de la presencia de dAdd1. Donde se encontró que en larvas de una línea wild type se observaba un patrón de localización de dCTCF mucho más frecuente que en los cromosomas politénicos de larvas de una línea nula de dAdd1. Cabe mencionar que se observó co-localización de dCTCF con dAdd1 en los cromosomas de la línea wild type.

3. Objetivo

3.1 Objetivo general

Determinar la interacción entre las proteínas dAdd1 y dXNP con las proteínas arquitecturales Mod(mdg4) y dCTCF.

3.2 Objetivos particulares

3.2.1 Determinar si dXNP y/o dAdd1 forman complejos con dCTCF y Mod(mdg4) en extractos proteicos de embriones de *Drosophila melanogaster*.

3.2.2 Evaluar la posible localización de los complejos en los discos imagales de larvas de tercer instar.

4. Hipótesis

Las proteínas remodeladoras de cromatina dAdd1 y dXNP forman un complejo con las proteínas de arquitectura Mod(mdg4) y dCTCF en células en proliferación de *Drosophila melanogaster*.

5. Justificación

Conocer si existe una interacción entre las proteínas remodeladoras de cromatina, dAdd1 y dXNP, con proteínas de arquitectura, dCTCF y

Mod(mdg4), permitirá determinar la presencia de un complejo involucrado en la formación de dominios en la organización de la cromatina. De la misma manera, será un avance en el conocimiento del proceso de organización de la cromatina dentro del núcleo.

6. Metodología

6.1 Co-inmunoprecipitaciones (Co-IP)

Este método se utiliza para estudiar interacciones proteína-proteína *in vitro* con la ayuda de anticuerpos que reconozcan las proteínas de interés. Si no existe un anticuerpo específico de la proteína, se puede modificar el extremo carboxilo o amino de la proteína adicionando etiquetas peptídicas que puedan ser reconocidas por anticuerpos (Lee, 2007).

6.1.1 Extracción de proteínas nucleares

Se ocupó 500 mg de embriones por Co-IP. Los embriones (de 0 a 24 horas) se decorionaron con una solución de hipoclorito al 50% durante 1 minuto y se lavaron con agua destilada hasta que desaparecía el olor a cloro, y a continuación se almacenaban los embriones congelados a -80°C.

Se homogenizaron los embriones con el buffer NB-1M (Ver Anexo 1), y se filtró con una membrana de Miracloth a 4°C. Se centrifugó a 4300 x g por 10 minutos, para separar la fracción nuclear, y descartar el sobrenadante. Los núcleos fueron re suspendidos en el buffer NB*1M (Ver Anexo 1), y se depositaron en otro tubo que contenía el buffer NB*-1.7M (Ver Anexo 1). La muestra se centrifugó a 19600 x g durante 30 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se le adicionó el buffer de lisis HBSMT (Ver Anexo 1), para después sonicar 3 ciclos de 30 segundos ON y 30 segundos OFF.

6.1.2 Co-IP

Se tomaron 8 µL de Dynabeads de proteína G y se colocaron en un tubo Eppendorf pre enfriado. Se realizaron 3 lavados con agitación a 4°C a las perlas de 10 min con 500 µL de Buffer IB (Ver Anexo 1). Se incubaron con agitación por 2 hrs a 4°C con 500 µL del Buffer de inmunoprecipitación para

incubación (IMPBI) (Ver Anexo 1) con el anticuerpo de interés. Se retiró el sobrenadante de las perlas y se incubó con el extracto de proteínas y buffer IMPBI en proporción 1:1 overnight (ON) con agitación.

Al día siguiente se corrió un gel de acrilamida al porcentaje adecuado para resolver las proteínas de interés. Se preparó la muestra lavando 3 veces por 10 min con 500 μ L de buffer IIMPBW (Ver Anexo 1). A continuación, se suspendieron las perlas en 30 μ L de buffer de carga. Se hirvió la muestra a 95°C por 10 min y se cargaron en el gel de acrilamida, para después correr la muestra a 90 V.

6.1.3 Transferencia y revelado

El gel de acrilamida se colocó en buffer de transferencia junto con una membrana de Fluoruro de polivinilideno (PVDF), previamente hidratada con metanol para hacerla hidrofílica. Se montó la cámara de transferencia y se transfiere por 2:30 hrs a 280 A. Terminada la transferencia, se tiñe la membrana con Ponceau por 10 min agitando, se destiñe con agua destilada y posteriormente se bloquea la membrana por 1 h en leche Carnation sin grasa (en polvo) al 10% en PBST (Tween al 0.05%). Se realizaron 3 lavados en agitación de 10 min en PBST y a continuación se incubó la membrana con el anticuerpo primario por 1 h en leche al 5% en PBST. Se lavó por triplicado con agitación durante 10 min en PBST, y se incubó con el anticuerpo secundario agitando durante 1 h en leche 5% en PBST. Nuevamente se lava 3 veces por 10 min con PBST y para el revelado se incubó 10 min con el kit revelador basado en luminol, Amersham ECL Select Western Blotting Detection Reagent.

6.2 Inmunofluorescencia en discos imagales

Para corroborar que el anticuerpo ingresaba al núcleo, se realizaron inmunofluorescencias. En un periodo de no más de 20 minutos, 12 larvas de tercer instar, se partían a la mitad y se volteaban para dejar expuestos los discos imagales, tanto las larvas enteras como las partidas, se mantenían en PBS 1X frío. Para fijar el tejido, se incubó 30 min en paraformaldehído (PFA) al 4% en un volumen total de 1mL, a temperatura ambiente (TA) y en agitación. Transcurrido este tiempo, se realiza un lavado con 500 μ L de PBST (0.2% Tritón + PBS 1X), y tres lavados con PBST de 15 min en agitación. Se bloqueó con BBT (0.2% Tritón + 0.3% BSA + 5% NaCl 5M + PBS 1X) por 1hr

a 4°C. Se incubó ON con el anticuerpo primario de interés en un volumen total de 50 µL con BBT.

Se hicieron 3 lavados con PBST de 20 min y se incubó con el anticuerpo secundario 2hr a TA en agitación. Tres lavados de 20 min con PBST, y se almacena en 50 µL del medio de montaje (Anexo 1).

Tabla 2. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para inmunofluorescencias*.

	Proteína 1	Proteína 2	Anticuerpo primario Proteína 1	Anticuerpo primario Proteína 2	Anticuerpo secundario Proteína 1	Anticuerpo secundario Proteína 2
1	dXNP	HP1a	α-dXNP rabbit	α-HP1a mouse	Alexa Fluor 488 anti rabbit	Alexa Fluor 568 anti mouse
2	dAdd1	HP1a	α- panAdd1 rabbit	α-HP1a mouse	Alexa Fluor 488 anti rabbit	Alexa Fluor 568 anti mouse
3	dCTCF	CP190	α- dCTCF rat	α- CP190 mouse	Alexa Fluor 488 anti rat	Alexa Fluor 568 anti mouse

*Ver Anexo 2 para información de los anticuerpos.

7. Resultados y discusión

Existen reportes que indican que la isoforma de 67.2 kDa de Mod(mdg4) forma un complejo junto a las PA CP190 y Su(Hw). Sin embargo, se ha propuesto que para el establecimiento de dicho complejo podrían participar otras proteínas que pudieran unirse directamente al ADN, o que reconozcan ciertas modificaciones post-traduccionales de histonas (Melnikova *et al.*, 2017). Existen reportes que indican que dCTCF es un interactor directo de CP190 (Kaushal *et al.*, 2021). Adicionalmente, el hecho que Mod(mdg4) 67.2 kDa tuvo una interacción genética con dAdd1 y dXNP (Magaña-Acosta, 2020) y que existen datos positivos de doble híbrido entre dXNP_L y Mod(mdg4), da pie a pensar que tienen la capacidad de formar uno o varios complejos (Figura 11).

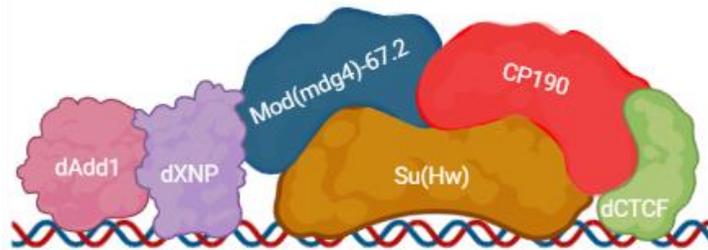


Figura 11. Complejo propuesto que incluye a PA y proteínas remodeladoras de la cromatina.

7.1 dAdd1 y Mod(mdg4) forman complejos

Para el ensayo de co-inmunoprecipitación se acopló a las perlas el anticuerpo primario panAdd que reconoce las 3 isoformas de la proteína dAdd1. En la figura 12 se ilustra las proteínas y los anticuerpos primarios y secundario que se utilizaron para obtener el resultado (Figura 13).

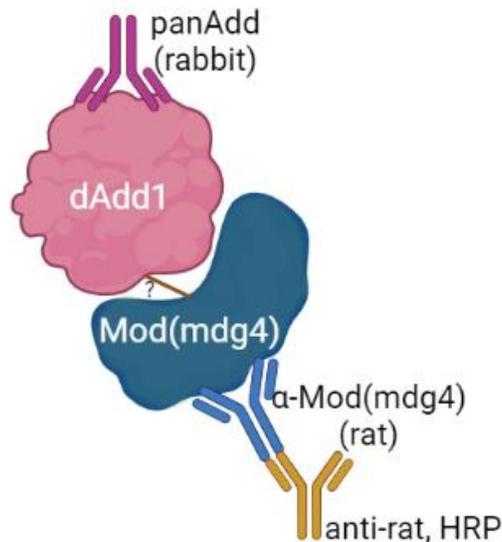


Figura 12. Representación de complejo esperado y anticuerpos utilizados

En la Figura 13 se muestra el resultado del ensayo de Co-IP entre Mod(mdg4) y dAdd1. Los carriles fueron revelados por pares, de los cuales el carril izquierdo representa el input, que es el 10% de la extracción de proteína nuclear, y de lado derecho se tiene la fracción de proteínas que fueron reconocidas por el anticuerpo que se encontraba acoplado a las perlas magnéticas.

El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular. Los carriles 2 y 3 son el control negativo, ya que se acopló a las perlas un anticuerpo irrelevante (IgG) para la IP. De los carriles 4 al 9 se muestra la IP realizada con el anticuerpo panAdd. Los carriles 4 y 5 son el control de la IP ya que se realizó un western contra sí mismo. En los carriles 6 y 7 se muestra el control positivo de la IP (dXNP) mientras que en los carriles 8 y 9 se presenta el resultado para Mod(mdg4).

Cabe destacar que en los carriles 2 y 3 hubo una contaminación del carril al cargar la muestra y se presentaron bandas en este control. Las bandas no señaladas es inespecificidad de los anticuerpos utilizados. Sin embargo, en cada carril de IP se observa una banda alrededor de 50kDa que corresponde a la cadena larga de la proteína G de las perlas.

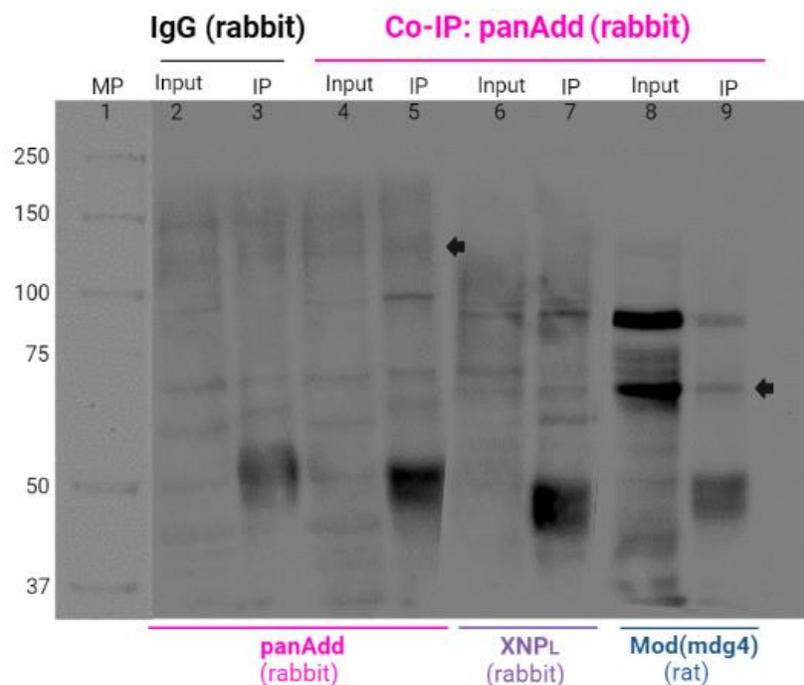


Figura 13. Co-IP entre Mod(mdg4) con dAdd1. Los carriles pares son los inputs (10%) mientras que los carriles impares son los westerns de la IP. En el carril 5 la flecha indica la banda correspondiente a dAdd1 (112-130 kDa). En el carril 9 la flecha señala una banda entre 50-75 kDa que se encuentra en el rango de peso de las isoformas de Mod(mdg4) (Anexo 3).

En ensayos anteriores del grupo de laboratorio, se observó el efecto de la mutación de la isoforma de 67.2 kDa, donde se determinó la interacción génica con la proteína dAdd1 (Magaña Acosta, 2020). Es por eso que se espera que la banda observada en la Co-IP represente a dicha isoforma.

Cabe mencionar que, en un estudio previo del equipo de laboratorio, se determinó que dAdd1 era necesario para el silenciamiento de la transcripción del retrotransposón HeT-A (Chávez *et al.*, 2017). Otro ensayo reveló que 3 isoformas de Mod(mdg4) (N, V y AF) son esenciales para el bloqueo de enhancer-promotor del retrotransposón HeT-A (Takeuchi *et al.*, 2022) lo que podría indicar que existe un complejo que incluye a dAdd1 y Mod(mdg4) que está involucrado en silenciamiento del retrotransposón HeT-A.

7.2 dAdd1 y dCTCF no se encuentran en los mismos complejos

En la figura 14 se muestra el resultado de la Co-IP entre dAdd1 y dCTCF. El primer carril es el marcador de peso molecular. El carril 2 y 3 es el input y la IP del control negativo, donde se reveló contra dAdd1. Los carriles 4 y 5 se revelaron con dAdd1. En los carriles 6 y 7 se reveló contra XNPL. Y en los últimos dos carriles (8 y 9) se tiene el resultado de la IP de dAdd1 con dCTCF.

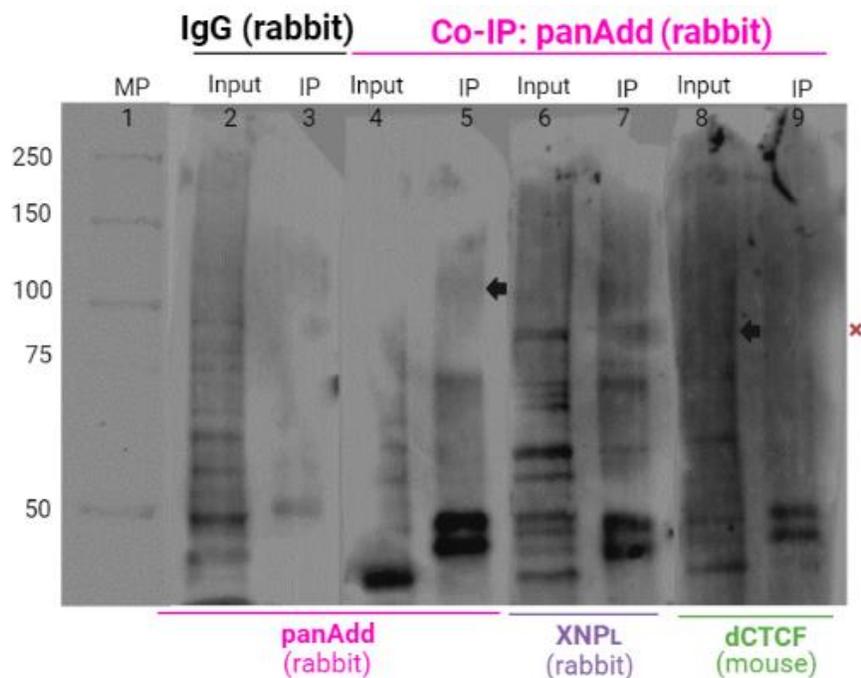


Figura 14. Co-IP entre Mod(mdg4) con dAdd1. Los carriles pares son los inputs (10%) mientras que los carriles impares son los westerns de la IP. En el carril 5 la flecha indica la banda correspondiente a dAdd1 (112-130 kDa). En el carril 9 la equis indica la ausencia de una banda cerca de los 100kDa donde se aprecia dCTCF en el input.

Como se había mencionado anteriormente, en ensayos de inmunofluorescencia en cromosomas politénicos se encontraba que la localización de dCTCF desaparecía en más del 50% de sus sitios en

mutantes nulas de la proteína dAdd1. Debido al resultado obtenido en las Co-IPs de este proyecto, se podría sugerir que esa dependencia de localización no dependa de la interacción por medio de un complejo entre la proteína dAdd1 y dCTCF, y promueve la hipótesis de que dAdd1 remodela la cromatina para que dCTCF pueda interactuar con sus sitios de unión al ADN, entre otras posibilidades.

7.3 dXNP y Mod(mdg4) no se encuentran en los mismos complejos

En la figura 15 se muestra el resultado de la Co-IP entre dXNP_L y Mod(mdg4). El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular. Los carriles 2 y 3 son el control negativo con la IP con el anticuerpo IgG. De los carriles 4 al 9 se muestra la IP obtenida con el anticuerpo de XNP_L donde los carriles 4 y 5 se revelaron contra XNP_L. En los carriles 6 y 7 se muestra el control positivo de la IP revelando con dAdd1. Por último, en los carriles 8 y 9 se observa el resultado para Mod(mdg4), donde a diferencia del input, no se observan bandas en el peso correspondiente de Mod(mdg4).

Como en el resultado anterior, prevalece en los carriles de la IP, la banda correspondiente a la cadena larga de la proteína G de las perlas.

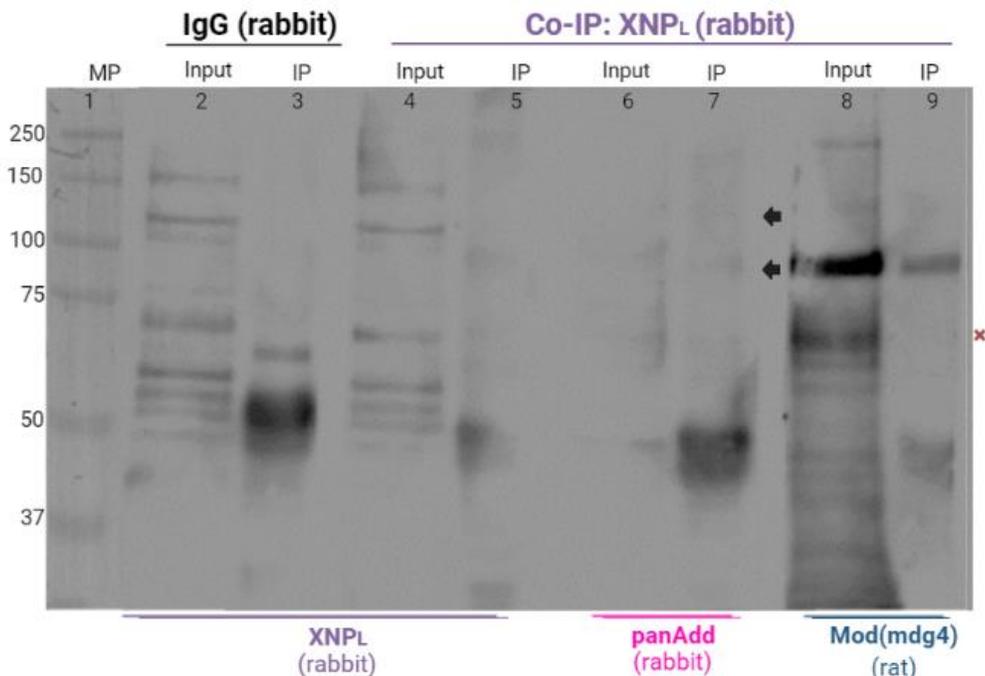


Figura 15. Co-IP de Mod(mdg4) con dXNP_L. Los carriles pares son el 10% del extracto proteico, mientras que los carriles impares son los westerns de la IP. En el carril 7 las flechas señalan las bandas que representan las diferentes isoformas de la proteína dAdd1 (112-

130 kDa). En el carril nueve la equis indica la ausencia de bandas entre 50-75 kDa, rango en el que se esperaba encontrar a Mod(mdg4).

Como conclusión, se puede observar que Mod(mdg4) no co-inmunoprecipita con dXNP en las condiciones en las que se realizó este ensayo. Estos resultados indican que dAdd1 y Mod(mdg4) pueden formar complejos en ausencia de dXNP. Dichos resultados difieren de lo obtenido en el ensayo de doble híbrido de dXNP y Mod(mdg4), donde se encontró que interactuaban directamente (datos no publicados). En un estudio reciente se observó que Mod(mdg4) con otra proteína de la familia SNF2 (SuUR), forma un complejo con función insulador (Andreyeva *et al.*, 2022), misma proteína que puede interactuar con HP1. dXNP_L es necesaria para posicionar a HP1 en regiones teloméricas, esto ocasiona heterocromatinización y se inhibe la transcripción de los transposones teloméricos que conforman el arreglo HTT, lo que describe una función similar a la del complejo SUMM4 (que contiene a SuUR y Mod(mdg4)). Sabiendo todo esto, es posible que el complejo que incluye a HP1 y dXNP, contenga una proteína de arquitectura que asemeje la función de Mod(mdg4), pero que sea más afín a dXNP, lo que explicaría por qué en ausencia de otras proteínas dXNP y Mod(mdg4) sí interactúan, o bien, que dXNP y Mod(mdg4) interactúen en otra etapa en el desarrollo del organismo. En el apartado 4 de Anexos, se muestra un alineamiento donde se pueden observar los dominios en común entre las proteínas SuUR y dXNP. Dada la semejanza en la secuencia de aminoácidos y su posible plegamiento similar, se puede sugerir que el dominio con el que dXNP interactúa con Mod(mdg4) se encuentre enmascarado o en interacción con otra proteína; y que la interacción de Mod(mdg4) con SuUR pudiese ser directa, entre otras posibilidades.

7.4 dXNP y dCTCF no se encuentran en los mismos complejos

En la figura 16 se muestra el resultado de la Co-IP entre dXNP_L y dCTCF. En el primer carril se presenta el marcador de peso molecular. Los carriles 2 y 3 corresponde al control negativo, y al igual que los carriles 4 y 5, fueron revelados contra dXNP. Los siguientes dos carriles (6 y 7) se revelaron contra dAdd1 como control positivo. Y en los últimos carriles, 8 y 9, se muestra el resultado para dCTCF.

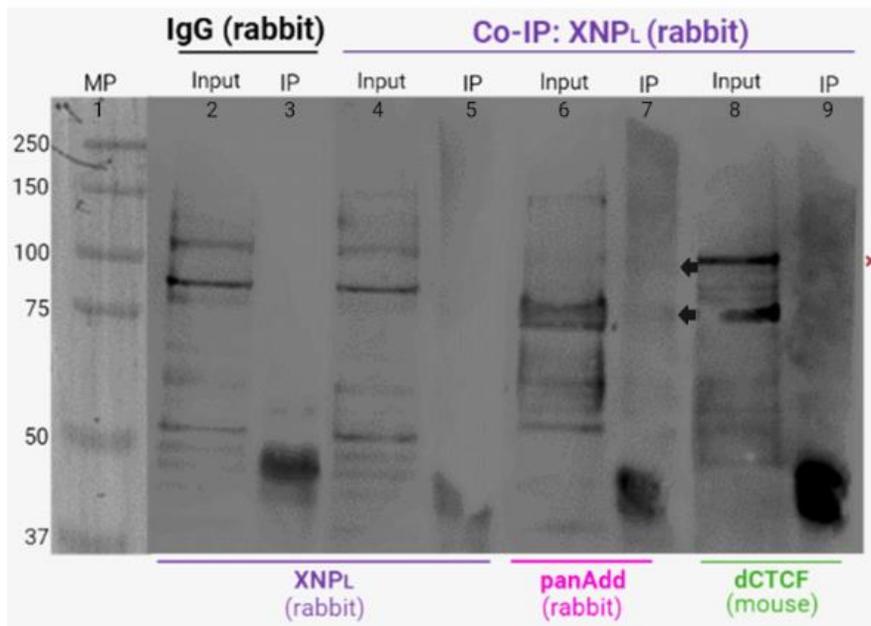


Figura 16. Co-IP de dCTCF con dXNP_L. En los carriles impares se revelaron los inputs, mientras que en los carriles pares se observa los westerns de la IP. En el carril 7 las flechas señalan las bandas correspondientes a dAdd1 (112-130 kDa). En el carril 9 la equis presenta la ausencia de una banda cerca de los 100 kDa observada en el input, que representa a dCTCF (93 kDa).

Se puede concluir que el o los complejos que se obtienen de la extracción de proteína nuclear precipitando a dXNP, no incluyen a dCTCF. Lo que indica nuevamente, que dXNP y dAdd1 no siempre forman parte de los mismos complejos.

Cabe mencionar, que dichos ensayos están enfocados en una etapa de desarrollo embrionaria, por lo que no se puede descartar la opción de que dXNP pueda formar complejos con estas proteínas de arquitectura en otra etapa del desarrollo de la mosca.

Para corroborar que el resultado de cada una de las Co-IPs presentadas era reproducible, se realizaron los ensayos por triplicado en diferentes condiciones, y el resultado de las IP's fue consistente.

7.5 Localización ubicua de dAdd1 y dCTCF en discos imagales

Sabiendo que la proteína dCTCF, podría formar complejos con una proteína remodeladora de la cromatina dAdd1, en la etapa embrionaria del desarrollo de la mosca, se puede considerar la posible formación de dichos complejos en otras etapas del desarrollo. En estudios siguientes se determinarán en qué

regiones de ciertos tejidos en desarrollo se localizan estos complejos. Algunos de los tejidos en proliferación que están caracterizados y estudiados por regiones, son los discos imagales. Por lo que es de suma importancia conocer los patrones de expresión de las proteínas en estos tejidos, es por ello, que se realizaron inmunofluorescencias de estas proteínas.

Para validar el protocolo de inmunofluorescencia, se realizó una prueba con la proteína cut en disco imagal de ala, dado a que se conoce su patrón de expresión. Dicho ensayo obtuvo el patrón de fluorescencia esperado. Esto indicó que el tejido se permeabiliza adecuadamente con el protocolo. Este ensayo se puede observar en el apartado 5 de Anexos.

Para comprobar que la señal observada se trata de la proteína de interés, se realizaron ensayos donde el tejido se trató de la misma manera, pero no se incubó con el anticuerpo primario, pues solo se incubaron con cada par de anticuerpos secundarios utilizados para las dobles inmunofluorescencias. Estos resultados se pueden observar en el apartado 5 de Anexos.

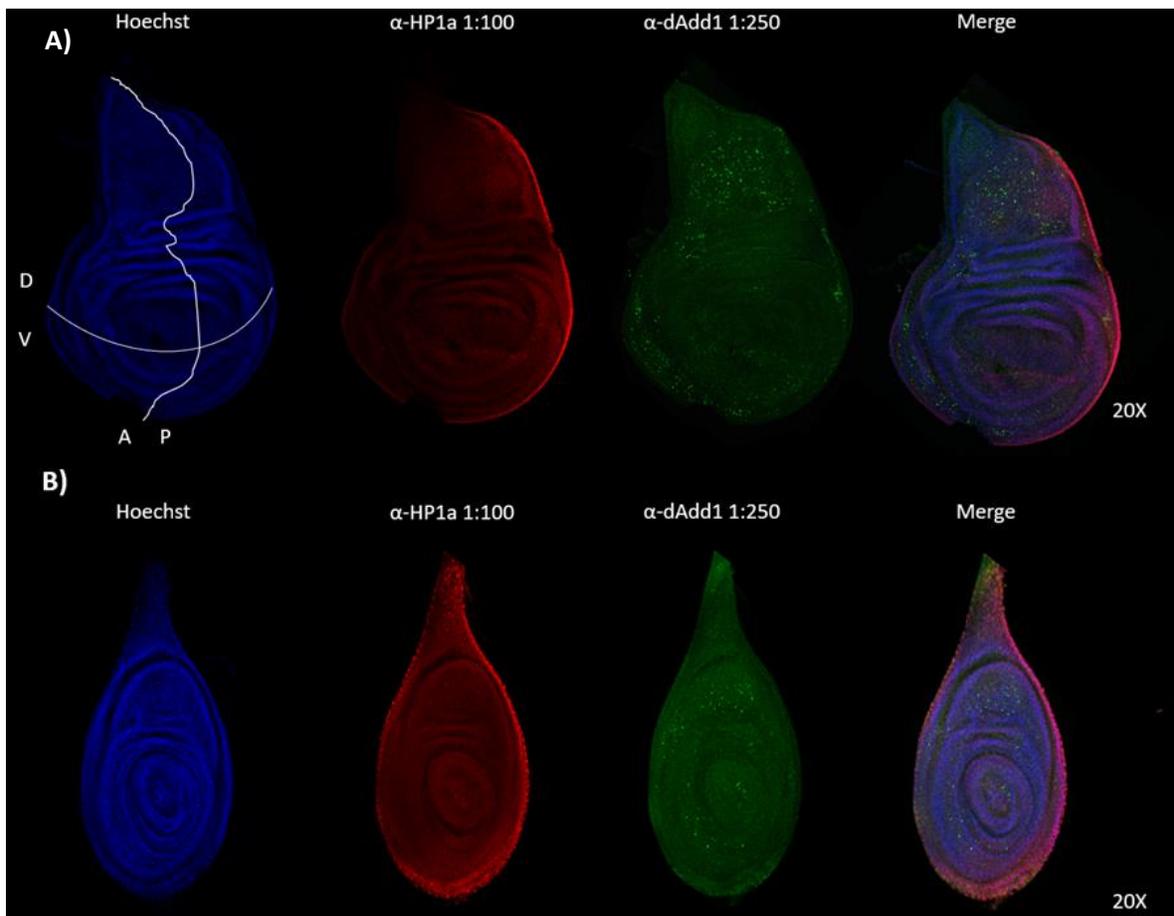


Figura 17. Inmunofluorescencia de dAdd1 y HP1 en discos imagales de ala, pata y halterio. A) Inmunofluorescencia en disco de ala B) Inmunofluorescencia en disco de pata.

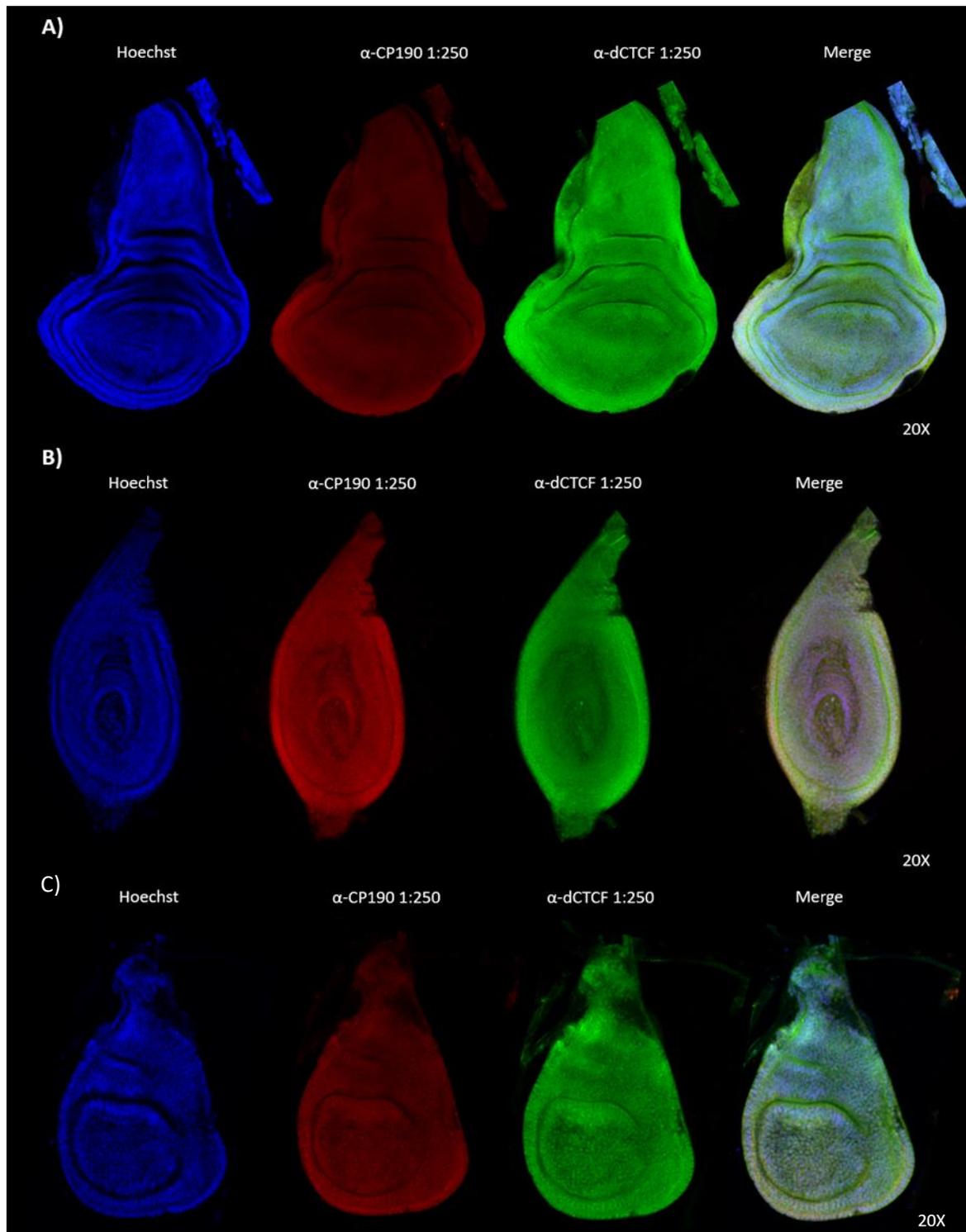


Figura 18. Inmunofluorescencia de dCTCF y CP190 en discos imagales de ala, pata y halterio. A) Inmunofluorescencia en disco de ala B) Inmunofluorescencia en disco de pata C) Inmunofluorescencia de disco de halterio.

Por otra parte, se observó el patrón de expresión de dXNP en discos imagales de ala, pata y halterio, cuyo resultado mostró, que al igual que dAdd1, se localiza de forma ubicua. Estas imágenes se encuentran en el apartado 3 de Anexos.

A pesar de que los ensayos de Co-IPs confirman la formación de complejos entre la proteína Add1 y Mod(mdg4), no se podría identificar la presencia o ausencia de estos complejos, con ensayos de inmunofluorescencia. En ensayos anteriores del equipo de laboratorio, se observó la presencia de dAdd1 y dXNP en el citoplasma de células de ovarios, cosa que no ocurría al observar el patrón de Mod(mdg4), el cual se localizaba en los núcleos (datos no publicados). Por lo que, es posible que en las regiones en los discos imagales donde dAdd1 y dXNP no co-localizan con HP1 y el Hoechst, sean regiones citoplásmicas, lo que podría indicar que estas proteínas pudieran tener alguna función fuera del núcleo o que en ese momento del desarrollo aún no hayan sido translocadas dentro del núcleo. Cabe mencionar que incluso las zonas en donde no se ve fluorescencia, era posible observar fluorescencia en otros focos, pues los discos no son estructuras planas, sin mencionar que sus células tienen diferentes formas, como, por ejemplo, las células del disco de ala. En la Figura 19.A, se puede observar de manera representativa las formas y la disposición de las células que componen el disco de ala. Los pliegues del disco de ala, señalados en la Figura 19.A con flechas de color rojo, son los sitios en los que menos se observa señal en las inmunofluorescencias. Sin embargo, estas mismas regiones en diferentes focos si presentan señal, como se puede apreciar en el inciso B) de la Figura 19.B donde se puede observar el mismo disco de ala visto en diferentes planos. Las flechas de color verde muestran los pliegues del disco, regiones donde no aparenta haber señal en la figura de lado izquierdo, sin embargo, en un enfoque más profundo se puede observar la señal (disco de ala de lado derecho). En cambio, existen regiones que a causa de la profundidad del enfoque se pierde la señal, justo como se indica con flechas rojas.

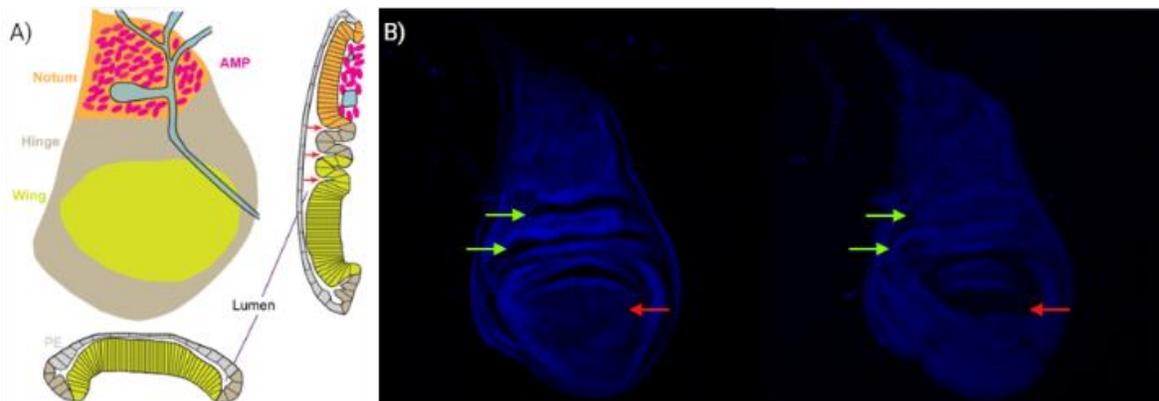


Figura 19. Pliegues del disco de ala varían señal de fluorescencia. A) Representación de pliegues y células que componen el disco de ala (Tomado de Tripathi & Irvine, 2022). B) Tinción con Hoechst de un disco de ala observado en diferentes focos.

Por otra parte, existen regiones donde se nota una mayor co-localización. En estudios posteriores se determinará la presencia o ausencia de estos complejos en estas regiones de co-localización.

8. Conclusiones

- dAdd1 se encuentra en complejos que no siempre incluyen a dXNP.
- dAdd1 se encuentra en complejos junto con la proteína de arquitectura Mod(mdg4), en las condiciones probadas.
- dXNP no forma complejos con las proteínas de arquitectura Mod(mdg4) y/o dCTCF, en las condiciones probadas.
- Las proteínas dXNP, dAdd1, dCTCF y CP190 se encuentran de forma ubicua en discos de ala, pata y halterio de *D. melanogaster*.

9. Perspectivas

- Se requiere realizar un ensayo un de Co-IP con un anticuerpo específico para la isoforma de 67.2 kDa de Mod(mdg4)
- Es necesario realizar co-inmunoprecipitaciones reciprocas para dAdd1-Mod(mdg4)
- Se propone realizar ensayos de co-inmunonprecipitaciones entre dAdd1 y Mod(mdg4) en un tratamiento con RNAsas para descartar la posibilidad de que el o los complejos puedan ser estabilizados por la presencia de RNAs.

- Debido a que los patrones de dAdd1, dXNP, y dCTCF resultaron ser ubicuos en los discos evaluados, sugiere realizar un ensayo de ligación por proximidad (PLA) para poder determinar si realmente existen complejos entre estas proteínas en estos tejidos, ya que este ensayo permite a su vez visualizar la localización de dichos complejos.

10. Referencias

- Andreyeva, E. N., Emelyanov, A. v., Nevil, M., Sun, L., Vershilova, E., Hill, C. A., Keogh, M.-C., Duronio, R. J., Skoultchi, A. I., & Fyodorov, D. v. (2022). Drosophila SUMM4 complex couples insulator function and DNA replication control. *ELife*.
- Bartkuhn, M., Straub, T., Herold, M., Herrmann, M., Rathke, C., Saumweber, H., Gilfillan, G. D., Becker, P. B., & Renkawitz, R. (2009). Active promoters and insulators are marked by the centrosomal protein 190. *EMBO J.*, 28, 877–888.
- Bortle, K. van, & Corces, V. G. (2012). Nuclear organization and genome function. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 28, 163–187.
- Buchwalter, A., Kaneshiro, J. M., & Hetzer, M. W. (2019). *Coaching from the sidelines: the nuclear periphery in genome regulation*.
- Cavalheiro, G. R., Pollex, T., & Furlong, E. E. (2021). To loop or not to loop: what is the role of TADs in enhancer function and gene regulation? *ELSEVIER*, 67, 119–129.
- Chavez, J., Murillo-Maldonado, J. M., Bahena, V., Cruz2, A. K., Castañeda-Sortibrán, A., Rodríguez-Arnaiz, R., Zurita, M., & Valadez-Graham, V. (2017). dAdd1 and dXNP prevent genome instability by maintaining HP1a localization at Drosophila telomeres. *CrossMark*, 697–712.
- Chi-Yun Pai, Lei, E. P., Ghosh, D., & Corces, V. G. (2004). The centrosomal protein CP190 is a component of the gypsy chromatin insulator. *Moll Cell*, 737–748.
- Cubeñas-Potts, C., & Corces, V. G. (2015). Architectural Proteins, Transcription, and the Three-dimensional Organization of the Genome. *PMC*.
- Eid, J.-P., Arias, A. M., Robertson, H., Hime, G. R., & Dziadek, M. (2008). Jean-Pierre Eid 1, Alfonso Martinez Arias, Hannah Robertson, Gary R Hime, Marie Dziadek. *BMC Dev Biol*.
- Fraser, J., Ferrai, C., Chiariello, A. M., Schueler, M., Rito, T., Laudanno, G., Barbieri, M., Moore, B. L., Kraemer, D. C., Aitken, S., Xie, S. Q., Morris, K. J., Itoh, M., Kawaji, H., Jaeger, I., Hayashizaki, Y., Carninci, P., & Forrest, A. R. (2015). Hierarchical folding and reorganization of chromosomes are linked to transcriptional changes in cellular differentiation. *Molecular Systems Biology*, 11.
- Gayon, J. (2016). From Mendel to epigenetics: History of genetics. *ELSEVIER*, 225–230.

- Gerasimova, T. I., Lei, E. P., Bushey, A. M., & Corces, V. G. (2007). Coordinated control of dCTCF and gypsy chromatin insulators in *Drosophila*. *PMC*, 761–772.
- Golovnin, A., Melnikova, L., Shapovalov, I., Kostyuchenko, M., & Georgiev, P. (2015). EAST Organizes *Drosophila* Insulator Proteins in the Interchromosomal Nuclear Compartment and Modulates CP190 Binding to Chromatin. *PLOS ONE*.
- Kaushal, A., Mohana, G., Dorier, J., Özdemir, I., Omer, A., Cousin, P., Semenova, A., Taschner, M., Dergai, O., Marzetta, F., Iseli, C., Eliaz, Y., Weisz, D., Shamim, M. S., Guex, N., Aiden, E. L., & Gambetta, M. C. (2021). CTCF loss has limited effects on global genome architecture in *Drosophila* despite critical regulatory functions. *Nature Communications*, 12.
- Kernohan, K. D., Vernimmen, D., Gloor, G. B., & Nathalie E, G. B. (2014). Analysis of neonatal brain lacking ATRX or MeCP2 reveals changes in nucleosome density, CTCF binding and chromatin looping. *Nucleic Acids Research*, 42(13), 8356–8368.
- Lee, C. (2007). Coimmunoprecipitation assay. In E. Rosato (Ed.), *Circadian rhythms: methods and protocols* (pp. 401–406).
- 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*.
- Magaña Acosta, M. de J. (2020). *Estudio de las interacciones genéticas de las proteínas dCTCF y Mod(mdg4) con Add1 y dXNP en Drosophila melanogaster*.
- Magaña-Acosta, M., & Valadez-Graham, V. (2020). Chromatin Remodelers in the 3D Nuclear Compartment. *Frontiers in Genetics*, 11.
- Mistelli, T. (2020). The self-organizing genome: Principles of genome architecture and function. *PMC*, 28–45.
- Misulovin, Z., Schwartz, Y. B., Li, X.-Y., Kahn, T. G., Gause, M., MacArthur, S., Fay, J. C., Eisen, M. B., Pirrotta, V., Biggin, M. D., & Dorsett, D. (2008). Association of cohesin and Nipped-B with transcriptionally active regions of the *Drosophila melanogaster* genome. *Chromosoma*, 117, 89–102.
- Mohan, M., Bartkuhn, M., Herold, M., Philippen, A., Heintz, N., Bardenhagen, I., Leers, J., White, R. A. H., Renkawitz-Pohl, R., Saumweber, H., & Renkawitz, R. (2007). The *Drosophila* insulator proteins CTCF and CP190 link enhancer blocking to body patterning. *PMC*.
- National Human Genome Research Institute. (n.d.). *CROMOSOMA*.
genome.gov/es/genetics-glossary/Cromosoma#
- Picketts, D. J., Higgs, D. R., Bachoo, S., Blake, D., Quarrell, O. W. J., & Gibbons, R. J. (1996). ATRX encodes a novel member of the SNF2 family of proteins: mutations

- point to a common mechanism underlying the ATR-X syndrome. *Human Molecular Genetics*, 5(12), 1899–1907.
- Ricci, M. A., Manzo, C., García-Parajo, M. F., Lakadamyali, M., & Cosma, M. P. (2015). Chromatin fibers are formed by heterogeneous groups of nucleosomes in vivo. *Cell*, 1145–1158.
- Rowley, M. J., & Corces, V. G. (2018). Organizational Principles of 3D Genome Architecture. *PMC*, 12, 789–800.
- Rowley, M. J., Nichols, M. H., Lyu, X., Ando-Kuri, M., M., I. S. R., Hermetz, K., Wang, P., Ruan, Y., & Corces, V. G. (2017). Evolutionarily Conserved Principles Predict 3D Chromatin Organization. *Mol Cell*, 837–852.
- Savitsky, M., Kim, M., Kravchuk, O., & Schwartz, Y. B. (2016). Distinct Roles of Chromatin Insulator Proteins in Control of the Drosophila Bithorax Complex. *Genetics Society of America*, 202, 601–617.
- Takeuchi, C., Yokoshi, M., Kondo, S., Shibuya, A., Saito, K., Fukaya, T., Siomi, H., & Iwasaki, Y. W. (2022). Mod(mdg4) variants repress telomeric retrotransposon HeT-A by blocking subtelomeric enhancers. *Nucleic Acids Research*, 50(20), 11580–11599.
- Tripathi, B. K., & Irvine, K. D. (2022). The wing imaginal disc. *GENETICS*, 220(4). <https://doi.org/10.1093/genetics/iyac020>
- Williamson, W. D., & Pinto, I. (2017). Histones and genome integrity. *Frontiers in Bioscience*, 17, 984–995.

11. Anexo

11.1 Anexo 1. Soluciones

11.1.1 Soluciones para la extracción de proteínas nucleares

- Buffer NB 4X (para 2 g de embriones, 4 mL)
 - Tris-HCl 100 mM (pH 7.4) – 2.4 mL
 - KCL 1000mM – 960 µL
 - MgCl₂ 1000mM – 80 µL
 - NaCl 5000 mM – 48 µL
 - Agua destilada – 512 µL

- Buffer NB-1M (para 2 g de embriones, 5 mL)
 - Buffer NB 4X – 1.25 mL
 - EGTA 10mM (pH 8) – 50 µL
 - DTT 10 mM – 250 µL
 - Sucrosa 2400mM – 2.083 mL

- Agua destilada – 1366.7 μ L
- Buffer NB*-1M (para 2 g de embriones, 2 mL)
 - Buffer NB 4X - 500 μ L
 - DTT 50 mM - 100 μ L
 - Sucrosa 2400 mM – 833.2 μ L
 - Agua destilada – 566.8 μ L
- Buffer NB*-1.7M (para 2 g de embriones, 2 mL)
 - Buffer NB 4X - 250 μ L
 - DTT 50 mM - 20 μ L
 - Sucrosa 2400 mM - 1.416 mL
 - Agua destilada - 63.34 μ L
- Buffer de lisis HBSMT (para 2 g de embriones, 1 mL)
 - HEPES 100mM (pH 6.7) – 500 μ L
 - NaCl 5000 mM - 30 μ L
 - KCl 100 mM – 50 μ L
 - MgCl₂ 100mM – 25 μ L
 - Tritón X-100 (10%) – 30 μ L
 - Complete 7X- 142.8 μ L
 - PMSF 10 mg/mL – 17 μ L
 - Agua destilada – 205.2 μ L

11.1.2 Soluciones para Co-IP

- Buffer de incubación (IB) (8 mL para 4 Co-IPs)
 - HEPES-KOH 100 mM (pH 8) – 800 μ L
 - EDTA 100 mM – 80 μ L
 - Glicerol – 800 μ L
 - NaCl 100mM – 4000 μ L
 - Agua destilada – 2320 μ L

11.1.3 Soluciones para inmunofluorescencias en discos imagales

- PBST (100 mL)
 - Tritón20% – 1 mL
 - PBS 1X – 99 mL

- BBT (1mL)
 - NaCl 5M – 50 μ L
 - BSA 10% - 9 μ L
 - Tritón 20% - 10 μ L
 - PBS 1X – 931 μ L
- Medio de motaje (50 mL). Almacenamiento a 4 °C en oscuridad.
 - Glicerol – 40 mL
 - PBS 10X – 5 mL
 - N-propil galato (nPG) 50% - 400 μ L
 - Aforar con agua destilada

11.2 Anexo 2. Anticuerpos

- α - panAdd1: New england peptide
- α - dXNP: New england peptide
- α -HP1a: C1A9 de DSHB
- α -dCTCF:
- α -Mod(mdg4):
- α -CP190:
- Alexa fluor 488 y 568: Invitrogen

11.3 Anexo 3. Isoformas de Mod(mdg4)

Tabla 3. Pesos, aminoácidos y nombres de las 31 isoformas de Mod(mdg4).

Número de isoforma	Nombre	kDa	No. de aminoácidos
1	mod(mdg4)-PA	53.4	485
2	mod(mdg4)-PAA	53.5	488
3	mod(mdg4)-PAB	55.2	506
4	mod(mdg4)-PAC	59.3	540
5	mod(mdg4)-PAD	55.8	510
6	mod(mdg4)-PAE	52.4	479
7	mod(mdg4)-PAF	54.6	499
8	mod(mdg4)-PB	54.6	498
9	mod(mdg4)-PC	58.1	534
10	mod(mdg4)-PD	57.4	520
11	mod(mdg4)-PE	65.0	603
12	mod(mdg4)-PF	58.6	536
13	mod(mdg4)-PG	54.3	497
14	mod(mdg4)-PH	56.4	514
15	mod(mdg4)-PI	59.1	541

16	mod(mdg4)-PJ	51.4	473
17	mod(mdg4)-PK	55.8	510
18	mod(mdg4)-PL	52.3	476
19	mod(mdg4)-PM	55.3	503
20	mod(mdg4)-PN	64.2	580
21	mod(mdg4)-PO	60.2	545
22	mod(mdg4)-PP	58.8	539
23	mod(mdg4)-PR	52.1	475
24	mod(mdg4)-PS	55.3	506
25	mod(mdg4)-PT	67.2	610
26	mod(mdg4)-PU	53.2	486
27	mod(mdg4)-PV	62.3	567
28	mod(mdg4)-PW	55.6	505
29	mod(mdg4)-PX	53.6	490
30	mod(mdg4)-PY	54.8	500
31	mod(mdg4)-PZ	57.5	526

La isoforma mod(mdg4)-PT pudiese ser la isoforma que interactúa con dAdd1.

11.4 Anexo 4. Alineamiento de las proteínas SuUR y XNPL.

Query_10001	401	KEEDRRKRRIEDRQKLYNRIFVKSESVEINELVLD DFDEESK KALLQVDKGLLKK-----LKP HQVAGVKFMWD ACFETLK	475
Query_10002	1	-----MYHFVSEQTPEVRLTDEALVTS HVTQY LKSFQLDAVRFVYD-----RL	43
Query_10001	476	ESQE KPGSGCILA HCMGLGKTLQVV TL SHTLLVNT RR TGV DRV LII SPL STVNNWAREFTSW-MKFAN RNDIEVYDIS RY	554
Query_10002	44	AKRE----FCILN DESGLGKVATVA ALLSALPPA-----KKT LVV -----LQ NDEQL LTGWR FHLD TL DLQVYIIQ GV	108
Query_10001	555	KDKP TRIFKLN EW FNEGGVCIL G YDMYR ILANEKAKGLR KKQRE QLM QALVDP GPDLVVCDE-GHLLK NEKTSISK AVTR	633
Query_10002	109	QDTT D -----SPHSV YLAKWSQL RS-----IG DL SRLKF----DYIM V DN R G HSLNNS FCT-SML LKQ	161
Query_10001	634	MRT KRRIV LTG TPLQNN LREYY CMIQF --VKPNLLGTY KEYMNR FVNPITNGQY TD STERDLRLMK HRSHILHKL LEGCI	711
Query_10002	162	FEG R V N V L ISSV D TS D V R LL YN VLRLG GR LE HQYK SFAS FDRK F HLPDP KEVF--SKRID LEEYKQ R G F LSEYIK DFR	239
Query_10001	712	QR D YS V LAP YLP PKHE YVVY TTLSEL Q KLYGY MT THRE QSGD V VGK GARLFQ D FQ DLRR I W TH PMNL RVNSDNV--	789
Query_10002	240	LRR FRHQ FDKSLP-----LV A PE QYK H N LN LW ASK NSQ STIS GSD V C STIASID NNPA Q QNK TGLFE ETDR LSE HSV DD	314
Query_10001	790	--IA K RL L SN DD SD MEG FICD-ET D E A A AS NS SD SC ET FK S D AS MS G LA AS SG V K K R K TR NG N AG GG D SD S DL E ML G G	866
Query_10002	315	VAM S PLI F E Y SES D DE P L T VE P D A D Q N P V L V V SD D CEI V TP P ST P Q N RT P SL N ES P RT K SK K K F SK K TSP R KK A D L ---	391
Query_10001	867	LGG G SS V Q K DD P SE W W K PF VE ER L NN V H H SP K LLI L RL L Q C E A I G D K LL V FS Q SL Q SL D VI E H F SL V DS N T K NY E F	946
Query_10002	392	----T S E E D E A T D N M P PR K R T R A A T V H L T PK T R R L-----N V R I L R V S L D T L ST P PP S R T T T A I V T PK T E P	455

```

Query_10001 947 EGDVGFDFKGCWTSKGDFRLLDGSCSVEQREAMCKQFNNITNLRARLFLISTRAGGLGINLVAANRVVIFDVSWNPSHDTQ 1026
Query_10002 456 TARRKNLKKRTVSPVDVGR-PATRGMQRLTRSAETKINSKYLKHRSLDDVKRSFPRRVKLEG-----NQTPRSSKQIV 527

Query_10001 1027 SIFRVYRFGQIKPCYIYRLIAMGTMEQKVYERQVAKQAT-----AKRVIDEQQISRHYNT----- 1082
Query_10002 528 KQEPKSKVGQEKKQKTVDPVAQGTAKRKPGRPRKCQTKTEDLGKTKTKPNSKHLPPTPQVLSGSSLSSEYMQCAQRIPDN 607

Query_10001 1083 -DLMELYSYELKPSTEREMPILPKDRLF AEILTEHEKLIFKYHEH--DSLLEQEEHENLTEEEKSAWAEEYAEKTRTVQ 1159
Query_10002 608 LDAIESPAFRV-PFTPQQTPMLLTL PSTHNLNDSEVVSIPLYKDPVETVVINSSHDECSPQDPSQSRRTKALKRKRKPV 686

Query_10001 1160 ASQYMSYD-----RNA-----FGNQV---MGQFGNASGSVTSNKF6FR 1195
Query_10002 687 TSVNSSFGGGLLPPAKRSANKSPDLFSISSEHSQIPLAQPRPSSPFEGFKIFGSEVKQFQQQLAKVNISVPKKKRDRSC 766

Query_10001 1196 SDILLQLLNMKISKD-----HQELNQVQIQLVPTYLQQLYNEMNNGDPTMYKDLLNLHSNI--VHPSGMY 1259
Query_10002 767 LDILEQMFEPQQS AKTSPKVLPTLPLTKQDDAESTITQRRRTLLEDFFEITNNGQFGSRMLNNSGGEVSPVQPDQQS 846

Query_10001 1260 MNPLLYANQNPNAAGYNQGTG---GVPPMAGG---SVAHGPPAAPAPGFEPDKVYEID----- 1311
Query_10002 847 VRP----SQANKITNYLIGSGITQERTQPSNGNRNSILASLRKSPKSPKQGAKSTQATKLT RWFGSVFGGGASQTSSVES 922

Query_10001 -----
Query_10002 923 VSAPSTPVNSSTSAAACQTRSARSGGASGPTKRKRLELFK 962

```

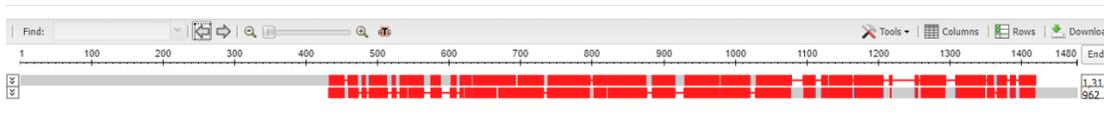


Figura 20. Alineamiento de aminoácidos de las proteínas SuUR y dXNP

11.5 Anexo 5. Inmunofluorescencias y Mocks

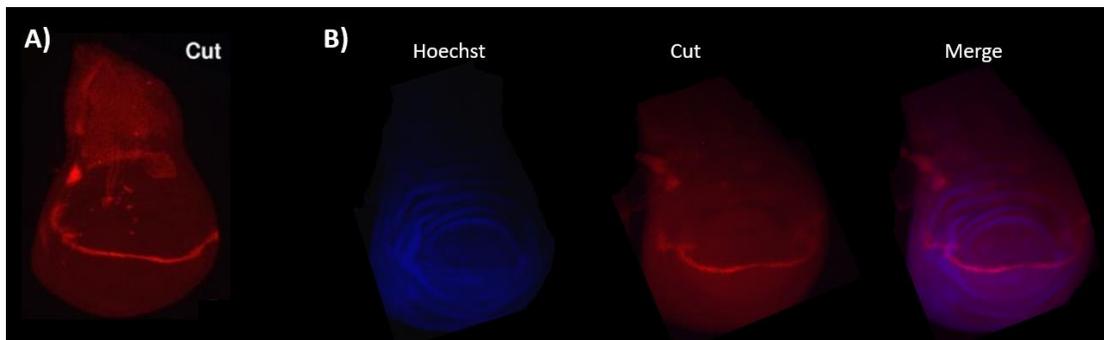


Figura 21. Patrón de expresión de cut en inmunofluorescencia. A) Patrón de expresión muestra de la proteína cut (tomado de Eid *et al.*, 2008). B) Inmunofluorescencia de cut a una concentración de 3 μg/mL, visualizado a 20X en microscopio de epifluorescencia.

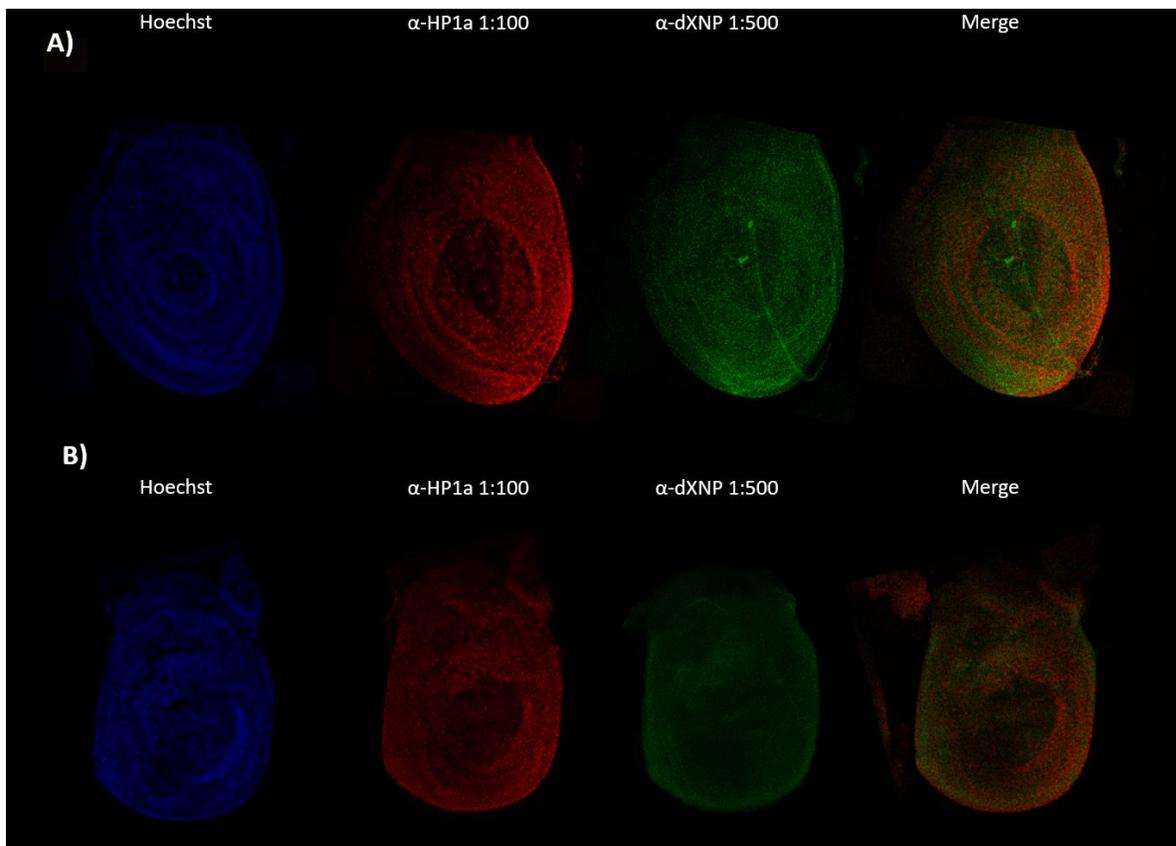


Figura 22. Inmunofluorescencia de dXNP y HP1 en discos pata y halterio. A) Inmunofluorescencia en disco de pata B) Inmunofluorescencia en disco de halterio

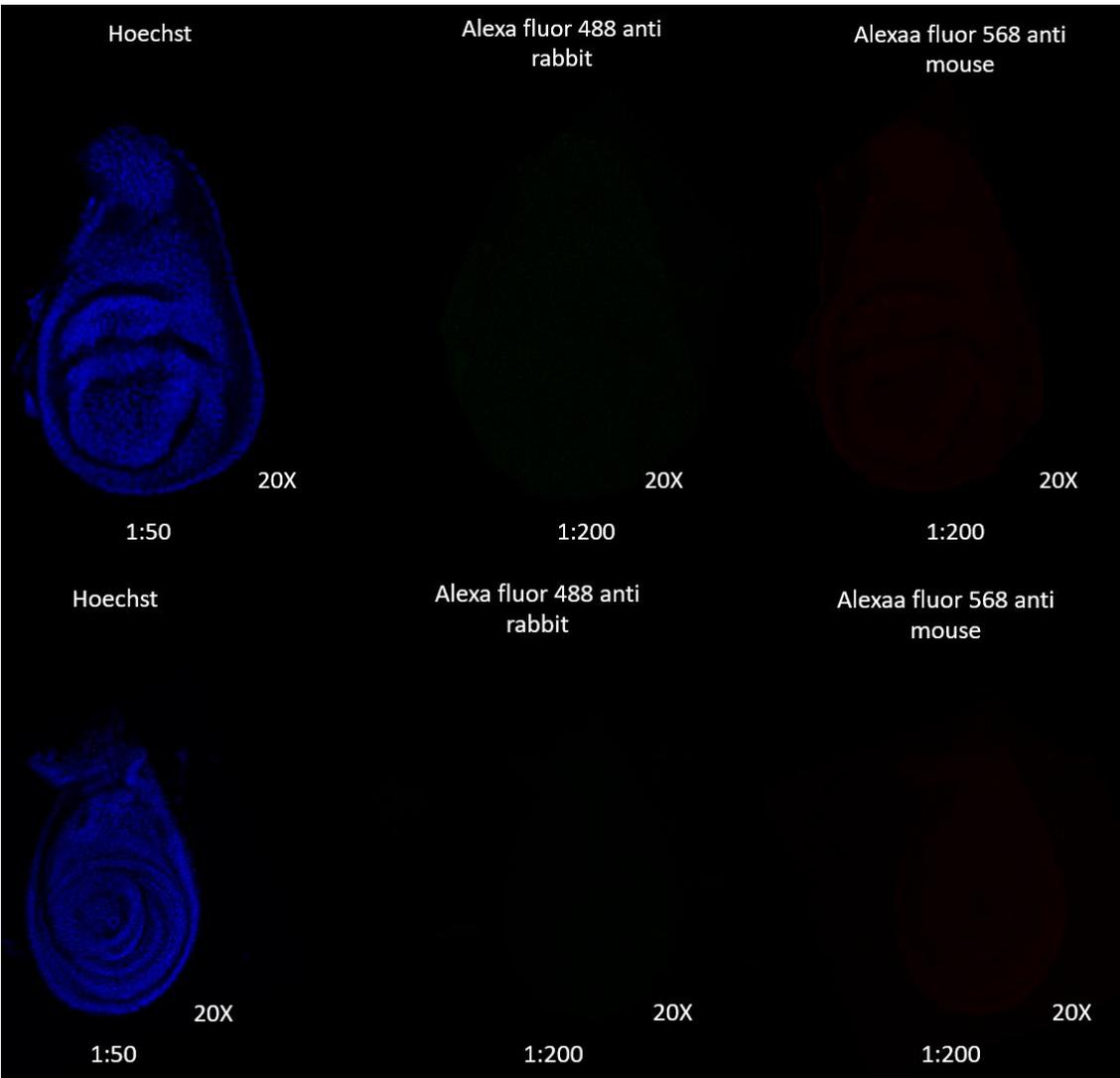


Figura 23. Alexa Fluor 488 anti rabbit y Alexa Fluor 568 anti mouse



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



VOTOS DE APROBATORIOS

**SECRETARIA EJECUTIVA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS APLICADAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS**

P R E S E N T E

Por medio del presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó la **C. VELAZQUEZ SOLIS ZAZIL RENEE** con número de matrícula **10018686** cuyo título es:

Determinación de la interacción (o formación de un complejo) entre dADD1, dXNP y proteínas de arquitectura Mod(mdg4) y CTCF en tejidos en proliferación de Drosophila melanogaster

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **LICENCIADO EN CIENCIAS ÁREA TERMINAL DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR.**

Cuernavaca, Mor a 14 de noviembre del 2023

Atentamente
Por una universidad culta
Una universidad de excelencia

Se adiciona página con la e-firma UAEM de los siguientes:

DRA. CARMEN NIÑA PASTOR COLON	(PRESIDENTE)
DRA. VERONICA MERCEDES NARVAEZ PADILLA	(SECRETARIO)
DRA. VIVIANA DEL CARMEN VALADEZ GRAHAM	(VOCAL)
DR. RAMON ANTONIO GONZALEZ GARCIA-CONDE	(SUPLENTE)
DRA. SONIA DAVILA RAMOS	(SUPLENTE)

MIE/VRRRC/EAE

Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209.
Tel. (777) 329 70 00, Ext. 3270 / correo IICBA@uaem.mx





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

CARMEN NINA PASTOR COLON | Fecha:2023-11-14 12:36:14 | Firmante

StaSDntvXyicFaXvyOw0d1pLdH3G7HnmvtNDwuDZgCSJ9AKTky/4Rb0mTni0VafJxhaQorNsTO7tiD60VN3EpG92cGZy9Gc3EMN1K4HLYQWXE4U7SwxMLw0mcUyeVkdXUGNfqYzjl4V4a0+SMKFMLCzACL5sNQpzPxtCKLzJvYU5RDxzqV1QP15nGykVLMIEb71Bu3PNZ1brroYOic2WpBwtt6aseAJP6krX4RJHtD3E1CX4eBxH3XbGAvSNGNptmOo4Qr0ecZrsTkiS8l73lvGqWsZBED2U2Jf2+hWmlyI9QkZXP/V7kSj6o7hbrN/9hGEXDREGP7y/TeFW52ztA==

VIVIANA DEL CARMEN VALADEZ GRAHAM | Fecha:2023-11-14 13:08:21 | Firmante

VnPQq3XCypjuM2ulovhnrjAVPb7AsIUWUHFHcb0RJEykN3v0SMYRkVNVNSCWxzI8EBWmCZz2KRLZKioYZgjenWdEaZak+VucW4SVjZnuqPIBIUSEI6Z+CcxQhQq0thgtODbBUc7/4fPaDbkrlBDyqFNKlyo+UfGHORmrKZRNh91j0Y4xttLxak/Jfsd84kiS0D0JnHqO23WdEuKvxDPzB9lkhy+4Bh2fo+eTgFElrc3p2Vlsxhc0+X+I2WNRwoAQMC71NhuyApUI4BCclzFNf9mWbigA7DVqm9wk/3BP0d4LRu/Nd1suoQqQiQAxh3ZZ9x9OTZd4j6bnc7yWEP26A==

SONIA DAVILA RAMOS | Fecha:2023-11-15 10:53:58 | Firmante

PR45eggk3V1qBT7sKBK98hZLmFQfeH59Whc5IE2aOb4X8vkJBrxRLwQuH1L6SoTIOaft1JRbZwNohzLBNIFGUHCBUOG/LXiJJ6+QbUSI65pcK/UXKON6GurelJmT6swag00LcVnQMMy8ZMogsJx510Atzeeb0eGEMTVUUVAcYpqj58EgiO4EOVLvRGq7ne6dR0OUURF9dkD7M1mOzMGyYQ4G7LsAs8ti6aLKeATWD1t98KI+QMXcancsB7Mxx/EWHCgseA4GmYc3I7ywxQ26UH+jBzQF0z9bsasRzjbZEjWWWcSliRZ8RrTQAF9wOQFAAVVW4P3667TnuFnHCobJQ==

VERONICA MERCEDES NARVAEZ PADILLA | Fecha:2023-11-15 16:58:46 | Firmante

TLAurFywd/Kemi3DR4T9oK5DpT3iOn6KznwHrEiWvJqHsRRh/wdH9dlozOZyUx3UTfIQNYX3KmZu2V3+puupaaqxx+Yuxlm3a2BUVtmtiuaakjsKdwDDwWyxUSN+/C32TPMu1Wfaw2dRHCn005tgMhVObaL66w9EFAEIfW0nnlVfLpZqNdGuBBQsMqL8+5JyngO9Jj7IM6M5D1NSRdtAqplWZVWxmx2uyOOKC66qP6YozVoLasRlq7uiMLt9p1GWXgxK+py86rDOaoYllpfsDIH1/bE6fmgwJepRTtkWRkWugLgpL/FzJ9Jxn+Tt78gvMFqYrjY6wTDEGpe9o5ka==

RAMON ANTONIO GONZALEZ GARCIA CONDE | Fecha:2023-11-16 08:58:58 | Firmante

MAJwlaWCkarur4HsOY/nlcXJw4NYKw3N2kmmEzrr6tXJF6ZyHdJh9SIXJRVzjldk2BUpxX0Sec1m0ujekUk/l6q0dCS1N5Yuebd07RAIdVR5gByeyEH+/El/boSZxfoSjJ8lI95ZU2V6kB2rXJEU2Lh/D5BGosxrPMZkHFTfSRbDtS4I9Njht4WSxQfSLScbdMJTg5EvHo4CjTMZY7q1goMw8xaAXQMZIGj6O0OvXzPRrahcQ5wF1UqW3dCfBT2GPDElkwUKO+yXyInztSREfeUtiGFEIbh5M1ypRRdE3fB5YZg5E6D2t266swd3saTcTnQ7PsGqoKaULszKZ9w==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



J1GTnVku4

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/2eJlW47TQqQNdeWNQI7GvYSErHiQC4bf

