



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Resultados funcionales de la participación de las proteínas *insulator* en la organización de la cromatina

Maria de los Angeles Rodríguez Sánchez

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAD DE BIOLOGIA
DOCTORADO EN BIOMEDICINA

**Resultados funcionales de la
participación de las proteínas *insulator*
en la organización de la cromatina**

Memoria presentada por Maria de los Ángeles Rodríguez Sánchez para optar al grado de doctora por la Universitat de Barcelona. Este trabajo ha sido realizado bajo la dirección de la Dra. Maria Lluïsa Espinàs Janer en el Instituto de Biología Molecular de Barcelona (IBMB-CSIC).

La directora

La tutora

Dra. Maria Lluïsa
Espinàs Janer

Dra. Maria del Carmen
Caelles Franch

La autora,

Maria de los Ángeles Rodríguez Sánchez

Barcelona, septiembre 2019

A mis padres

The architectural proteins in the chromatin have the ability to mediate interactions between distant regions thanks to their ability to form complexes with other proteins. For that reason, *insulators* can regulate gene expression causing or blocking the union between enhancers and promoters and organizing the genome in chromatin domains. The objective of this thesis has been the study and characterization of the participation of the insulator proteins in differentiation and developmental processes. The work has been splinted in two different lines of research.

The first one consists in the study of the insulator complex Ibf-CP190 function. This complex has preference to be bounded in genes with alternative promoters suggesting a possible role of this complex in the regulation of different transcripts. *Abdominal-B* is a gene that express 4 different transcripts that are divided into 2 classes, *A* and *B*, that are separated by an insulator region enriched in Ibf-CP190. Our results indicate that this complex is implicated in the correct spatial expression of the *A* transcript. The absence of this complex causes the ectopic expression of *A* transcript to the places where the *B* is expressed suggesting a crosstalk between regulatory elements of both transcripts due to the disappearance of the insulator complex Ibf-CP190 between them.

The other project is focused in the study of the Haspin kinase. In our laboratory has been described the Haspin kinase as a responsible of the H3T3p in mitosis and interphase in *Drosophila melanogaster*. Our objective in this research line was to study the function of Haspin as an architectural protein and its function on the regulation of gene expression. Our results indicate that Haspin is a regulator of the structure of the euchromatin and the heterochromatin, likely due to its ability to modulate the presence of the Cohesins in the chromatin. This structural change has effects in the ability of the Polycomb group proteins to silence homeotic genes, indicating that Haspin has a role in the regulation of gene expression.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN (1)

- 1.1. La organización tridimensional del genoma durante la interfase (3)
 - 1.1.1. Las proteínas *insulator* (6)
 - 1.1.1.1. Las proteínas *insulator* en *Drosophila melanogaster* (9)
 - 1.1.1.1.1. El complejo *insulator* Ibf-CP190 (11)
 - 1.1.2. Otros componentes de la cromatina relacionadas con las proteínas arquitecturales (12)
 - 1.1.2.1. El complejo de proteínas Polycomb (13)
 - 1.1.2.1.1. El funcionamiento del grupo de proteínas Polycomb en *Drosophila melanogaster* (13)
 - 1.1.3. El complejo de las Cohesinas (17)
 - 1.1.3.1. Las Cohesinas durante la interfase (19)
 - 1.1.4. El complejo Bitórax (20)
 - 1.1.4.1. El gen *Abdominal-B* (23)
 - 1.1.4.1.1. El giro de la terminalia de los machos de *Drosophila melanogaster* (26)
 - 1.1.5. Haspin kinasa y su función *insulator* en *Drosophila melanogaster* (27)
 - 1.1.5.1. El papel de Haspin durante la mitosis (27)
 - 1.1.5.2. El papel de Haspin durante la interfase (31)

2. OBJETIVOS (33)

3. MATERIALES Y MÉTODOS (37)

- 3.1. Materiales (39)
 - 3.1.1. Oligonucleótidos (39)
 - 3.1.2. Anticuerpos (40)
 - 3.1.3. Líneas de *Drosophila melanogaster* (41)
 - 3.1.4. Líneas celulares (42)
- 3.2. Métodos (43)

- 3.2.1. Manipulación de cultivos celulares (43)
 - 3.2.1.1. Mantenimiento de cultivos celulares (43)
 - 3.2.1.2. Obtención de la condición deficiente de Haspin en células Kc167 (44)
 - 3.2.1.2.1. 5-Iodotubercidina (44)
 - 3.2.1.2.2. Interferencia de Haspin en células Kc167 (45)
- 3.2.2. Técnicas experimentales (47)
 - 3.2.2.1. Técnicas para el estudio del DNA (47)
 - 3.2.2.1.1. Técnicas básicas (47)
 - a)** Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) (47)
 - b)** Extracción de DNA genómico de la Mosca (47)
 - 3.2.2.1.2. Técnicas de trabajo para el estudio de la cromatina (48)
 - a)** *Chromosome Conformation Capture* (3-C) (48)
 - b)** Inmunoprecipitación de la cromatina y análisis por secuenciación (ChIP-seq) (50)
 - c)** Inmunoprecipitación de la cromatina y análisis por qPCR (ChIP-qPCR) (52)
 - d)** Hi-ChIP (57)
 - 3.2.2.2. Técnicas para el estudio del RNA (59)
 - 3.2.2.2.1. Extracción de RNA y Purificación (59)
 - 3.2.2.2.2. Análisi de la expresión mediante RT-PCR (60)
 - 3.2.2.2.3. Análisi de la expresión mediante hibridación al RNA (62)
 - a)** Protocolo para embriones (63)
 - Hibridación in situ Fluorescente (FISH) (64)
 - Hibridación in situ (ISH) (65)

b) Protocolo en disco genital de larva 3 (67)

3.2.2.3. Técnicas para el estudio de las proteínas (68)

3.2.2.3.1. Extracción de proteína total (68)

3.2.2.3.2. Electroforesis en gel de acrilamida (69)

3.2.2.3.3. *Western Blot* (70)

3.2.2.3.4. Co-Inmunoprecipitación (70)

3.2.2.3.5. Extracción de proteína cromática (71)

3.2.2.3.6. Inmunofluorescencia en embriones (72)

3.2.2.4. Técnicas para el estudio en moscas (73)

3.2.2.4.1. Sistema UAS-Gal4 (73)

3.2.2.4.2. Estudio de las transformaciones homeóticas (74)

3.2.2.4.3. Estudio del *pairing sensitive silencing* (74)

3.2.2.4.4. Estudio del *position-effect variegation* (75)

4. RESULTADOS (77)

4.1. Análisis del papel funcional del complejo *insulator* Ibf-CP190 (79)

4.1.1. El complejo Ibf-CP190 se sitúa sobre genes con promotores alternativos (79)

4.1.2. Estudio del papel regulador del complejo *insulator* Ibf-CP190 en la expresión del gen *Abdominal-B* (79)

4.1.2.1. Estudio del giro en la terminalia masculina de *Drosophila melanogaster* (81)

4.1.2.1.1. Estudio del giro de la terminalia masculina en la línea mutante *Ibf2^{GSV17}* (82)

4.1.2.1.2. Análisis de la rotación de la terminalia masculina en la línea mutante *Ibf2^{GSV17}* en un fondo genético sensibilizado (83)

4.1.2.2. Análisis de la expresión del gen *Abdominal-B* (89)

4.1.2.2.1. Estudio de la expresión del gen *Abdominal-B* y sus transcritos *A* y *B* (89)

- 4.1.2.2.2. Análisis de la expresión del transcrito *A* en disco genital (90)
 - 4.1.2.2.3. Estudio de la expresión del transcrito *A* en embrión (92)
- 4.2. Análisis del papel de Haspin como modulador de la arquitectura nuclear (99)
 - 4.2.1. La condición mutante para Haspin se puede obtener de distintas formas (99)
 - 4.2.1.1. Líneas celulares de *Drosophila melanogaster* en cultivo (100)
 - 4.2.1.1.1. Inactivación de la actividad kinasa de Haspin mediante el inhibidor 5-lodotubercicina (100)
 - 4.2.1.1.2. Reducción de los niveles de la proteína Haspin mediante tratamiento con RNA de interferencia (104)
 - 4.2.1.2. Líneas de *Drosophila melanogaster* (105)
 - 4.2.2. Haspin es necesaria para la organización de la región génica de *Abdominal-B* (106)
 - 4.2.2.1. Análisis del efecto de Haspin en la organización de la región genómica de *Abdominal-B* (106)
 - 4.2.2.1.1. Estudio en embriones tardíos (106)
 - 4.2.2.1.2. Estudio en líneas celulares en cultivo de *Drosophila melanogaster* (109)
 - 4.2.3. Estudio del papel de Haspin en el silenciamiento de la expresión génica por los complejos Polycomb (112)
 - 4.2.3.1. La unión de Pc a la cromatina disminuye en ausencia de Haspin (112)
 - 4.2.3.2. La marca del silenciamiento H3K27me3 se ve afectada ante la ausencia de Haspin (113)
 - 4.2.3.3. El silenciamiento regulado por las proteínas del grupo PcG se ve afectado por Haspin (115)

- 4.2.3.4. Análisis fenotípico de las transformaciones homeóticas derivadas de la ausencia de Haspin (117)
- 4.2.3.5. El *pairing sensitive silencing* depende de Haspin (120)
- 4.2.4. La relación de Haspin y el complejo de las Cohesinas en interfase en *Drosophila melanogaster* (122)
 - 4.2.4.1. Haspin interacciona con Pds5 y con Rad21 (122)
 - 4.2.4.2. La distribución de las cohesinas no cambia ante la falta de Haspin en Kc167 (124)
 - 4.2.4.3. Análisis cuantitativo de las Cohesinas presentes en la cromatina (126)
 - 4.2.4.3.1. Cohesinas presentes en la cromatina de Kc167 (126)
 - 4.2.4.3.2. Cohesinas presentes en la cromatina de cerebro de larva 3 de *Drosophila melanogaster* (128)
 - 4.2.4.3.3. Análisis de las Cohesinas presentes en la cromatina de embriones de *Drosophila melanogaster* (129)
 - 4.2.4.4. Estudio de las interacciones mediadas por las Cohesinas (131)
- 4.2.5. Estudio de la organización de la heterocromatina en ausencia de Haspin (135)

5. DISCUSIÓN (137)

- 5.1. Análisis del papel funcional del complejo *insulator* Ibf-CP190 (139)
- 5.2. Haspin y su rol como modulador de la organización de la cromatina (146)

6. CONCLUSIONES (151)

7. BIBLIOGRAFÍA (155)

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. La presencia de las proteínas *insulator* definen los TADs. (5)

Figura 2 Esquema lineal del genoma ilustrando la función *insulator*.(7)

Figura 3. La jerarquía de la arquitectura de *Drosophila melanogaster*. (8)

Figura 4. Las proteínas *insulator* descritas en *Drosophila melanogaster*. (10)

Figura 5. Las proteínas *insulator* están asociadas a otras proteínas que intervienen en la regulación de la estructura de la cromatina. (12)

Figura 6. El complejo de proteínas PcG interviene en la regulación de la estructura de la cromatina. (16)

Figura 7. El complejo central de las Cohesinas y las proteínas accesorias están conservados entre vertebrados y *Drosophila melanogaster*. (18)

Figura 8. El complejo BX-C. (22)

Figura 9. Expresión de los diferentes elementos genéticos de *Abdominal-B*. (25)

Figura 10. *Abdominal-B* está involucrado en el giro de la terminalia de los machos de *Drosophila melanogaster*. (26)

Figura 11. Cdk1 y Plk1 y la fosforilación de Haspin. (28)

Figura 12. Haspin protege la cohesión centromérica durante la mitosis. (30)

Figura 13. El complejo Ibf-CP190 se une preferentemente a genes con promotores alternativos. (79)

Figura 14. El complejo Ibf-CP190 se sitúa en la región de *Abdominal-B* junto con CTCF. (80)

Figura 15. La terminalia de los machos de *Drosophila melanogaster* presenta el pene en la parte ventral y el ano en la dorsal. (82)

Figura 16. La terminalia de *Drosophila melanogaster* aparentemente presenta el mismo fenotipo ante la falta de Ibf-CP190. (83)

- Figura 17. El giro de la terminalia es destal y de 360°. (84)
- Figura 18. Las proteínas *insulator* CTCF y Ibf1 cooperan en la regulación del giro de la terminalia de *Drosophila melanogaster*. (88)
- Figura 19. La ausencia de Ibf-CP190 provoca el incremento de la expresión del gen *Abd-B* y de sus transcritos *A* y *B* en larva 3 de *Drosophila melanogaster*. (90)
- Figura 20. El patrón de expresión del transcrito *A* se ve alterado en ausencia del complejo Ibf-CP190 en disco genital de macho. (91)
- Figura 21. La presencia de *Abd-B* total no cambia en ausencia de Ibf-CP190 en embriones de estadio 12. (93)
- Figura 22. Diseño de la sonda específica para el transcrito *A*. (94)
- Figura 23. La expresión del transcrito *A* en embrión de estadio 12 se sitúa en el PS13. (95)
- Figura 24. La expresión del transcrito *A* se ve alterada en ausencia de Ibf-CP190 en embriones de estadio 12 de *Drosophila melanogaster*. (96)
- Figura 25. La H3T3p disminuye en células Kc167 tratadas con 5-itu. (103)
- Figura 26. El tratamiento con dsRNA contra Haspin reduce su expresión. (105)
- Figura 27. Los contactos del *PB* en la región del BX-C varían en ausencia de Haspin. (108)
- Figura 28. En las líneas celulares Kc167, Sg4 y Dmel2 los contactos del *PA* y del *PB* con el *Fab7* y *Fab8* son distintas. (110)
- Figura 29. Haspin es necesaria para la presencia de Pc en la cromatina. (113)
- Figura 30. Haspin es necesaria para la presencia de H3K27me3 en la región reguladora *Fab7*. (114)
- Figura 31. La expresión del gen *Abdominal-B* se ve alterada en ausencia de Haspin. (115)
- Figura 32. La expresión de ambos transcritos del gen *Abdominal-B* se ven alterados en ausencia de Haspin. (116)
- Figura 33. La mutación de Haspin junto con la mutación de Pc estimula la aparición de transformaciones homeóticas. (118)

Figura 34. Las transformaciones homeóticas también se producen con el mutante de *Haspin*^{RNAi}. (119)

Figura 35. Haspin está involucrada en el PSS. (121)

Figura 36. Haspin y Pds5 se asocian. (123)

Figura 37. Haspin y Rad21-myc forman un complejo estable. (124)

Figura 38. La distribución de SA no cambia ante la falta de Haspin. (125)

Figura 39. SA está presente en las regiones *Smr* y *shn* en células Kc167. (127)

Figura 40. La presencia de SA aumenta en las regiones *shn* y *Smr* ante la ausencia de Haspin en células Kc167. (127)

Figura 41. La presencia de SA aumenta en la región *shn* en ausencia de Haspin en cerebro de larva de *Drosophila melanogaster*. (129)

Figura 42. La presencia de Rad21-myc en la cromatina disminuye en ausencia de Haspin. (130)

Figura 43. SA está presente en contactos de regiones de la cromatina próximas y lejanas. (133)

Figura 44. La riqueza de los contactos entre regiones de la cromatina donde SA está presente cambia en ausencia de Haspin en células Kc167. (134)

Figura 45. La estructura de la heterocromatina cambia en ausencia de Haspin. (135)

Figura. 46. La región regulatoria del gen *Abdominal-B*. (140)

Figura. 47. La regulación de la expresión del gen *Abdominal-B*. (142)

Figura 48. La falta del complejo lbf-CP190 afecta al *Fab8*. (143)

Figura 49. Hipótesis 1. (144)

Figura 50. Hipótesis 2. (145)

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lista de oligonucleótidos utilizados (39)

Tabla 2. Lista de anticuerpos primarios para *Western Blot* (40)

Tabla 3. Lista de anticuerpos secundarios para *Western Blot* (40)

Tabla 4. Lista de anticuerpos para inmunoprecipitación (40)

Tabla 5. Lista de anticuerpos para hibridación in situ (FISH y ISH) (41)

Tabla 6. Lista de anticuerpos para inmunofluorescencia (41)

Tabla 7. Lista de líneas de *Drosophila melanogaster* utilizadas (41)

Tabla 8. Estudio de la rotación (85)

Tabla 9. Porcentaje de embriones de estadio 12 (96)

Tabla 10. Recuento celular tras 24h de tratamiento con 5-itu (101)

Tabla 11. Porcentaje de hembras con alas normales (121)

ABREVIATURAS

A segmentos en la mosca adulta

abd-A *abdominal-A*

Abd-B *Abdominal-B*

AP Anteroposterior

ABPS *Architectural protein binding site*

BEAF-32 Boundary Element Associated Factor 32

ChIP Chromatin Inmunoprecipitation

ChIP Chromatin Inmunoprecipitation analizada por q-PCR

ChIP-seq Chromatin Inmunoprecipitation analizado mediante secuenciación

CBE *chromatin boundary elements*

CTCF CCCTCF-binding factor

CP190 Centrosomal Protein 190 KD

Co-IP Co-inmunoprecipitación

Cdk1 Cyclin-dependent kinase

CPC Complejo Chromosomal Passenger

Dmt Dalmatian

ePK eukariotic protein kinase

E(z) Enhancer of zeste

Esc Extra sex combs

FBS suero fetal bovino

FISH ISH fluorecente

Gsg2 *Germ cell-specific gene-2*

lab *infraabdominal regions*

lbf1 *Insulator binding factor 1*

lbf2 *Insulator binding factor 2*

InR *Insulin-like receptor*

ISH Hibridación in situ

L3 larva 3

loco locomotion deffects

[Mod(mdg4)] Modifier of Modg4

Moe *Moesin*

Mvl *Malvolio*

myosinID *myoID*

PA *promotor del transcrito A*

PB *promotor del transcrito B*

Pb Polycomb bodies

Pc Polycomb

PcG Complejo de proteínas Polycomb

PRC1 Complejos Represivos de Polycomb 1

PRC2 Complejos Represivos de Polycomb 2

PRE *Elemento de Respuesta del Grupo Polycomb*

PEV Position-effect variegation

Ph Polyhomeotic

Plk1 Polo-like kinase-1

pnt *pointed*

PREs *Polycomb response elements*

Psc Posterior Sex Combs

PSS Pairing sensitive silencing

PS Parasegmentos

SA Stromalin

Shn *schnurri*

Smr *Smrter*

Smc Sex combs on midlegs

SMC structural maintenance of chromosomes

[Su(Hw)] Suppressor of Hairy-wing

Su(z) Suppressor of zeste

TAD *Topologically associated domain*

TFIIIC Transcription Factor IIIC

tor *torso*

TREs *Trithorax response elements*

TrxG Proteínas del complejo Trithorax

TSS inicio de transcripción

Ubx *Ultrabithorax*

WB *Western Blot*

ZIPIC Zn-finger Protein Interacting with CP190

INTRODUCCIÓN

1. La organización tridimensional del genoma durante la interfase

El DNA se encuentra revestido por proteínas que intervienen en su regulación a lo largo de todo el ciclo celular. Durante la interfase, el conjunto formado por el genoma y las proteínas que se encuentran unidas a este forman lo que conocemos por cromatina (Filion et al., 2010; Rando and Chang, 2009). En células eucariotas la cromatina no se encuentra empaquetada en el interior del núcleo de manera aleatoria sino que se encuentra empaquetada adoptando una estructura que debe de ser organizada (Sexton and Cavalli, 2015).

El estudio de la organización específica que adquiere la cromatina es interesante ya que donde y como se dispone la información genética es importante ya que de ello dependen procesos dinámicos como la transcripción génica, la replicación, recombinación y la reparación del ADN, por ese motivo es interesante (Barkess and West, 2012; Ma et al., 2016; O'Keefe et al., 1992; Van Bortle and Corces, 2012; White, 2012).

Estudios primarios en núcleos interfásicos diploides y en cromosomas politénicos mostraron que la cromatina presenta zonas que se encuentran más compactadas y otras que menos (Littau et al., 1964; Miller and Gonzales, 1976). Esta característica dio pie a la introducción del concepto de los dominios inactivos y activos de la cromatina, siendo la zona inactiva la que presenta mayor grado de compactación denominada heterocromatina y la zona activa menos condensada, conocida como eucromatina (Parey and Crombach, 2019).

El auge en el conocimiento de la tridimensionalidad de la estructura de la cromatina interfásica ha surgido a partir del desarrollo de diversas técnicas innovadoras, que nos permiten vislumbrar resultados a una alta resolución. Éstas nuevas técnicas han permitido

revelar cuales son las proteínas que participan en la organización de la cromatina en el interior del núcleo, descubrir en que procesos están involucradas e intentar entender la función que estas que llevan a cabo (Schwartz and Cavalli, 2017).

Uno de los aspectos interesantes para el estudio de la estructura de la cromatina es conocer la distribución de las proteínas que se encuentran unidas al DNA. Esto fue posible gracias a la inmunoprecipitación de la cromatina, lo que conocemos como técnica *Chromatin Immunoprecipitation* (ChIP) (Kidder et al., 2011). Gracias a esta, se ha podido realizar el mapaje de las modificaciones de las histonas y del resto de componentes unidos al DNA (Boros, 2012; Negre et al., 2010). El conocimiento de la distribución de los componentes de la cromatina ha permitido que Karchencko et al en 2010 pudieran desarrollar una clasificación para la cromatina de *Drosophila melanogaster*. Según el tipo de proteína y marca de histona presente se definen 9 tipos de cromatina diferente denominados dominios epigenéticos y que aumenta el conocimiento que nos aportaron los estudios anteriores de Filion et al en 2010.

En segundo lugar, el Hi-C es otra técnica que ha supuesto un gran avance en este campo facilitando el análisis de las interacciones en el genoma (Belton et al., 2012), permitiendo conocer los contactos inter- e intra-cromosómicos que contribuyen al establecimiento de la estructura tridimensional de la fibra de cromatina (Dixon et al., 2012; Hou et al., 2012). Las interacciones existentes identificadas se caracterizan por dominios de cromatina interfásica de unas 100 Kb en *Drosophila melanogaster* y alrededor de 1 Mb en ratón y Humano (Dixon et al., 2012; Sexton et al., 2012). Cada uno de esos dominios en los que se divide el genoma se conocen como *topologically associated domain* (TAD). Estos se definen como regiones que incluyen una alta frecuencia de interacciones genómicas locales fuertes en cada uno de ellos (Nora et al., 2012) las cuales son

infrecuentes con el TAD adyacente (Dixon et al., 2012; Nora et al., 2012; Sexton and Cavalli, 2015; Sexton et al., 2012).

Cuando comparamos los mapas de los dominios TADs con los perfiles de proteínas unidas a la cromatina y de modificaciones de histonas en *Drosophila melanogaster* observamos en primer lugar que los dominios físicos corresponden con los dominios epigenómicos en el empaquetamiento de la cromatina (Sexton et al., 2012). Y en segundo lugar que los límites que existen entre TADs vienen definidos por proteínas arquitecturales ejerciendo una función aislante actuando como barrera (Fig.1) (Ali et al., 2016; Sexton et al., 2012).

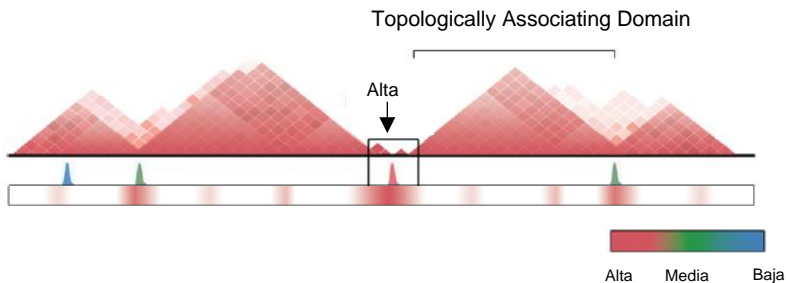


Figura 1. La presencia de las proteínas *insulator* definen los TADs. Modelo ilustrando la unión de las proteínas *insulator* a la cromatina, donde la riqueza de estas proteínas marca con diferente grado de definición los límites de cada TAD. A más alta localización en esa región más definido está el límite y viceversa. Imagen modificada de Van Bortle et al., 2014.

1.1.1. Las proteínas *insulator*

Las proteínas arquitecturales, también conocidas como proteínas *insulator*, tienen un papel crucial en la organización tridimensional del genoma facilitando la formación de contactos de largo alcance entre secuencias de DNA durante interfase (Cubenas-Potts and Corces, 2015; Li et al., 2015). Dichas proteínas se unen a regiones específicas del DNA denominadas *architectural protein binding site* (APBS) or *chromatin boundary elements* (CBEs) (Ma et al., 2016). Éstas secuencias se encuentran repartidas por todo el genoma, en los límites de los TADs, aunque también están en el interior de estos (Li et al., 2015).

La unión de las proteínas *insulator* al genoma tiene diversas implicaciones funcionales. Por un lado delimita los dominios, es decir, evita que las marcas de la cromatina se esparzan por las regiones colindantes e impide contactos entre dominios diferentes (Bartkuhn et al., 2009) y por otro lado provoca la formación de *loops* (giros) en la cromatina por efecto de la formación de complejos multiproteicos entre las proteínas arquitecturales presentes en lugares distantes de la cromatina (Kyrchanova and Georgiev, 2014)(Fig. 2).

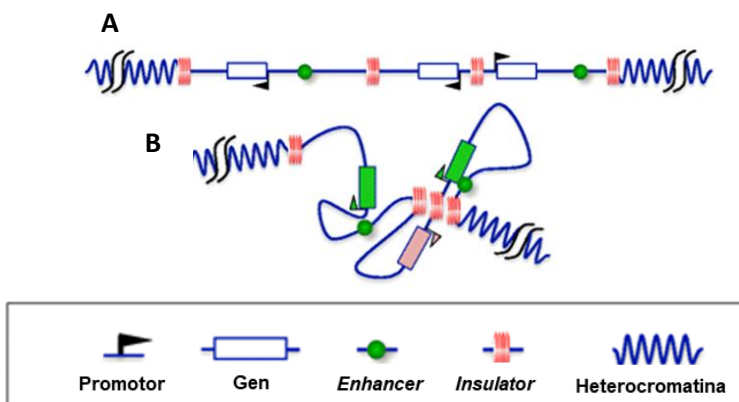


Figura 2 Esquema lineal del genoma ilustrando la función *insulator*. A) Representación esquemática de un dominio activo de cromatina flanqueado por dos regiones heterocromáticas. Los *insulators* se encuentran posicionados en los límites (*boundaries*) y en el dominio activo. En los límites se encarga de delimitar las regiones de cromatina y en el dominio activo regula las interacciones entre los *enhancers* y los promotores. B) Las proteínas *insulators* organizan la cromatina formando *loops* que modulan los contactos entre *enhancers* y promotores provocando la activación (gen verde y promotor de la derecha) o la inactivación de la expresión génica (gen rosa y promotor). Imagen editada procedente de Herold et al., 2012)

El mecanismo por el cual se rige el orden de las interacciones sigue sin estar descrito (Ma et al., 2016). La formación de dichos *loops* provoca que ciertas regiones en el espacio puedan entrar en contacto o alejarse orquestando así las interacciones entre elementos reguladores distantes como por ejemplo *enhancers* y promotores. Es por esta razón que las proteínas arquitecturales a través de la modulación de la estructura de la cromatina tienen un papel crucial en la regulación de la expresión génica (Ali et al., 2016; Nora et al., 2013; Schwartz and Cavalli, 2017; Sexton et al., 2012) (Fig. 3).

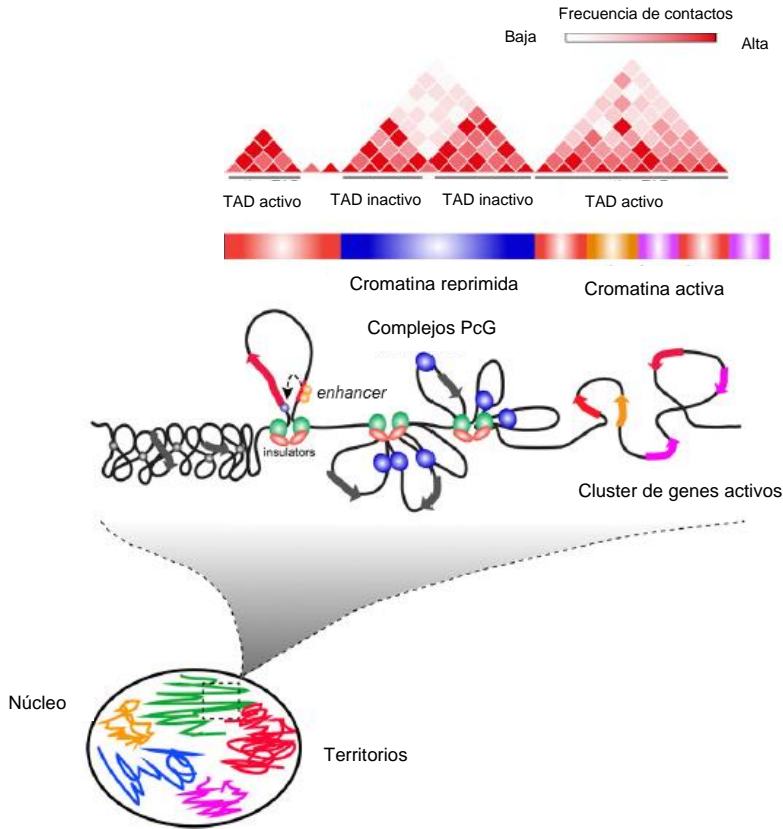


Figura 3. La jerarquía de la arquitectura de *Drosophila melanogaster*. Los cromosomas están empaquetados en el interior del núcleo celular. Cada cromosoma ocupa su propio espacio (territorio cromosómico, mostrado de manera esquemática en distintos colores); no obstante, estos volúmenes parcialmente se solapan permitiendo las interacciones inter cromosómicas. En una escala menor, las fibras de cromatina están divididas en dominios con diferentes grados de empaquetamiento y con diferentes grados de contactos en cada dominio (TADs). La división en dominios está definida por las diferencias en la composición, por las propiedades de la cromatina subyacente y la actividad transcripcional. Las proteínas *insulator* delimitan algunos de los TADs mediante la formación de *loops* entre los *boundaries* y modulando los contactos en la cromatina. Los TADs correlacionan con la segmentación del genoma lineal de *Drosophila* según los tipos de cromatina y las modificaciones de histonas. Los contactos en un mapa Hi-C muestran cómo está el genoma dividido. Imagen modificada de Schwartz and Cavalli, 2017.

1.1.1.1. Las proteínas *insulator* en *Drosophila melanogaster*

Las proteínas arquitecturales se han descrito en una gran variedad de organismos que comprenden desde las levaduras hasta los humanos (Ong and Corces, 2014). En todos ellos tienen una función muy conservada (Ali et al., 2016). En mamíferos se conocen pocas, concretamente CCCTCF-binding factor (CTCF) es la más estudiada (Holoan et al., 2007). En el caso de *Drosophila melanogaster* es un modelo de estudio que ha servido de fuente enriquecedora de información para la comprensión de la estructura de la cromatina y la organización de las proteínas arquitecturales que ha sido el modelo de estudio utilizado en esta tesis. A diferencia de los vertebrados el genoma de *Drosophila* es mucho más compacto principalmente debido a las distancias cortas que hay entre genes, por ese motivo no es de extrañar que el número de proteínas *insulator* descritas sea superior al resto de organismos (Mohan et al., 2007). En la actualidad se conoce CTCF, la homóloga de la única proteína *insulator* conocida en vertebrados, Boundary Element Associated Factor 32 (BEAF-32), Suppressor of Hairy-wing [Su(Hw)], Transcription Factor IIIC (TFIIIC), Z4 (también conocido como Putzig), Pita, Zn-finger Protein Interacting with CP190 (ZIPIC) y las proteínas Insulator binding factor 1 y 2 (Ibf1 y Ibf2), descritas en nuestro laboratorio (Fig. 4) (Xu and Corces, 2016). Como ya hemos mencionado anteriormente las proteínas *insulators* se encuentran asociadas entre sí ocupándose de diferentes funciones según sus características estructurales. Existen diferentes tipos de proteínas *insulators* que se encuentran asociadas a la cromatina como por ejemplo las conocidas como proteínas *insulator* accesorias, las cuales necesitan la presencia de las primeras para unirse al DNA. Se han descrito varias como por ejemplo Centrosomal Protein 190 KD (CP190) (Van Bortle et al., 2014) o Modifier of Modg4 [Mod(mdg4)]. Estas se asocian entre sí a través de su dominio BTB/POZ permitiendo así las uniones multiprotéicas entre proteínas

arquitecturales distantes en el genoma (Gerasimova et al., 2007), siendo la posible causante de los contactos que se acaban formando. En la cromatina se la encuentra asociada diferentes *insulators* como por ejemplo a las proteínas Ibf-1 y Ibf-2 con las que forma el complejo conocido como Ibf-CP190 (Bartkuhn et al., 2009; Cuartero et al., 2014; Kahn et al., 2006).

Drosophila

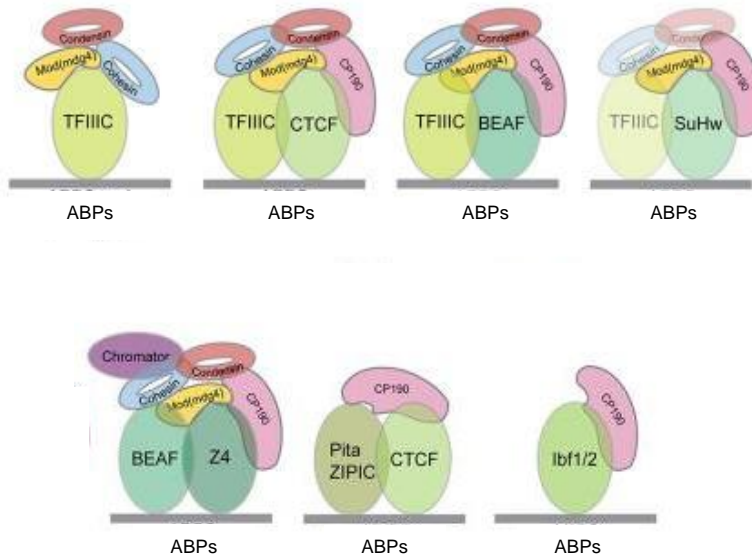


Figura 4. Las proteínas *insulator* descritas en *Drosophila melanogaster*. En *Drosophila* se han descrito una gran variedad de proteínas *insulator*, las cuales se encuentran asociadas a proteínas accesorias. Cada una de las proteínas *insulator* se une a regiones específicas del DNA. En algunos de los casos las distintas secuencias se encuentran próximas creando así ABPs formadas por diversas *insulators*. La imagen editada de Xu et al,

1.1.1.1.1. El complejo *insulator* Ibf-CP190

Las proteínas Ibf1 y Ibf2 fueron descritas en *Drosophila melanogaster* durante la tesis de Sergi Cuartero en nuestro grupo (Cuartero et al., 2014). Durante su trabajo se describió una nueva vía de reclutamiento de CP190 en la cromatina gracias al complejo formado por las proteínas desconocidas hasta el momento, Ibf1 y Ibf2. Estas proteínas de 242 y 195 aminoácidos que vienen codificadas por dos genes que se encuentran uno a lado del otro, separados por 470pb en el cromosoma 3R.

Análisis por co-inmunoprecipitación (Co-IP) y ChIP-seq concluyeron que ambas proteínas forman un complejo estable en la célula y a su vez interactúan con CP190. Así pues, el complejo heterodímero Ibf es necesario para el reclutamiento de CP190 a la cromatina y ejercer su función como *insulator*.

En cuanto a los efectos fenotípicos que provoca la ausencia del complejo observamos que las hembras mutantes homocigotas presentan una transformación del segmento A7 al A6 ya que las cerdas presentes en el segmento A7 han perdido su orientación normal (Cuartero et al., 2014). Este fenotipo es debido a una transformación homeótica ya que nuestros resultados por *enhancer-blocking* muestran que el *insulator Fab-8* está afectada ante la ausencia del complejo Ibf-CP190, y además está descrito que la falta de CP190 es necesaria para el funcionamiento del *Fab-8* (Mohan et al., 2007). Además el fenotipo que presentan las hembras mutantes para el complejo Ibf-CP190 es similar al que presentan las moscas de la línea *Fab-8⁴¹⁶* que presentan una delección de la región regulador *Fab-8* presente en el BX-C (Barges et al., 2000).

Si analizamos en que lugares del genoma se sitúa el complejo Ibf-CP190 observamos que la presencia de Ibf1, Ibf2 junto CP190 en células S2 se encuentra enriquecida en genes con promotores

alternativos, concretamente 3 veces más que los genes que no tienen promotores alternativos, sugiriendo un rol para esas proteínas en la regulación de la expresión de los diferentes transcritos en función del tipo celular y del desarrollo (Cuartero et al., 2014).

1.1.2. Otros componentes de la cromatina relacionadas con las proteínas arquitecturales

Las proteínas *insulator* no siempre se encuentran solas unidas a los *boundaries* sino que se asocian a otras clases de proteínas relacionadas con la estructura de la cromatina como el complejo de proteínas Polycomb (PcG) o las cohesinas (Negre et al., 2010; Schwartz et al., 2012) (Fig. 5).

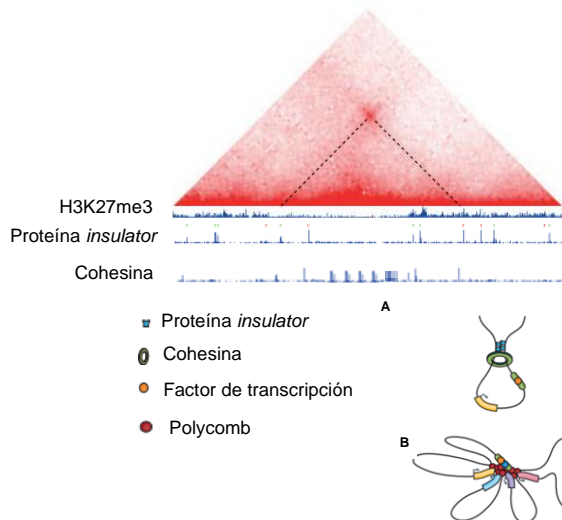


Figura 5. Las proteínas *insulator* están asociadas a otras proteínas que intervienen en la regulación de la estructura de la cromatina. En la imagen superior se visualiza por Hi-C un *loop* formado por proteínas *insulator*. La imagen inferior ilustra la formación de *loops* por parte de las proteínas *insulators* (azul) con el complejo de las Cohesinas (verde) y el complejo de proteínas PcG (rojo). La disposición de estas proteínas en la cromatina promueve la formación de *loops* de manera que regulan los contactos entre *enhancers*-promotores como en la imagen A o el silenciamiento por parte de PcG con la formación de Polycomb *bodies* tal como se muestra en la imagen B. Imagen editada de Bonev and Cavalli, 2016.

1.1.2.1. El complejo de proteínas Polycomb

El complejo de proteínas Polycomb (PcG) fue identificado en *Drosophila* a raíz del estudio de la regulación de los genes homeóticos (Lewis, 1978). Se trata de un grupo de proteínas encargado del mantenimiento del estado reprimido de la transcripción de estos genes en todos los metazoos (Czermin et al., 2002). Estas proteínas actúan formando complejos multiprotéicos que al unirse a la cromatina reprimen la transcripción de genes diana a través de la modificación post-translacional de histonas (Bantignies and Cavalli, 2011; Loubiere et al., 2016).

Muchos genes homólogos a los genes de PcG de *Drosophila* han sido identificados en vertebrados y las mutaciones provocadas en algunos de esos genes alteran los patrones de expresión de los genes homeóticos, al igual que en *Drosophila* (Akasaka et al., 2001; Isono et al., 2005; van der Lugt et al., 1996). Estas similitudes indican que algunas de las funciones del PcG se han conservado a lo largo de la evolución, aunque en el caso de los mamíferos el número de genes que codifican proteínas PcG es mayor, sugiriendo un mecanismo molecular más complejo en comparación al de *Drosophila* (Kerppola, 2009; Sowpati et al., 2015).

1.1.2.1.1. El funcionamiento del grupo de proteínas Polycomb en *Drosophila melanogaster*

En *Drosophila* las proteínas del complejo PcG se agrupan en dos complejos denominados Complejos Represivos de Polycomb 1 y 2 (PRC1 y PRC2). Estos complejos multiprotéicos se unen al DNA a través del reconocimiento de secuencias regulatorias específicas en *cis*- conocidas como Elementos de Respuesta del Grupo Polycomb (PREs) provocando así el silenciamiento de los genes a los que regulan estas secuencias (Bantignies and Cavalli, 2011).

El PRC1 lo forman Polycomb (Pc), Polyhomeotic (Ph), Posterior Sex Combs (Psc) y RING 1 y Sex combs on midlegs (Smc) (Shao et al., 1999). El otro complejo, denominado PRC2 se compone por las proteínas Enhancer of zeste (E(z)), Supressor of zeste (Su(z)) y Extra sex combs (Esc) (Cao et al., 2002; Czermin et al., 2002; Muller et al., 2002). Estos dos complejos multiprotéicos tienen funciones independientes, pero a su vez dependen la una de la otra para llevar a cabo el silenciamiento. Según la visión clásica el mecanismo de silenciamiento regulado por este complejo se inicia a través de la acción del PRC2 con la metilación de la lisina 9 y la lisina 27 de la histona 3 (H3K27me3) a través de la subunidad catalítica de E(z). A continuación, Pc que forma parte del complejo PRC1, reconoce específicamente la H3K27me3 a través de su cromodominio reclutando así el resto de los componentes del complejo PRC1 a la cromatina (Fischle et al., 2003), estableciéndose así el primer contacto entre los dos PRCs y la condensación de la cromatina (Francis et al., 2004). Una vez el PRC1 se encuentra unido al PRE actúa compactando la cromatina y produciendo la monoubiquitinación de H2AK118 (de Napoles et al., 2004). Esta marca producida en la cromatina es reconocida por el PRC2 creando así el segundo contacto entre ambos complejos (Blackledge et al., 2015). Hay que mencionar también al complejo Pho-repressive complex (PhoRC) que está formado por Pho o Phol, y Sfmbt. De este complejo no se conoce al 100% su actividad, pero parece ser que se une al PRE mediante Sfmbt y con el complejo PRC1 mediante la proteína Scm provocando así la unión del PRC1 al PRE (Kang et al., 2015; Klymenko et al., 2006) (Fig. 6). En la actualidad el mecanismo de silenciamiento entre el PRC1 y el PRC2 no está tan claro puesto que pueden tener otros mecanismos de funcionamiento debido a que el PRC1 puede unirse a la cromatina independientemente del PRC2 (Kahn et al., 2016).

Los PREs puede estar situados a una distancia de una docena de kilobases (Kb) de los lugares de inicio de transcripción (TSS) o cercanos a los promotores de los genes a los que regulan (Morey and Helin, 2010). Los PRE son una agrupación de secuencias reconocidas por distintas proteínas entre ellas las proteínas del complejo PcG y las proteínas arquitecturales. La unión de las proteínas arquitecturales a los PRE permite interacciones a larga distancia a través de las asociaciones de proteínas PcG en el espacio conocidas como *Polycomb bodies* (Pb) (Li et al., 2013; Schwartz and Cavalli, 2017). El efecto de la formación de los Pb provoca un reforzamiento del silenciamiento de las regiones implicadas denominada *pairing sensitive silencing* (PSS).

El PSS se trata de un fenómeno de transvección, específico del complejo de proteínas del complejo PcG que se produce tanto por el apareamiento de los cromosomas homólogos como por el encuentro entre PREs de diferentes regiones genómicas (Kassis et al., 1991). Debido a que la estructura de la cromatina es importante para que se produzca el PSS las proteínas *insulator* también se ven involucradas en este proceso ya que su actividad puede producir cambios en la cromatina promoviendo o evitando el acercamiento entre los PRE y la formación de los Pb (Li et al., 2011; Li et al., 2013).

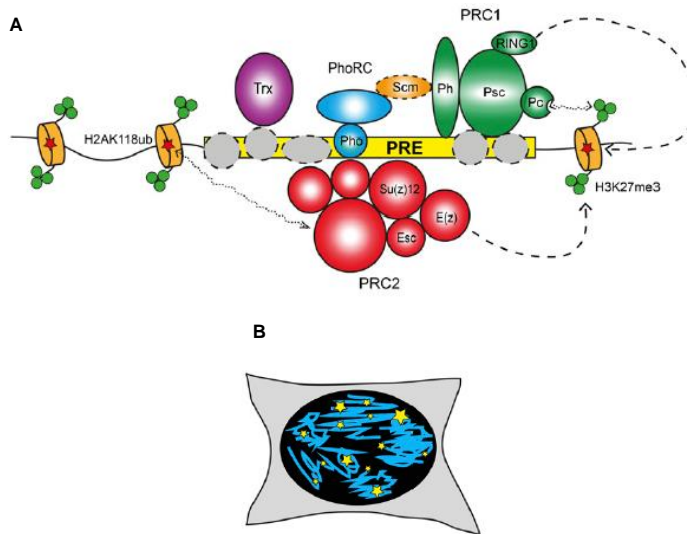


Figura 6. El complejo de proteínas PcG interviene en la regulación de la estructura de la cromatina. A) Los complejos PRC1 y PRC2 se unen a las secuencias PREs (rectángulo amarillo) para regular la expresión de los genes. El PRC1 interactúa con la H3K27me3 (círculos verdes) producida por el PRC2. Y a la vez, el PRC2 interactúa con la H2AK118ub producto del PRC1 (estrellas rojas). También interactúan con otras proteínas como el complejo PhoRC, Scm y Trx. B) Ilustración de un núcleo tratado para observar la inmunolocalización de los Pc (estrellas amarillas). Imagen editada procedente de Schwartz and Cavalli, 2017.

1.1.3. El complejo de las Cohesinas

El complejo de las Cohesinas se trata de un complejo muy conservado que fue descrito por primera vez en levaduras (Guacci et al., 1997; Michaelis et al., 1997) y ha sido descrito posteriormente en diferentes modelos de estudio como *Drosophila melanogaster* y humanos (Fig. 7). Funcionalmente está involucrado en diversos procesos relacionados como la segregación cromosómica, la estructura de la cromatina y la expresión génica por eso su presencia debe de estar bien regulada (Dorsett, 2009; Guacci et al., 1997; Lopez-Serra et al., 2013).

El complejo central de las cohesinas lo forman 4 proteínas: SMC1, SMC3, Rad21 (Sister chromatid cohesión/Scc1) y Stromalin (SA/Scc3) (Ocampo-Hafalla and Uhlmann, 2011) (Fig. 7). Dos de ellas pertenecen a la familia de proteínas conocida como *structural maintenance of chromosomes* (SMC), estas dos subunidades SMC junto a Rad21 dan lugar a un complejo proteico heterodímero en forma de anillo que les permite englobar el DNA cuando están unidas a él (Ouyang and Yu, 2017). Su deposición en la cromatina está efectuada por Nipped-B y Mau-2 (Dorsett, 2009; Haarhuis and Rowland, 2017; Ouyang and Yu, 2017). Las cohesinas una vez unidas al DNA no pasan a ser funcionales hasta la acetilación de SMC3 por parte de la acetiltransferasa Eco1 (Ouyang and Yu, 2017). Una vez situadas en la cromatina tanto SA como pds5 son usadas como plataforma para la unión de otras proteínas que regulan la presencia del complejo en la cromatina (Hara et al., 2014; Roig et al., 2014). La proteína Pds5, pese a no formar parte al complejo del complejo central co-localiza con este y interviene funcionalmente en la regulación de este complejo, por un lado, es necesaria para el mantenimiento de las cohesinas en la cromatina y por otro lado participa en la extracción del complejo de la cromatina (Dorsett et al., 2005).

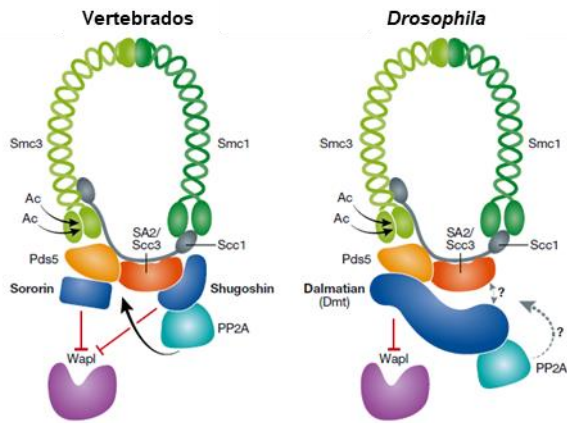


Figura 7. El complejo central de las Cohesinas y las proteínas accesorias están conservados entre vertebrados y *Drosophila melanogaster*. El complejo proteico de la izquierda es el que está presente en vertebrados y el de la derecha en *Drosophila*. Tal como podemos observar la única diferencia está en que la función de las proteínas Sororin y Shugoshin en los vertebrados la lleva a cabo una sola proteína llamada Dalmatian (Dmt) en *Drosophila*. Imagen editada perteneciente a Marston, 2017.

Por un lado, cuando Pds5 se asocia a la proteína Wapl provoca la alteración de la unión entre SMC3 y Rad21 que desencadena en la apertura del complejo central de las cohesinas y su desunión de la cromatina (Kueg et al., 2006). En cambio en *Drosophila* cuando Dalmatian (Dmt) se asocia a Pds5, se previene la sustracción del complejo central de las cohesinas, puesto que antagoniza la función de Wapl (Fig. 7) (Marston, 2017).

El descubrimiento del complejo fue a raíz de experimentos realizados en levadura donde se observó que sus mutaciones provocaban problemas en la cohesión de las cromátidas hermanas (Guacci et al., 1997; Michaelis et al., 1997). Ésta fue la primera función en la que se les situó, pero más adelante con la profundización en el estudio de dicho complejo se ha visto que se unen a los cromosomas a lo largo

de toda la interfase, es por ésta razón que no es raro que estén involucradas en la regulación de la expresión génica (Dorsett, 2009).

1.1.3.1. Las Cohesinas durante la interfase

Como ya hemos mencionado anteriormente durante la interfase la cromatina adopta una estructura organizada a través de la formación de *loops* donde las proteínas arquitecturales tienen una importante función junto a las proteínas accesorias con las que interactúa funcionalmente como es el caso de las cohesinas (Haarhuis and Rowland, 2017). La función estructural del complejo de las cohesinas durante la interfase es similar a como lo hace en mitosis durante el manteniendo de las cromátidas hermanas juntas. Concretamente, de la misma manera que mantiene en contacto entre la cromatina en trans lo haría con las que se encuentran en *cis*- (Dorsett and Merckenschlager, 2013). Su presencia en la cromatina durante la interfase ayuda a la estabilización de los *loops* que regulan el contacto entre *enhancers* y promotores distantes sugiriendo así un papel de este complejo en la regulación genética (Kagey et al., 2010).

Parte del conocimiento que tenemos hoy en día sobre la función de las cohesinas en la cromatina proviene del estudio de las proteínas que se encargan de su modulación. Una de ellas es Wapl, y concretamente se encarga de la extracción de las cohesinas de la cromatina como ya hemos mencionado anteriormente (Tedeschi et al., 2013). Al mutar esta proteína se produce la compactación de la cromatina en ausencia de Wapl, debido a que posiblemente se establezcan *loops* más largos (Fudenberg et al., 2016). El análisis de la mutación de distintos componentes del complejo de las cohesinas provoca la disminución de los *loops* y de los TADs, y además se observa un cambio sobre la estructura de los compartimentos A y B de la cromatina (eucromatina y heterocromatina respectivamente) (Rao et al., 2014; Wutz et al., 2017). Estos resultados sitúan al

complejo de las cohesinas como uno de los contribuidores en la regulación de la organización de la estructura de la cromatina y del tamaño nuclear en interfase (Tedeschi et al,2013).

1.1.4. El complejo Bitórax

El complejo bitórax (BX-C), es uno de los dos Hox clústeres presentes en *Drosophila melanogaster*. Este se encarga de la especificidad del tercer segmento torácico (T3) y de los 8 segmentos abdominales (A1-A8) (Fig. 8). Las 300 Kb que comprende este clúster integran tres genes homeóticos: *Ultrabithorax (Ubx)*, *abdominal A (abd-A)* y *Abdominal B (Abd-B)*. Cada uno de estos genes codifica por factores de transcripción que determinan el patrón del cuerpo a lo largo del eje anteroposterior del organismo de manera. La linealidad en la que se encuentran los genes en el cromosoma refleja el orden de su expresión a lo largo del eje del cuerpo, este fenómeno se conoce como colinealidad (Hagstrom et al., 1996; Lewis, 1978).

Entre los distintos genes del BX-C se encuentran regiones genómicas denominadas *infraabdominal regions (iab)*. Estas regiones están compuestas por diversas secuencias de DNA no génicas que se encargan de regular los genes próximos en *cis*- (Akbari et al., 2006; Maeda and Karch, 2006). Hay diversos tipos de regiones en *cis*-, por un lado, están aquellas que actúan en respuesta a los factores *gap* y *pair-rule* durante el establecimiento de los patrones de transcripción de los genes Hox durante el inicio del desarrollo embriológico. Otro tipo de regiones en *cis*- incluyen los *insulators* o *boundaries* las cuales se encargan de establecer límites entre las distintas regiones *iab* y evitar contactos entre ellas (Holohan et al., 2007). Un tercer tipo son las regiones denominadas *Trithorax* y *Polycomb response elements* (TREs y PREs), los cuales participan respectivamente en el mantenimiento de la expresión y el silenciamiento de los genes Hox en los estadios del desarrollo tardíos (Ringrose and Paro, 2007).

Durante la embriogénesis temprana se define el eje anteroposterior (AP) en el embrión de *Drosophila*, concretamente, pasa a metamerizarse en 14 parasegmentos (PS) por efecto de los productos maternos de los genes *gap* y los *pair-rule*. Una vez pasa a ser un animal adulto, esos 14 PSs pasan a formar los tres segmentos en los que se divide la cabeza, los tres en los que se divide el tórax y los ocho en los que se divide el abdomen. Pese a mantenerse el número de segmentos estos no corresponden a los PS anteriores, sino que hay un leve desplazamiento en el área que abarcan. En el caso del tórax y del abdomen este cambio abarca la mitad del segmento, lo que significa que el PS comprenden la mitad del segmento posterior y la mitad anterior del siguiente segmento (Maeda and Karch, 2006). Como hemos comentado anteriormente el BX-C se encuentra dividida en regiones *iab* conocidas como *abx/bx*, *bxl/pbx*, *iab-2*, *iab-3*, *iab-4*, *iab-5*, *iab-6*, *iab-7*, *iab-8*, *iab-9* (Duncan, 1987), las cuales regulan cada uno de los genes en cada uno de los PS pertinentes. Así pues, el gen *Ubx* se encuentra regulado por las regiones *abd/bx* y *bxl/pbx* en los PSs 5 y 6 respectivamente. En el caso de *abd-A* su patrón de expresión viene regido por las regiones *iab-2*, *iab-3* y *iab-4* en los PS 7, 8 y 9. El tercer gen componente del clúster es el gen *Abd-B*, que a diferencia de los otros dos genes presenta una regulación más compleja puesto que éste gen codifica por dos tipos de transcritos diferentes *A* y *B* que se expresan de manera diferencial en los PS más posteriores de *Drosophila*, es decir, del PS10 al PS15. Los transcritos del gen *Abd-B* se clasifican en función de la proteína que traducen. La clase *A* lo compone un solo transcrito conocido como *Abd-BA*, *Abd-Bm* o *m* mientras que la clase *B* conocido también como *Abd-BB*, *Abd-Br* o *r* lo componen los transcritos *B*, *C* y γ (Celniker et al., 1989). La expresión del transcrito *A* lo regulan los elementos reguladores *iab-5*, *iab-6*, *iab-7* y *iab-8* del PS10 al PS13, mientras que el transcrito *B* está regulado por el *iab-9*

en el PS14 aunque se conoce poco de su regulación (Casanova et al., 1986).

Para que la identidad segmental se especifique correctamente es necesario que cada región *iab* funcione de manera independiente la una de la otra y de ello se encargan las secuencias *insulator* o *boundaries*. Estos marcan los bordes de los dominios regulatorios separando cada una de las unidades regulatorias y regulan la expresión espacio-temporal de los genes homeóticos a en cada uno de los segmentos. Los *boundaries* descritos en este complejo son *Fab2*, *Fab-3*, *Fab4*, *Mcp*, *Fab-6*, *Fab-7* y *Fab-8* (Fig.8) (Herold et al., 2012).

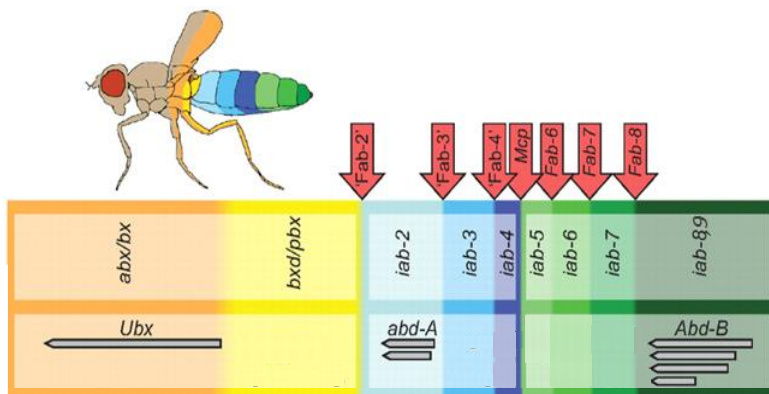


Figura 8. El complejo BX-C. En el mismo color están delimitados la localización de los dominios regulatorios que controlan la expresión de los genes del BX-C: *Ubx* naranja y amarillo), *abd-A* (azul) y *Abd-B* (verde) (representados por flechas negras horizontales). La expresión de cada gen y los dominios regulatorios delimitados están descritos en Maeda and Karch, 2006 (los colores más oscuros corresponden a más expresión) están representados en el cuerpo coloreado de la mosca según están en el diagrama inferior. Los transcritos de los tres genes están indicados por flechas grises. Las regiones *insulator* están marcadas por flechas rojas. Imagen editada procedente de Herold et al., 2012.

Estos *boundaries* cuando tienen unidos las proteínas *insulators* tienen la habilidad de regular la interacción entre *enhancers* y promotores interviniendo así en la expresión génica. Cuando se produce la eliminación de los *insulators* que regulan los genes provoca un cambio en la identidad del segmento pareciéndose al segmento vecino, lo que conocemos como transformación homeótica (Maeda and Karch, 2006).

La regulación de la expresión de los genes homeóticos durante el desarrollo tiene dos fases: la de iniciación y la de mantenimiento (Akbari et al., 2006). La fase inicial consiste en la activación de los dominios reguladores en *cis*- por efecto de las interacciones entre los productos de los genes *gap* y *pair-rule* y cada uno de los *iab* de los dominios *cis*- reguladores (Gaul and Jackle, 1989; Muller and Bienz, 1992; Qian et al., 1991; Tautz, 1988). A medida que avanza el desarrollo de *Drosophila* los productos de los genes *gap* y *pair-rule* desaparecen y se produce la transición de la fase iniciativa de la regulación los genes homeóticos a la de mantenimiento. Es en esta fase son los elementos en *cis*- TREs y PREs los que regulan la expresión de estos genes mediante la unión de las proteínas del complejo PcG junto con las proteínas del complejo Trithorax (TrxG). Estos dos tipos de elementos tienen actividades opuestas ya que las proteínas del complejo PcG se encargan del silenciamiento al unir-se a los PREs mientras que las del complejo TrxG se encargan de la transcripción de los genes activos al unirse a los TREs (Francis and Kingston, 2001; Levine et al., 2004; Orlando, 2003; Schuettengruber et al., 2017).

1.1.4.1. El gen *Abdominal-B*

El gen *Abd-B* es el gen que se expresa más posteriormente de todos los genes del BX-C, así pues, debido a la colinealidad que los genes

homeóticos presentan es el que está involucrado en el establecimiento de las partes posteriores del abdomen. Aunque, también es necesario para el establecimiento de diversas morfologías de *Drosophila melanogaster* a lo largo de su desarrollo (Foronda et al., 2006; Gambetta and Furlong, 2018; Sanchez-Herrero and Crosby, 1988).

Este gen compuesto por 4 promotores distintos expresa diversos transcritos (Casanova et al., 1986) (Fig. 9A) que se clasifican en dos grupos en función de cuál de las dos proteínas Abd-B expresan.

El grupo A lo forma el transcrito A, conocido también como *Abd-BA*, *Abd-Bm* o *m* y codifica por la proteína Abd-BI. El segundo grupo conocido como B lo forman los transcritos *B*, *C* y denominados también *Abd-BB*, *Abd-Br* o *r* que codifican por la proteína Abd-BII (Fig. 12) (Birkholz et al., 2013; Zavortink and Sakonju, 1989). Las dos isoformas comparten el mismo dominio C-terminal, donde se incluye el homeodominio, su diferencia reside en el dominio N-terminal ya que la proteína Abd-BI tiene 223 aminoácidos más (Coutelis et al., 2013) (Zavortink and Sakonju, 1989).

A parte de ser diferentes estructuralmente también se diferencian en su lugar de expresión y función. Mutaciones en este gen provocan la transformación de los segmentos abdominales posteriores en los anteriores, y también es necesario para la formación de los genitales (Sanchez-Herrero et al., 1985; Tiong et al., 1985).

En el embrión de *Drosophila melanogaster* la expresión del grupo A se sitúa del PS10 al PS13 (A5-A8) mientras que el grupo B es el encargado de los segmentos PS14 (A9) (Fig. 9B) (Casanova et al., 1986).

En el disco genital de larva 3 de *Drosophila melanogaster* que está formado por 3 primordios, el A8, el A9 y el A10 la expresión del grupo

A es en A8 mientras que el del B es en el A9 (Fig. 9C y 9D) (Casares et al., 1997).

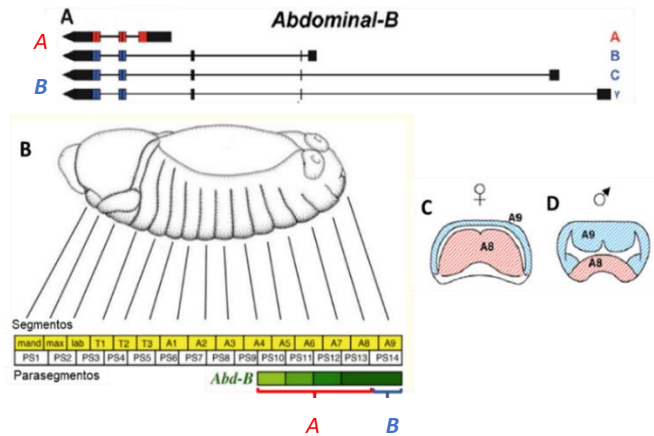


Figura 9. Expresión de los diferentes elementos genéticos de *Abdominal-B*. A) Los 2 tipos de transcritos del gen *Abd-B* (A en rojo y B en azul), (dibujados a escala) según FlyBase (McQuilton et al., 2012). Las líneas representan los intrones y los cuadros los exones (los negros són UTRs, y las coloreadas CDSs). B) Ilustración de un embrión de *Drosophila* indicando la expresión del gen *Abd-B* y la de los dos tipos de transcrito, A (rojo) y B (azul). El nivel de expresión del gen *Abd-B* es directamente proporcional a la intensidad del color del verde. C y D) Dos ilustraciones del disco genital (parte ventral) femenino (C) y el masculino (D) donde se indican los primordios A8 y A9 y la expresión de los transcritos (A en rojo y B en azul). El primordio A10 se encuentra en la parte dorsal en ambos casos La imagen editada procede de Birkholz et al., 2013 (A), (B) de Maeda and Karch, 2006 y de Foronda et al., 2006 (C, D).

Varias características diferencian el disco genital de los torácicos. En primer lugar, es el único que es impar y situado en el medio del individuo. En segundo lugar, está formado por la fusión de los primordios procedentes de tres segmentos embrionarios, A8, A9 y A10 (Nothiger et al., 1977; Schupbach et al., 1978). Y en tercer lugar, es sexualmente dimórfico debido a las señales de determinación sexual (Estrada et al., 2003). En las hembras el segmento A8 forma los genitales y la octava terguita, el A9 da lugar a la parovaria y parte de la pared uterina y por último el A10 desarrolla el ano. En los machos, el A8 da lugar a un segmento pequeño, el A9 forma los

genitales y el A10 el ano (Keisman et al., 2001; Nothiger et al., 1977; Schupbach et al., 1978). Además, tienen distintos procesos de desarrollo como por ejemplo el giro de la terminalia que se da en los machos de *Drosophila* durante el estadio de pupa.

1.1.4.1.1. El giro de la terminalia de los machos de *Drosophila melanogaster*

La terminalia de *Drosophila melanogaster* está compuesta de los genitales y del ano. Esta estructura deriva del disco genital formado en la parte posterior del embrión (Jürgens and Hartenstein, 1993). Durante la metamorfosis, el disco genital forma la terminalia (genitales y ano) durante el cual el segmento A8 forma un disco envolviendo los dos segmentos restantes (Fig. 10).

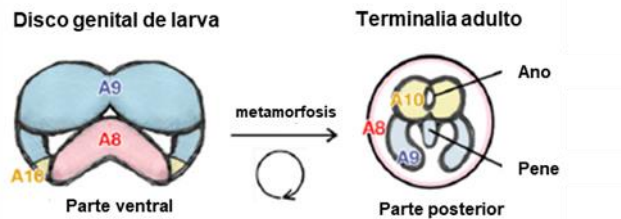


Figura 10. *Abdomina-B* está involucrado en el giro de la terminalia de los machos de *Drosophila melanogaster*. La imagen superior es una representación esquemática de la parte ventral de un disco genital masculino antes de la metamorfosis y de la terminalia de la mosca adulta. Los tres primordios A8 (rojo), A9 (azul) y A10 (amarillo) del disco genital y su desarrollo en la mosca adulta se encuentra coordinados. La imagen editada corresponde a Coutelis et al., 2013.

Durante el segundo día de pupación debido a la expresión de la isoforma A del gen *Abd-B*, esta estructura pasa por un proceso de rotación de 360° hacia la derecha (Suzanne et al., 2010), ya que es posible la expresión del gen *myosinID* (*myoID*) en el segmento A8 del disco de *Drosophila* (Speder et al., 2006) (Coutelis et al., 2013). Debido a que el gen *myoID* es un gen encargado de la asimetría entre la derecha y la izquierda (DI) en *Drosophila* hace de la expresión del

transcrito A del gen *Abd-B* un controlador directo de la organización DI de la terminalia (Fig.10) (Speder et al., 2006)

1.1.5. Haspin kinasa y su función *insulator* en *Drosophila melanogaster*

La kinasa conocida como Haspin (*haploid germ cell-specific nuclear protein kinase*) fué identificada por primera vez en testis de ratón y está codificada por el gen *Germ cell-specific gene-2 (Gsg2)* (Tanaka et al., 1994). Fruto del estudio de esta serina/treonina kinasa se vio que también se expresaba en otros órganos y líneas proliferantes del animal (Tanaka et al., 1999). A raíz de su descubrimiento se han descrito homólogos de Haspin en humanos y en diversos linajes eucariotas como levaduras y artrópodos (Nespoli et al., 2006; Tanaka et al., 2001; Xie et al., 2015).

Las proteínas Haspin se engloban en un grupo divergente de la familia de las *eukariotic protein kinase* (ePK) (Higgins, 2001; Manning et al., 2002) ya que están compuestas por un dominio C-terminal distinto al de las ePKs convencionales (Higgins, 2001). El dominio N-terminal es el menos conservado entre las distintas proteínas Haspin que se expresan en los distintos organismos (Higgins, 2003; Tanaka et al., 1999; Yoshimura et al., 2001). Además, estructuralmente presenta una hendidura afín para las colas de histona H3 siendo así la encargada de la fosforilación de la treonina 3 de dicha histona (H3T3p) (Dai et al., 2005).

1.1.5.1. El papel de Haspin durante la mitosis

Haspin durante la mitosis fosforila H3T3 en los brazos de los cromosomas y en mayor concentración en los centrómeros. (Dai et al., 2006; Dai et al., 2005; Polioudaki et al., 2004). El mecanismo por el cual Haspin se encuentra regulado en mitosis está bajo estudio en la actualidad pero según las últimas publicaciones parece ser que

Cyclin-dependent kinase (Cdk1) y Polo-like kinase-1 (Plk1) son las encargadas de fosforilar a Haspin (Fig. 11) (Wang et al., 2011; Zhou et al., 2014).

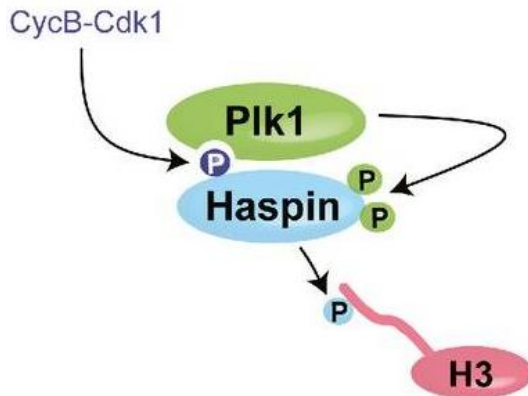


Figura 11. Cdk1 y Plk1 y la fosforilación de Haspin. A través de la actividad de Cdk1 y Plk1 se produce la fosforilación de Haspin. De esta manera esta kinasa se activa y produce la fosforilación de la H3T3. La imagen editada corresponde a Zhou et al., 2014.

La fosforilación H3T3 es necesaria para la unión de Survivin, una subunidad del complejo Chromosomal Passenger (CPC) y a la misma vez se encuentra modulando la función de Aurora B en los centrómeros (Yamagishi et al., 2010). Así pues, es necesario que las proteínas con las que se le relaciona estén bien reguladas puesto que de ellas depende la bi-orientación de los cromosomas para la unión de los microtúbulos (Watanabe, 2012), además la reducción de los niveles de Haspin mediante RNAi en células provoca problemas en el alineamiento y en la cohesión cromosómica, y produce el arresto de las células en metafase (Dai et al., 2006; Dai et al., 2005).

Existe una relación estrecha entre Haspin y Aurora B, ya que ambas se necesitan. En primer lugar, la H3T3p se encuentra modulada por Aurora B, y según se ha descrito parece ser que lo hace de dos maneras diferentes. Por un lado, a través de su capacidad de inhibir

el complejo encargado de la defosforilación de H3T3p conocido como Repo-Man-PP1 (Qian et al., 2013; Qian et al., 2011; Vagnarelli et al., 2011). Y por otro lado, a través de la influencia que ejerce Aurora B sobre Bub1, el ejecutor de la fosforilación de la H2A necesaria para la localización centromérica de *Chromosome Passenger Complex* (CPC) a través de la vía regulatoria Bub1-H2AT120ph-Shugosin-CpC (Yamagishi et al., 2010) de tal manera que se ve favorecida la presencia de H3T3P en los centrómeros durante la mitosis a través del incremento de la marca de Haspin a través de lo que conocemos como un *feedback loop* (Eswaran et al., 2009). En segundo lugar Aurora B también depende de Haspin ya que la inhibición de la actividad catalítica de Haspin induce la deslocalización de Aurora B de los centrómeros y como consecuente también la pérdida de las fosforilaciones de las que Aurora B se encarga (De Antoni et al., 2012; Wang et al., 2012), es decir, de la fosforilación de la H3S10, H3S28, la Ser7 de CENP-A (Prigent and Dimitrov, 2003)

El estudio de Haspin se ha centrado en levadura y humanos mayormente tal como podemos comprobar en la literatura. En ambos se ha descrito la existencia de una interacción entre proteínas para Pds5 posicionando al miembro de las cohesinas durante la mitosis como plataforma de la cromatina para la cohesión entre cromátidas hermanas y la biorientación de los cromosomas. Ambas proteínas poseen motivos de interacción en su dominio N-terminal que les permite interactuar (Goto et al., 2017). En pombe, la proteína Haspin es conocida como Hrk1 y fue el primer organismo donde se describió la conexión entre Pds5, miembro de las cohesinas, con Hrk1 en los centrómeros (Yamagishi et al., 2010). Esto es posible mediante el motivo interactivo que poseen cada una de estas dos proteínas, concretamente el de Hrk1 se conoce como PIM y el que contiene Pds5 se denomina HIM (Goto et al., 2017). En células humanas se ha visto que el reclutamiento de Haspin también depende de Pds5. Haspin posee un motivo PIM que recuerda al motivo YSR que se

encuentra en Wapl y Soronin, los cuales ambos se unen a Pds5, el primero desestabilizando y el segundo estabilizando el complejo de las Cohesinas, tal hi como también lo tienen Hrk1 con Wpl1 y la acetiltransferasa Eco1 además de con Pds5, así pues, sugiere una posible relación de competición entre Haspin y el resto de proteínas que se unen a Pds5 (Gandhi et al., 2006; Kueng et al., 2006; Murayama and Uhlmann, 2015; Nishiyama et al., 2010; Ouyang et al., 2016; Shintomi and Hirano, 2009; Waizenegger et al., 2000). Concretamente la relación de Haspin con Wapl no es solo de competencia por su unión a Pds5 sino que también es capaz de fosforilar el motivo YSR de éste a través de su dominio C-terminal protegiendo la cohesión centromérica durante la mitosis (Liang et al., 2018; Zhou et al., 2017) (Fig. 12).

Así pues, en resumen, Haspin, se encargaría de la relación con Pds5 mediante su dominio N-terminal, mientras que mediante el C-terminal llevaría a cabo la fosforilación de la H3T3p y de Wapl (Liang et al., 2018).

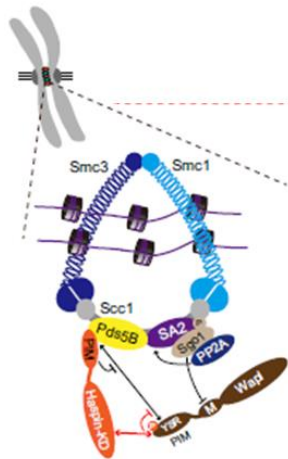


Figura 12. Haspin protege la cohesión centromérica durante la mitosis. Haspin impide la unión de Wapl a Pds5 mediante su unión a Pds5 y fosforilando el motivo YSR de Wapl necesario para su unión con Pds5. Sgo1 al igual que Haspin protegen la cohesión centromérica mediante la inhibición de Wapl. Imagen editada procedente de Liang et al., 2018.

1.1.5.2. El papel de Haspin durante la interfase

Los estudios en células humanas, levadura y huevos de *Xenopus* describen funcionalmente a Haspin durante la mitosis (Ghenoiu et al., 2013). Nuevos estudios realizados en nuestro laboratorio por la doctora Ujué Fresán en *Drosophila melanogaster*, permitieron situar funcionalmente durante la interfase a Haspin y a su producto, la H3T3p. Los resultados dieron pie a uno de los proyectos que se han desarrollado durante esta tesis, por ese motivo se explican en más detalle en el apartado de resultados. Los resultados obtenidos por Ujué junto con los obtenidos en esta tesis han sido utilizados para la redacción de un artículo que está bajo revisión.

OBJETIVOS

El objetivo de esta tesis ha sido el estudio y caracterización de la participación de los complejos *insulator* en procesos de diferenciación y desarrollo en *Drosophila melanogaster*. El desarrollo de este estudio se ha llevado a cabo mediante el seguimiento de dos líneas de investigación diferente:

1. Análisis del papel funcional del complejo insulator Ibf-CP190

2. Haspin y su rol como modulador de la organización de la cromatina.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Oligonucleótidos

Tabla 1. Lista de oligonucleótidos utilizados

Nombre	Secuencia 5'→ 3'	Experimento
Actina5CF	GCGCGGTTACTCTTTCACCA	RT-PCR
Actina5CR	ATGTCACGGACGATTTACAG	RT-PCR
Abd-B F	TTACGGCTCCGGTACTACG	RT-PCR
Abd-B R	GGGTAAGGATAGCGCAACATGT	RT-PCR
Abd-B-F REST	TCTACTCCACCGTTTGCTC	RT-PCR (Transcrito A)
AbdB-R REST	TGACCAAAAAGCACTACCCAAA	RT-PCR (Transcrito A)
AbdB-F	CCCCAGTACTGACCAACCG	RT-PCR (Transcrito B)
AbdB-RB	GCGAGTGTTCCTCCAG	RT-PCR (Transcrito B)
Hasp F	TAATACGACTCACTATAGGGTGACAACGAAAGGGATCTG	RNA doble cadena
Hasp R	TAATACGACTCACTATAGGGTGTTCCTCCAAATGAAGGTCC	RNA doble cadena
Rnai haspin-2 F	CGATTAGGAGGCACAACAGG	RNA doble cadena (n-terminal)
Rnai haspin-2 R	TTCTCCATTTCCCGGATTT	RNA doble cadena (n-terminal)
HASPIN F2	ATTGGCGAAGGGCTTATGG	RT-PCR
HASPINR2	ACAGTGAACCCCTCCAAAGG	RT-PCR
ABD-BMT32 F	AATTAACCCCTCACTAAAGGGCGACACGATGTTTTGATTG	In-situ (Transcrito A)
ABD-BMT72 R	TAATACGACTCACTATAGGGATTCGACTGGGAGTGTTCG	In-situ (Transcrito A)
Rp49F	CTCTGTTGTCGATACCCCTTGG	3-C q-PCR
Rp49R	GTCGCAGTTGCTCGGATAGT	3-C q-PCR
Abd-Bm Prom F	GCATTAATTAGTCACTGCGCTTG	3-C q-PCR; ChIP- qPCR
Abd-Bm Prom R	GTTGGTGCGGCTCTCTTGT	3-C q-PCR; ChIP- qPCR
Abd-Br Prom F	GGGCCATAAAACCCAAAATAA	3-C q-PCR; ChIP- qPCR
Abd-Br Prom R	GACAAAGCCGACGCGAAT	3-C q-PCR; ChIP- qPCR
FAB8 PTS F (1)	AAATGCCAAATCCAGGTGT	3-C q-PCR
FAB8 PTS R	TCTTAATTTATTGATTTACAGTGTC	3-C q-PCR
Fab7Fab8-F(2)	ACGATTGATGCAGGATTTGG	3-C q-PCR
Fab7Fab8-R	AACATCATTACGGGCTTTG	3-C q-PCR
FAB7 PTS F (3)	CTGGGGTTCGTGCTTCCAC	3-C q-PCR
FAB7 PTS R	CTGCCCTCGATTAATGCTC	3-C q-PCR
FAB6 PREa F	GCCAAGAAACCGCACTTATT	3-C q-PCR
FAB6 Prea R(4)	AGGAAGCCCCAGTTGAAGAT	3-C q-PCR
Mcpfab6-F (5)	CCGTGTCTTAGCCCGTAAT	3-C q-PCR
Mcpfab6-R	GCITTGCCCTGCGTAAACACTT	3-C q-PCR
Mcp Pre F (6)	CATGTACCAAAATCCAAGTGC	3-C q-PCR
Mcp Pre R	TTTGCTATCAGGGACATTTG	3-C q-PCR
Abd-A GeneF(7)	TTCCCGGTGTTTATTGTCC	3-C q-PCR
Abd-A Gene R	AAATTCGAATGACGTCGTG	3-C q-PCR
PntF	TCCATGTGTATGCGAGCGAG	ChIP-qPCR
PntR	CGAGTGCGGGACTTGTGTAT	ChIP-qPCR
McpC	TACACATAATACATGGCCGCG	ChIP-qPCR

McpT	AGGCAGCCATCAATGTTGC	ChIP-qPCR
Fab-7 (83500) C	GGAATACCGCACTGTCGTAGG	ChIP-qPCR
Fab-7 (83500) T	GCAGCCATCATGGATGTGAA	ChIP-qPCR
Fab-8 C2	GCTTCTACGGCATTITTTCT	ChIP-qPCR
A prom F	GCATTAATTAGTCACTGCGCTTG	ChIP-qPCR
A prom R	GTTGGTGCGGCTCTCTTGT	ChIP-qPCR
B prom F	GGGCCATAAAACCCAAAATAA	ChIP-qPCR
B prom R	GACAAAGCCGACGCGAAT	ChIP-qPCR
Fab-8 T2	GAATGGAACCTTCGCTTGC	ChIP-qPCR
Shn F	ACGCAGGGTCTGTCAAAGT	ChIP-qPCR
Shn R	GTAGCGGTATCCTCTGCTCG	ChIP-qPCR
SmrF	ACATCTAATGGGCAAGGTCG	ChIP-qPCR
SmrR	TTACGTTGAAGCTTTTCGCGT	ChIP-qPCR
Moe F	TTCTTCTCGCGTTGGATCA	ChIP-qPCR
Moe R	CTTGTCGCTCCGCAATTTT	ChIP-qPCR
Torso F	CCAGTCAGAGCGATGTTTGGT	ChIP-qPCR
Torso R	GACGGATATGGCATTCCACC	ChIP-qPCR
Rpl23 F	GACAACACGGAGCCAAGAACC	ChIP-qPCR
Rpl23 R	GTTTGCCTGCCGAATAACCAC	ChIP-qPCR

3.1.2. Anticuerpos

Tabla 2. Lista de anticuerpos primarios para *Western Blot*

Primarios	Características y uso	Origen
H3T3p	Conejo; (1:2000)	Millipore 04-746
H3	Conejo; (1:5000)	Cell signaling (9715)
HA	Rata; (1:500)	Roche 1867423
Myc	Ratón; (1:1000)	Millipore 05-724

Tabla 3. Lista de anticuerpos secundarios para *Western Blot*

Secundarios	Características y uso	Origen
Anti-conejo HRP	Conejo; (1:10000)	Jackson (111-035-144)
Anti-rata HRP	Rata; (1:10000)	Jackson (712-035-150)
Anti-ratón HRP	Ratón; (1:10000)	Jackson (715-035-150)

Tabla 4 . Lista de anticuerpos para Inmunoprecipitación

Proteína que reconoce	Características y uso	Origen
Pc	Conejo; 3µl	Santa Cruz (sc-25762)
H3K27me3	Conejo; 3µl	Upstate (07-449)
Flag	Conejo;	SIGMA F7425,
Haspin*	Rata; 3µl	Creado en el laboratorio
SA	Conejo; 5 µl	Cedido por el Dr. Dorsett

*El anticuerpo de Haspin fue creado y caracterizado en el laboratorio durante la tesis de Ujué Fresán en el laboratorio: funciona para IP e inespecífico para *Western Blot* y inmunofluorescencia.

Tabla 5. Lista de anticuerpos para hibridación in situ (FISH y ISH)

Proteína que reconoce	Características y uso	Origen
Digoxigenina (AP)	Oveja; 1:2000	Sigma-Aldrich
Digoxigenina	Oveja; 1:125	Sigma-Aldrich
Anti-oveja (Cy5) (Secundario)	Donkey; 1:500	Jakson

Tabla 6. Lista de anticuerpos para inmunofluorescencia

Primarios	Características y uso	Origen
Abd-B	Ratón 1:400	Hybridoma Bank (1A2E9)
lbf2	Rata 1:500	Creado en el laboratorio
Secundarios	Características y uso	Origen
Anti-rata cy2	Ratón; (1:200)	Jakson (712-225-150)
Anti-ratón	Rata; (1:200)	Jakson (115-165-146)

3.1.3. Líneas de *Drosophila melanogaster*

Tabla 7. Lista de líneas de *Drosophila melanogaster* utilizadas

Nombre	Descripción	Origen
<i>w</i> ¹¹¹⁸	Mutación de <i>white</i>	<i>Bloomington Drosophila Stock Center</i>
<i>act5C-Gal4 (Actina-Gal4)</i>	Expresa Gal4 de manera ubicua bajo control del promotor de <i>Actina</i>	<i>Bloomington Drosophila Stock Center</i>
<i>esg-Gal4 (escargot-Gal4)</i>	Expresa Gal4 de manera ubicua bajo control del promotor de <i>escargot</i>	<i>Bloomington Drosophila Stock Center</i>
<i>lbf2</i> ^{GSV17}	Mutante de <i>lbf2</i>	Cuartero et al., 2014
<i>lbf1</i> ^{RNAi}	RNAi contra <i>lbf1</i> bajo control de la secuencia UAS	Cuartero et al., 2014
<i>CTCF</i> ^{RNAi}	RNAi contra <i>CTCF</i> bajo control de la secuencia UAS	Vienna Drosophila RNAi Center-VDRC #30713
<i>CTCF</i> ^{RNAi}	RNAi contra <i>CTCF</i> bajo control de la secuencia UAS	Vienna Drosophila Center-VDRC #108857
<i>tsh-Gal4 (Teashirt-Gal4)</i>	Expresa Gal4 de manera ubicua bajo control del promotor de <i>teashirt</i>	Cedida por el laboratorio del Dr. Marco Milán
<i>GFP</i>	Expresión de GFP bajo control de la secuencia UAS	Creada en el laboratorio
<i>Haspin</i> ¹²⁸	Mutante de <i>Haspin</i>	Creada en el laboratorio

<i>Haspin^{RNAi}</i>	Mutante de Haspin	Creada en el laboratorio
Pc ¹	Mutante de Pc	<i>Bloomington Drosophila Stock Center</i>
Pc ³	Mutante de Pc	<i>Bloomington Drosophila Stock Center</i>
Pc ¹⁵	Mutante de Pc	<i>Bloomington Drosophila Stock Center</i>
Fab7PSS (PRE7 ¹⁴)	PRE del Fab7 junto con el gen <i>mini-white</i> como reportero	(Rank et al., 2002)
5F24 25,2	Fab7 insertado en el cromosoma X cerca del gen <i>scalloped</i>	(Bantignies et al., 2003)
<i>UAS-Pds5-HA-Flag</i>	Expresa Pds5 bajo control de la secuencia UAS	DGRC (UFO12474)
<i>Vtdex3;tub-Rad21-myc</i>	Expresa Rad21-myc bajo expresión del promotor de <i>Tubulina</i> en un fondo mutante para Rad21 (<i>Vtd^{ex3}</i>)	<i>Bloomington Drosophila Stock Center</i>
<i>In(1)wm4</i>	Gen <i>white</i> insertado en el cromosoma X	<i>Bloomington Drosophila Stock Center</i>

3.1.4. Líneas celulares

En esta tesis se han utilizado tres líneas celulares distintas que derivan de embrión de *Drosophila melanogaster*. La primera y con la más hemos trabajado es la línea celular Kc167, la segunda es la línea Dmel2, y la tercera y última la Sg4.

3.2. Métodos

3.2.1 Manipulación de cultivos celulares

3.2.1.1. Mantenimiento de cultivos celulares

Las líneas celulares Kc167, Dmel2 y Sg4 crecen en un ambiente de 25°C sin CO₂ en medio *Schneider's Drosophila Medium* (Biowest). Éste medio está enriquecido con 100µg/ml de estreptomicina (Gibco), 100 unidades/ml de penicilina (Gibco). En el caso de las líneas Kc167 y Sg4 ambas requieren de un suplemento del 10% de serum fetal bovino (FBS) (Gibco), el cual debe de estar previamente inactivado durante 30 minutos a 56°C. El mantenimiento de las células se realiza en frascos (Corning) de 75 cm² en 5 ml de medio con una confluencia celular de entre $1-8 \cdot 10^6$ células/ml, a través de diluciones 1/5 cada 3 o 4 días.

Para preservar la continuidad de las líneas se mantienen los stocks congelados en nitrógeno líquido. Para congelar las células es necesario dejarlas crecer en un frasco hasta obtener una densidad celular de $5 \cdot 10^6$ células/ml. Cuando obtenemos la confluencia deseada el cultivo se pasa a un falcon de 15 ml para centrifugar las células durante 5' a 1000 rpm a temperatura ambiente. Seguidamente se elimina el sobrenadante y se resuspende el sedimento celular en 900 µl de FBS. La suspensión se pasa a un criotubo y se añade 100 µl de DMSO gota a gota. El proceso de congelación es delicado, es por eso por lo que pasa por diferentes temperaturas que decrecen de manera gradual con la finalidad de evitar un estrés celular y preservar la viabilidad de las células. Por esa razón el criotubo se guarda a -20°C durante las 2 primeras horas, después toda la noche a -80°C y, finalmente se guarda en nitrógeno líquido.

El proceso para descongelar consiste en recuperar uno de los tubos que se encuentran preservados en nitrógeno líquido el cual debe descongelarse rápidamente con las manos. Seguidamente se diluye

el mililitro de células en suspensión en 4 ml de medio atemperado que se encuentran en un falcon de 15 ml. Éstas se centrifugan durante 5 min a 1000 rpm a temperatura ambiente para así a continuación resuspender el sedimento celular en 5 ml de medio enriquecido de distinta manera en función de la línea celular que estemos manipulando. Por último, la suspensión celular se siembra en un frasco de 75 cm² y se deja crecer en las condiciones de cultivo mencionadas anteriormente. Durante los 3 o 4 días siguientes es conveniente realizar un seguimiento periódico con la finalidad de asegurar la viabilidad de nuestro cultivo.

3.2.1.2. Obtención de la condición deficiente de Haspin en células Kc167

3.2.1.2.1. 5-Iodotubercidina

En la bibliografía está descrito el uso de la 5-iodotubercidina como inhibidor de Haspin (De Antoni et al., 2012). Previamente a esta tesis no se había descrito ningún uso de este como puesto en células de *Drosophila*, por ese motivo se puso a punto su eficiencia partiendo de lo que está descrito en células HeLa en la literatura (De Antoni et al., 2012).

El compuesto disuelto en etanol absoluto a una concentración final de 1,78 mg/ml se preserva a -20°C. Su análisis se realizó en dos células en crecimiento exponencial y en estacionarias. En primer lugar, se debe a que en células mitóticas se han realizado todos los estudios previos sobre 5-itu, y además los valores de H3T3p durante la mitosis son superiores que, en interfase, así que el analizarlo en un cultivo exponencial nos da más posibilidades de tener un número mayor de células mitóticas. En segundo lugar, el análisis del compuesto en células estacionarias se debe a que nuestro objetivo es el estudio de Haspin durante la interfase.

Se sembraron $6 \cdot 10^6$ células en 5ml de medio completo, para cada una de las condiciones. Las estacionarias se sembraron el día 1 y las mitóticas el día 5. El día 6 se tratan ambos cultivos con la concentración deseada. En este caso se analizó a $1 \mu\text{M}$ y a $10 \mu\text{M}$, después de 24 horas de tratamiento. El día 7, 6 horas antes de la recogida se añade colchicina al cultivo de células en crecimiento exponencial, con la finalidad de detener las células en mitosis. Finalmente se recogen las células a la semana de estar sembradas y se resuspenden en PLB 1X-beta-mercaptoetanol 2% para analizar los niveles de H3T3p mediante *Western Blot*.

Finalmente, observamos que la condición ideal era con el tratamiento a $10 \mu\text{M}$ de 5-itu.

3.2.1.2.2. Interferencia de Haspin en células Kc167

Con el tratamiento con RNA de doble cadena (dsRNA) se consigue el silenciamiento génico post-transcripcional de los genes deseados. En nuestro caso, utilizamos este tratamiento para la obtención de células Kc167 sin la presencia de Haspin. Con la finalidad de disminuir al máximo los niveles de esta kinasa, diseñamos con dsRNA distintos, para usarlos a la vez y potenciar su eficacia. También es necesario que la condición control sea tratada con el mismo procedimiento que la condición mutante, por eso, se sintetiza dsRNA contra una secuencia incapaz de encontrarse en las células.

Una vez seleccionada la secuencia a amplificar, se realiza una PCR convencional con unos oligonucleótidos que incorporan el promotor de la polimerasa bacteriana T7 en sus extremos. A continuación, con el producto obtenido se hace la transcripción in vitro siguiendo el protocolo del kit Megascript T7 (Invitrogen), incorporando el paso de

la TurboDNAsa durante la purificación del dsRNA para la eliminación del DNA molde que pueda haber.

El procedimiento más eficaz para la depleción de Haspin consiste en la siembra de $4 \cdot 10^6$ células en medio fresco y se tratan con $10 \mu\text{g/ml}$ de dsRNA durante 1h y 30 min. Pasado este tiempo se enriquece el medio hasta obtener un volumen de 5ml a una concentración de 10% FBS y 1% P/S. Los días 3 y 5 se vuelve a añadir 5ml de medio enriquecido y se las trata nuevamente con $10 \mu\text{g/ml}$ de dsRNA. Finalmente, el día 7 las células son recogidas.

El análisis de la eficiencia del tratamiento se realiza en este caso mediante RT-PCR, que se describe más adelante en el apartado de análisis del RNA. Con el uso de esta técnica analizamos los niveles de RNA que no ha sido degradado mediante el tratamiento con dsRNA y que puede ser traducido.

Todos los experimentos realizados con el uso de células Kc167 tratadas con dsRNA no tenían una reducción menor del 70%.

3.2.2 Técnicas experimentales

3.2.2.1 Técnicas para el estudio del DNA

3.2.2.2.1. Técnicas básicas

a) Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la realización de la PCR clásica hemos utilizado unas condiciones estándar a las que hemos ido haciendo variaciones según los oligonucleótidos (aumentando o disminuyendo la temperatura de hibridación y/o la concentración de magnesio).

La reacción estándar se prepara con el DNA molde (a una concentración en nanogramos), $MgCl_2$ a 2 mM, dNTPs a 0,4 mM, el tampón a 1X, los oligonucleótidos a 0,5 pmol/ μ l y la polimerasa a 0,05 U/ μ l. En esta tesis la polimerasa utilizada es la de Taq Polimerasa (Biotools).

El programa estándar utilizado:

2 minutos a 95°C

1 min a 95°C (desnaturalización)	} 30 ciclos
1 min a 55°C (hibridación)	
1 min a 72°C (elongación)	

10 min a 72°C

Finalmente, para garantizar el éxito de la PCR es conveniente comprobar si el tamaño del producto de la PCR es el deseado mediante un gel de agarosa al 1% o al 0,8%.

b) Extracción de DNA genómico de la mosca

La mosca escogida para su análisis se congela previamente a el procedimiento a -20°C con la finalidad de inmovilizarla durante la extracción. El primer paso es añadir 40 μ l de solución SB y 10 μ l de proteinasa K 20mg/ml a la mosca y se disgrega mecánicamente, con

la punta de la micropipeta. La muestra se incuba primeramente durante 30 minutos a 37°C y después a 95°C a 3 minutos para la inactivación de la proteinasa K. La muestra a continuación se diluye 1/5 para poder utilizarla en la técnica PCR.

Medio LB

10 mM Tris-HCl pH 8
1 mM EDTA
25 mM NaCl

3.2.2.1.2. Técnicas de trabajo para el estudio de la cromatina

a) *Chromosome Conformation Capture (3-C)*

Esta técnica consiste en el análisis de los contactos que se realizan en la cromatina. En esta tesis se ha realizado en embriones y en células. En ambos casos el protocolo es prácticamente igual, tan solo se diferencian en la cantidad y del tejido preparación antes de la digestión con el enzima deseado.

En el caso de realizarlo en células Kc167 es necesario $20 \cdot 10^6$ células fijadas con formaldehído al 1,8% durante una reacción de 10 minutos detenida con glicina 0,125M. A continuación, estas células se centrifugan 5 minutos a 1000 rpm y se resuspenden en 500 μ l con buffer Hi-C de lisis y se incuban durante 15 minutos en hielo.

Para realizar el experimento en embriones es necesario partir de unos 100 μ l de embriones decorionados de 16 a 18 horas de vida. A continuación, se decorionan en lejía durante 3 minutos, se ponen en un pequeño tamiz para eliminar la lejía y se lavan primero con Tritón al 0,1X y luego con 10mM Tris-HCl pH 7,5. A continuación se resuspenden en buffer ENB y se pasan por un émbolo de 2 ml del tipo A. Una vez realizado 20 subidas y bajadas se cuele la muestra con una gasa y se centrifuga durante 5 minutos a 5000 rpm a 4°C. Se resuspende en 1ml de PBS1X y se fija con formaldehído al 1% durante 5 min en agitación. Para para la reacción se añaden 100 μ l

de glicina 1,2M y se mantiene en agitación durante 5 minutos. Se centrifugan los núcleos a 5000 rpm durante 5 minutos, se descarta el sobrenadante y se resuspenden en 1 ml de PBS1X para lavarlos.

A continuación, las muestras procedentes de los dos tipos de tejidos siguen el mismo protocolo. Después de centrifugar 5 minutos a 1200rpm se resuspenden los pellets con 50 µl de SDS 0,5% y se incuban durante 5 minutos a 65°C. Una vez pasado el tiempo se le añaden 145µl H₂O y 25µl Tritón 10%. Seguidamente se incuban a 37°C durante 15 minutos y se deja atemperar. A continuación, se le añade 25µl del buffer de la enzima y 100 unidades de la enzima deseada, en nuestro caso se trata de DpnII. La digestión de la cromatina se realiza durante toda la noche a 37°C.

Al día siguiente, mediante una incubación a 65°C durante 10 minutos se produce la inactivación de la enzima. Seguidamente se realiza la ligación de los extremos de la cromatina que se encuentren próximos con ligasa durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, se centrifuga a 1200 rpm durante 5 minutos y se resuspende la muestra con 400 µl de buffer de elución. Seguidamente la cromatina se realiza el *decrosslinking* añadiendo 20 µl de NaCl 5M, 8 µl de 0'5 EDTA ph8 y 16 µl de Tris-HCl ph8. Además, también se le añaden 8 µl de RNAsa A 10mg/ml y se incuba a 65°C durante 4 horas. Una vez transcurrido el tiempo, la muestra se atempera y se le añaden 8 µl de Proteinasa K 20mg/ml la cual durante 1 hora a 55°C realizará la degradación de las proteínas. A continuación, se procede a la purificación y precipitación del DNA, para ello es necesario añadir el mismo volumen de fenol:clorofomo que de muestra. Seguidamente se agita y se centrifuga 10 minutos a máxima potencia. Se recupera la fase acuosa y se añaden 2,5 veces de Etanol absoluto, 1 décima parte de 3M C₂H₃NaO₂ y 2 µl de acrilamida. Por último, se agita todo, se le hace un centrifugado corto para bajar toda la muestra y se deja precipitando a -20°C durante la noche.

Al día siguiente se centrifuga durante 20 minutos a máxima revolución en frío. Con cuidado de no llevarnos el pellet se retira el sobrenadante y se añade etanol al 70%. A continuación, se centrifuga, se retira el sobrenadante y dejamos secar el pellet. Finalmente, este pellet se resuspende en 100µl de H₂O Milli-Q.

El análisis de los contactos se realiza mediante la cuantificación de los amplicones generados mediante q-PCR tal como se explica en uno de los apartados a continuación,

<u>Buffer ENB</u>	<u>Buffer de lisis Hi-C</u>	<u>Buffer de elución</u>
10% Sacarosa	10mM Tris HCl pH 8	0,1M NaHCO ₃
10mM Tris HCl pH 8	10mM NaCl	1% SDS
1mM CaCl ₂	0,2% NP-40	
0,1mM PMSF		

b) Inmunoprecipitación de la cromatina y análisis por secuenciación (ChIP-seq)

La inmunoprecipitación de la cromatina y su análisis por secuenciación se denomina ChIP-seq permite conocer en qué lugares del genoma se encuentra la proteína inmunoprecipitada. En esta tesis, el ChIP-seq que se muestra fue realizado y analizado en el laboratorio del Dr. Victor Corcés en la Universidad de Emory en Atlanta. Por esa razón este protocolo es distinto al del ChIP-qPCR que se muestra en el apartado siguiente.

Para cada inmunoprecipitación se parte de 20·10⁶ células fijadas durante 10 minutos a temperatura ambiente con formaldehído a una concentración final de 1,8% para el *crosslinking* entre las proteínas y el DNA. Una vez transcurrido el tiempo se para con glicina a una concentración final de 0,125 M. Se centrifuga 2 minutos a 1500 rpm y se realizan dos lavados con PBS1X. A continuación, todos los pasos del protocolo se realizarán en frío hasta que se diga lo contrario. El pellet de células se resuspende en 200 µl buffer de lisis de célula y se incuba en hielo durante 15 minutos. Una vez

transcurrido el tiempo se centrifuga durante 8 minutos a 4000 rpm. Seguidamente se retira el sobrenadante, se resuspende el pellet con 200 μ l de buffer de lisis de núcleo y se incuba en hielo durante 20 minutos. A continuación, se añade 100 μ l de buffer de la dilución de inmunoprecipitación. El siguiente paso corresponde a la sonicación, que se realiza en el Bioruptor. Las muestras en eppendorfs son sonicadas durante 28 ciclos de 30 segundos de encendidos y 60 segundos de apagado. Después se centrifuga durante 10 minutos a máxima velocidad para descartar los restos celulares.

La cromatina sonicada se diluye 5 veces y se le realiza un lavado con una mezcla de *Dynabeads* de proteína A y G bloqueadas con BSA al 0,5%. Después de una incubación de 2 horas, las bolas se descartan. Seguidamente se retiran 75 μ l de muestra que corresponden al input del 5%.

La muestra restante se incuba durante toda la noche con *Dynabeads* A y G que han sido preincubadas con el anticuerpo y bloqueadas con BSA 0,5% durante 4 horas mínimo.

Al día siguiente, se realizan varios lavados de 5 minutos a las *Dynabeads* que si todo ha ido bien habrán captado la proteína unida a la cromatina. El primer buffer usado tres veces es el de lavado con baja sal. A continuación, se realizan 2 lavados con el buffer de lavado, pero con alta concentración de sales. Seguidamente se realizan 2 lavados más con el buffer de LiCl y por último se acaba con 1 con TE. El DNA unido a las *Dynabeads* se eluye con 400 μ l de buffer de elución de la inmunoprecipitación. En el caso del input, se le añade 369 μ l de buffer de elución de la inmunoprecipitación para igualar el volumen al de la muestra inmunoprecipitada. A todas las muestras se les añade a la muestra 20 μ l NaCl 5M, 8 μ l EDTA 0,8M y 16 μ l Tris-HCl 1M y se incuban durante 6 horas a 65°C para revertir el *crosslinking*. A continuación, se añade 4 μ l de proteinasa K 20 mg/ml y se incuba durante 3 horas a 50°C para degradar las proteínas.

Finalmente se purifica el DNA por el método del fenol-cloroformo y se precipita con etanol como se explica en detalle en el protocolo del 3-C. Finalmente el pellet se resuspende con 25 µl de buffer de elución.

La preparación de la librería se hizo con *Illumina Sequencing* en Atlanta. El análisis de la calidad de las muestras y la secuenciación fue analizada por su proveedor del servicio. El análisis de la secuenciación fue realizada por el Dr.Oscar Reina miembro del equipo de Bioinformática del IRB de Barcelona.

<u>Buffer de lisis de célula</u>	<u>Buffer de lisis de núcleo</u>
5mM PIPES pH8	50mM Tris HCl pH8
85mM KCl	10mM EDTA
0,5% NP-40	1%SDS

<u>Buffer de dilución de la IP</u>	<u>Buffer baja sal</u>	<u>Buffer elevada sal</u>
0,01% SDS	0,1%SDS	0,1%SDS
1,1% Tritón 100X	1%Tritón 100X	1%Tritón 100X
1,2mM EDTA	2mM EDTA	2mM EDTA
16,7mM Tris HCl pH8	20mM Tris HCl pH8	20mM Tris HCl pH8
167mM NaCl	167mM NaCl	500mM NaCl

<u>Buffer de LiCl</u>	<u>Buffer TE</u>	<u>Buffer de elución</u>
1mM EDTA	10mM Tris HCl pH8	100mM NaHCO ₃
10mM Tris HCl pH8	1mM EDTA	1% SDS
0,25M LiCl		
1% NP-40		
1% DOC		

c) Inmunoprecipitación de la cromatina y qPCR (ChIP-qPCR)

Esta técnica consiste en la inmunoprecipitación de la cromatina mediante anticuerpos contra la proteína de la cual queremos cuantificar su presencia en regiones concretas de la cromatina mediante q-PCR. Durante esta tesis se han utilizado varios tejidos para el análisis, y por ese motivo se han utilizado distintos protocolos

para la preparación del tejido y la obtención de la cromatina sonicada. Los pasos seguidos desde la preparación de la cromatina para la inmunoprecipitación hasta el final son los mismos para todos. A continuación, se detallará el protocolo específico para células, luego el de cerebros y embriones y finalmente los últimos pasos donde convergen.

- Células

Para el análisis en células es necesario $5 \cdot 10^7$ células. Estas, se fijan con formaldehído a una concentración final de 1,8% durante 10 minutos y después, con glicina a una concentración final de 0,125M se para la reacción. A continuación, todos los pasos se realizarán en frío. Después de lavar las células con PBS se resuspenden en 10ml de buffer de lavado A durante 10 minutos. Después de centrifugar las muestras durante 5min a 1000rpm. Se resuspende el pellet con 10 ml de buffer de lavado B. Se centrifugan las muestras durante 5 minutos a 1000 rpm y se resuspenden en 4,5 ml de TE y se añaden 0,5 ml de SDS 10%. Se invierte el tubo 5 veces y se centrifuga la muestra durante 5 minutos a 1000rpm. Se retira el sobrenadante, se añade 5 ml de TE, se invierte el tubo 5 veces y se centrifuga la muestra durante 5 minutos a 1000 rpm. Este último paso se repite 1 vez más. Luego se añaden 2 ml de TE y 20 μ l de SDS 10%. A continuación, los 2 ml de la muestra con cromatina se traspasan a un tubo de 15 ml de la marca Diogenade. Se sonicán las muestras durante 1 minuto y 30 segundos en el Bioruptor. Después se añade en primer lugar Tritón 100x para que quede a una concentración final de 1%, a continuación, DOC 10x a una concentración final 0,1% y finalmente NaCl 4M para que la solución quede a 140mM. Se incuba durante 10 minutos y se centrifuga durante 5 minutos a máxima velocidad. A continuación, se utilizan 100 μ l de la cromatina sonicada para cada inmunoprecipitación y 10 μ l para obtener un input al 10%.

- Cerebros

El análisis en cerebros de larva 3 de *Drosophila melanogaster*, se debe realizar con 80 cerebros para cada inmunoprecipitación. Después de ser diseccionados en PBS en hielo, se realiza el *crosslinking* de las proteínas y el DNA con formaldehído a una concentración final al 1% durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, la reacción se detiene con glicina al 1,2M. Todos los pasos del protocolo se realizarán en frío hasta que se diga lo contrario. Los cerebros se lavaban con PBS1X y se resuspenden en 200 µl de buffer de lisis de célula. A continuación, se machacan con un homogeneizador de tejido cuidadosamente para no hacer burbujas y se incuban en hielo durante 15 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se centrifuga durante 8 minutos a 4000 rpm. Seguidamente se retira el sobrenadante, se resuspende el pellet con 200 µl de buffer de lisis de núcleo y se incuba en hielo durante 20 minutos. A continuación, se añade 100 µl de buffer de la dilución de inmunoprecipitación. El siguiente paso corresponde a la sonicación y se realiza en el Branson al 20% de frecuencia durante 1 minuto y 15 segundos en ciclos de 4 segundos de encendido y 20 segundos de apagado. A continuación, se centrifuga durante 20 minutos a máxima velocidad para descartar los restos celulares. A continuación, se prepara la cromatina sonicada para ser inmunoprecipitada para ello necesitamos 200µl de cromatina sonicada. A demás se apartan 20µl de cromatina sonicada y se dejan a -20°C que corresponden al input al 10%.

- Embriones

Para realizar el experimento en embriones es necesario partir de unos 200 µl de embriones decorionados de 21 a 23 horas de vida. A continuación, se decorionan en lejía durante 3 minutos, se ponen en un pequeño tamiz para eliminar la lejía y se lavan primero con Tritón al 0,1X y luego con 10mM Tris-HCl pH 7,5. A continuación se

resuspenden en buffer 2 ml ENB y se pasan por un embolo de 2 ml del tipo A. Una vez realizado 20 subidas y bajadas se cuele la muestra con una gasa y se centrifuga durante 5 minutos a 5000 rpm a 4°C. Se resuspende en 1 ml de PBS1X y se fija con formaldehido al 1% durante 5 min en agitación. Para para la reacción se añaden 100 µl de glicina 1,2M y se mantiene en agitación durante 5 minutos. Se centrifugan los núcleos a 5000 rpm durante 5 minutos, se descarta el sobrenadante y se resuspenden en 1 ml de PBS1X para lavarlos. Se retira el sobrenadante, se resuspende el pellet con 700 µl de buffer TS. El siguiente paso corresponde a la sonicación y se realiza en el Branson al 20% de frecuencia durante 90 segundos en ciclos de 30 segundos de encendido y 20 segundos de apagado. A continuación, se centrifuga durante 20 minutos a máxima velocidad para descartar los restos celulares. A continuación, se prepara la cromatina sonicada para ser inmunoprecipitada para ello necesitamos 200 µl de cromatina sonicada. A demás se apartan 20 µl de cromatina sonicada y se dejan a -20°C que corresponden al input al 10%.

- Células, cerebros y embriones

A partir de aquí los 3 protocolos coinciden. La muestra se lleva a 1 ml de RIPA y se le hace un prelavado durante 1 hora con 40 µl bolas de sefarosa de proteína A y proteína G. A continuación, se descartan las bolas y se añade el anticuerpo deseado que se incubará durante toda la noche.

Al día siguiente se añaden 35 µl de bolas de sefarosa de proteína A y proteína G para captar el anticuerpo unido a la cromatina durante 3 horas. Transcurrido el tiempo se procede al lavado de las bolas. El primer lavado tres veces es el RIPA. A continuación, se realizan 1 lavado con el buffer de LiCl y por último se acaba con 2 con lavados de TE. Las bolas finalmente se resuspenden con 40µl de TE. En el caso del input, se le añade TE para igualar el volumen al de la

muestra inmunoprecipitada. A continuación, se añaden 0,5 µl de RNasa A y se incuba durante 30 minutos a 37°C. Seguidamente a todas las muestras se les añade 30 µl NaHCO₃ 1M, 30µl SDS 10% y 4µl de proteinasa K 20 mg/ml y se incuban durante toda la noche a 65°C para revertir el *crosslinking*. Finalmente se purifica el DNA por el método del fenol-cloroformo y se precipita con etanol como se explica en detalle en el protocolo del 3-C. Finalmente el pellet se resuspende en 25µl H₂O Milli-Q. El análisis de las muestras se realiza mediante q-PCR. Este método de análisis se describe en uno de los apartados siguientes.

Buffer ENB

10% Sacarosa
10mM Tris HCl pH 8
1mM CaCl₂
0,1mM PMSF

Buffer TS

15Mm Tris-HCl pH 7,5
60mM KCl
2mM EDTA
1mM DTT

Buffer de lavado A

10 mM Hepes pH 7,9
10 mM EDTA
0,5mM EGTA
0,25% Tritón X100
0,01 Tritón X100

Buffer de lavado B

10 mM Hepes pH 7,9
100mM NaCl
1 mM EDTA
0,5mM EGTA
0,1% SDS

RIPA

140mM NaCl
10mM Tris-HCl pH 8
1 mM EDTA
1% X100Tritón
0,1% DOC

Buffer de LiCl **Buffer de lisis de célula** **Buffer de lisis de núcleo**

250Mm LiCl	5mM PIPES pH8	50mM Tris HCl pH8
10Mm Tris-HCl pH8	85mM KCl	10mM EDTA
1mM EDTA	0,5% NP-40	1%SDS
0,5% NP-40		
0,5% DOC		

Buffer de dilución de la IP

0,01% SDS
1,1% Tritón 100X
1,2mM EDTA
16,7Mm Tris HCl pH8
167mM NaCl

Buffer baja sal

0,1%SDS
1%Tritón 100X
2mM EDTA
20Mm Tris HCl pH8
167mM NaCl

Buffer elevada sal

0,1%SDS
1%Tritón 100X
2mM EDTA
20Mm Tris HCl pH8
500mM NaCl

Buffer TE

10mM Tris HCl pH8
1mM EDTA

Buffer de elución

100mM NaHCO₃
1% SDS

d) Hi-ChIP

El análisis de los contactos que se dan en la cromatina específicos donde una proteína en concreto está presente se realiza mediante la técnica conocida como Hi-ChIP. Esta técnica combina los pasos utilizados en las técnicas de análisis de los contactos de la cromatina como el 3-C explicado anteriormente junto con la inmunoprecipitación del ChIP.

Para realizar el análisis es necesario $50 \cdot 10^6$ de células fijadas durante 10 minutos a temperatura ambiente con formaldehído a una concentración final de 1,8% para preservar la unión de las proteínas a DNA. Este número de células da para la realización de dos inmunoprecipitaciones. Una vez transcurrido el tiempo se para con glicina a una concentración final de 0,125M. Se centrifuga 2 minutos a 1500 rpm y se realizan dos lavados con PBS. A continuación, estas células se centrifugan 5 minutos a 1000 rpm y se resuspenden en 500 μ l con buffer de lisis Hi-C y se incuban durante 15 minutos en hielo. Después de centrifugar 5 minutos a 1200rpm se resuspenden los pellets con 50 μ l de SDS 0,5% y se incuban durante 5 minutos a 65°C. Una vez pasado el tiempo se le añaden 145 μ l H₂O y 25 μ l Tritón 10%. Seguidamente se incuban a 37°C durante 15 minutos y se deja atemperar. A continuación, se le añade 25 μ l del buffer de la enzima y 100 unidades de la enzima deseada, en nuestro caso DpnII. La digestión de la cromatina se realiza durante toda la noche a 37°C.

Al día siguiente se marcan los extremos con Biotina añadiendo 150 μ l de buffer de Biotina incubando la muestra a 37°C durante 45 minutos. A continuación, se procede a la ligación de los extremos añadiendo 900 μ l de buffer de ligación y incubando la muestra durante 2h a temperatura ambiente. Después de centrifugar la muestra durante 5 minutos a 1200rpm y descartamos el sobrenadante. Seguidamente se añade 1,5ml de buffer de lisis de núcleo. Se incuban la muestra 15 minutos en hielo y se procede a la sonicación, mediante 6 ciclos de

30 segundos de encendido y 60 segundos de apagado. Después se añade Tritón100% a una concentración final 1%, para evitar la degradación del anticuerpo por parte del SDS. A continuación, se centrifuga durante 10 minutos a 4°C para eliminar los restos celulares.

A la cromatina sonicada se le realiza un lavado con una mezcla de Dynabeads de 50µl proteína A y G bloqueadas con PBS-BSA al 0,5%. Después de una incubación de 1 hora, las bolas se descartan y se le añade nuevamente 50µl de *Dynabeads* A y G. La muestra se incuba durante toda la noche con las bolas que han sido preincubadas con el anticuerpo y bloqueadas con PBS-BSA 0,5% durante 4 horas mínimo.

Al día siguiente, se realizan varios lavados de 5 minutos a las *Dynabeads* que si todo ha ido bien habrán captado la proteína unida a la cromatina. El primer buffer usado tres veces es el de lavado con baja sal. A continuación, se realizan 2 lavados con el buffer de lavado, pero con alta concentración de sales. Seguidamente se realizan 2 lavados más con el buffer de LiCl y por último se acaba con 1 con TE. El DNA unido a las *Dynabeads* se eluye con 400 µl de buffer de elución de la inmunoprecipitación. En el caso del input, se le añade 369 µl de buffer de elución de la inmunoprecipitación para igualar el volumen al de la muestra inmunoprecipitada. A todas las muestras se les añade a la muestra 20 µl NaCl 5M, 8 µl EDTA 0,8M y 16 µl Tris-HCl 1M y se incuban durante 6 horas a 65°C para revertir el *crosslinking*. A continuación, se añade 4 µl de proteinasa K 20 mg/ml y se incuba durante 3 horas a 50°C para degradar las proteínas. Finalmente se purifica el DNA por el método del fenol-cloroformo y se precipita con etanol como se explica en detalle en el protocolo del 3-C. Finalmente el pellet se resuspende en 100 µl en 10mM Tris-HCl pH=8,5. Para la selección de la cromatina marcada con biotina se añaden 10µl de bolas estreptavidina resuspendidas en 100µl de solución de estreptavidina a la muestra de DNA. Se deja incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, la

muestra de DNA marcada con biotina que se encuentra unida a las bolas puede manipularse para la preparación de la librería.

La preparación de la librería se hizo con *Illumina Sequencing* en Atlanta. El análisis de la calidad de las muestras y la secuenciación fue realizada por su proveedor del servicio. El análisis de la secuenciación fue realizada por el Dr. Jordan, miembro del laboratorio del Dr. Victor Corcés en la Universidad de Emory en Atlanta, Georgia (USA).

<u>Buffer de lisis Hi-C</u>	<u>Buffer de elución</u>	<u>Buffer de lisis de núcleo</u>
10mM Tris HCl pH 8	100mM NaHCO ₃	50mM Tris HCl pH8
10mM NaCl	1% SDS	10mM EDTA
0,2% NP-40		1%SDS

<u>Buffer de dilución de la IP</u>	<u>Buffer baja sal</u>	<u>Buffer elevada sal</u>
0,01% SDS	0,1%SDS	0,1%SDS
1,1% Tritón 100X	1%Tritón 100X	1%Tritón 100X
1,2mM EDTA	2mM EDTA	2mM EDTA
16,7Mm Tris HCl pH8	20Mm Tris HCl pH8	20Mm Tris HCl pH8
167mM NaCl	167mM NaCl	500mM NaCl

Buffer de LiCl
 1mM EDTA
 10Mm Tris HCl pH8
 0,25M LiCl
 1% NP-40
 1% DOC

Buffer TE
 10mM Tris HCl pH8
 1mM EDTA

3.2.2.2. Técnicas para el estudio del RNA

3.2.2.2.1. Extracción de RNA y Purificación

En esta tesis se han realizado extracciones de RNA de células Kc167, de cerebro de larva, de larva 3 y ovario de *Drosophila melanogaster*. La cantidad utilizada de cada tejido varia en función del tejido. Para la extracción en células son necesarias $5 \cdot 10^6$, 30 cerebros de larva, 10 larvas completas y 40 ovarios.

Antes de proceder a la extracción del RNA es necesario realizar un lavado con PBS1X a las células. Los tejidos utilizados son extraídos mediante la disección de estos bajo lupa y mantenidos en PBS1X frío durante el proceso.

Antes de iniciar la purificación es necesario extraer el PBS1X en el que las muestras se encuentran suspendidas. Seguidamente se añaden 500µl de trizol. A continuación, es necesario disgregar el tejido utilizando métodos adecuados a cada uno. Tanto en células como en larva enteras se disgregan mediante la aspiración y la extracción durante 20 veces de la solución junto al tejido utilizando una aguja de 0,8 mm de diámetro y una jeringuilla de 1 ml, en cambio en cerebros, la aguja es de 0,5 mm de diámetro. Para la extracción en cerebros y ovarios es necesario machacarlos utilizando un émbolo del tamaño apropiado para el eppendorf de 1,5 ml en el que se encuentran las muestras. A continuación, hacemos un pequeño pulso de centrifuga para unificar la muestra y se le añade 100 µl de cloroformo. La muestra se agita con la mano durante 2 minutos y se centrifuga a la máxima velocidad durante 15 minutos a 4°C. Recuperamos la fase acuosa y seguimos el procedimiento marcados por el kit RNAeasy minikit de Qiagen. En este caso añadimos un volumen de solución RLT y 2% de β-mercaptoetanol. Al finalizar se eluyen las muestras en H₂O MilliQ. El volumen en el que se eluye el RNA depende del tejido utilizado. En células 100µl, para larva 40µl y para cerebro y ovario 30µl. A continuación, es necesario analizar la concentración y la calidad de la purificación del RNA utilizando el Nanodrop 1000 3.7 *application* UV-Vis, a una absorbancia de 260nm.

3.2.2.2. Análisis de la expresión mediante RT-PCR

Esta técnica consiste en dos pasos necesarios para la evaluación en un primer paso en el que se retrotranscribe in vitro el RNA a cDNA para luego continuar con un segundo paso conocido como RT-PCR

en el que se amplifica el cDNA para poder conocer las cantidades relativas de las distintas moléculas de RNA.

La real-time PCR o PCR cuantitativa se realiza mediante del uso del SyberGreen, un reactivo que se une al DNA de doble cadena procedentes de la retrotranscripción y emite fluorescencia. Esta señal se detecta en el mismo termociclador donde se está realizando la amplificación permitiendo así conocer la cantidad de amplicón producido a través de los ciclos. El cálculo de las cantidades relativas de cDNA inicial surgen del hecho de que cuando se dan un mismo número de ciclos para todas las muestras, todas aquellas que producen más fluorescencia son aquellas que partían de más cDNA inicial y al revés para las que menos. Por lo tanto, no se trata de la estimación inicial del cDNA originada en cada muestra, sino que se trata de una estimación relativa entre muestras de un mismo experimento. Por ese motivo es necesario utilizar genes de transcripción constante y ubicua (*housekeeping*), como *Actina5C* o *RpL23* utilizados en esta tesis, para analizar los datos y presentar los resultados mediante el cálculo de la expresión relativa del gen de interés respecto el gen de referencia.

La retrotranscripción se realiza utilizando el kit *Transcript First Strand cDNA Synthesis Kit* de Roche. Son necesarios 800µg de RNA de la muestra a analizar, a la que se le añaden oligo-dT (que se une a las colas de poli-A del RNA) y oligo-random (que se une a diferentes zonas del RNA). Además se le añade buffer de transcripción 1X, inhibidor d'RNAsa 20U, mix de dNTP 1mM y 10U de transcriptasa reversa. Finalmente se lleva la reacción a un volumen de 20 µl, se deja a 50°C durante 1 hora y luego se inactiva la enzima durante 5 minutos. Finalmente, la muestra se eluye añadiendo 50 de H₂O Milli-Q.

La RT-PCR se lleva a cabo mediante el uso del KIT Light Cyclor 489 Sybr Green I Master. Cada una de las reacciones contienen 2'5µl de muestra, 0,5µl de cada oligonucleótido (*forward* y *reverse*), 5µl de SyberGreen y 1,5µl de H₂O Milli-Q. Con la máquina Light Cyclor 48^o de Rocher se realizan cada una de las reacciones en una misma placa de 96 pocillos. El programa utilizado es el siguiente:

5 minutos a 95°C	}	45 ciclos
10 segundos a 95°C (desnaturalización)		
10 segundos a 55°C (hibridación)		
3 segundos a 72°C (elongación)		

3.2.2.2.3. Análisis de la expresión mediante hibridación al RNA

En esta tesis se han realizado análisis de hibridación de in situ en embrión y en disco genital de larva macho.

La manipulación del tejido es distinto, en el caso de los embriones de estadio 12 se decorionan en lejía durante 3 minutos, se ponen en un pequeño tamiz para eliminar la lejía y se lavan primeo con Tritón al 0,1X y luego con 10mM Tris-HCl pH 7,5. En cuanto al disco genital, fue necesario utilizar la lupa de inmunofluorescencia para su disección, ya que su detección es complicada bajo la luz natural y el uso de la expresión del GFP en el disco mediante el promotor del gen *teashirt* nos permitió hacerlo.

En primer lugar, es necesario sintetizar las sondas, en este caso es necesario utilizar un DNA molde con la secuencia de interés a identificar. Este se obtiene con la amplificación de DNA genómico mediante el protocolo de PCR tradicional utilizando unos oligonucleótidos que contienen la secuencia T7 de la polimerasa. De esta manera obtendremos DNA molde con la secuencia de la T7

integrada. Y también se realiza otra amplificación con oligonucleótidos con la secuencia de la T3. El DNA se precipita igual que en los protocolos de DNA anteriormente descritos.

Luego se realiza la síntesis mediante una reacción e 2h a 37°C compuesta por 2 µg de DNA, 1µL de buffer de transcripción 10X, 1µg de digoxigenina UNTP *mix*, 1 µl de inhibidor de RNAsa y 1 µl de T7 o T3 RNA polimerasa en función del DNA molde. Pasado el tiempo se añade 17µl de H₂O. En este punto es necesario comprobar por gel de agarosa la calidad de la amplificación.

A continuación, se añaden 25 µl de carbonato de Buffer Carbonatado 2X, para provocar la degradación controlada del DNA durante una incubación de 10 minutos a 65°C. Transcurrido el tiempo se añaden 50 µl de Solución Stop para permitir la precipitación del DNA mediante la disminución del pH. A continuación, se añaden 10 µl de 4M LiCl para precipitar el RNA y 5 µl de 20 mg/ml tRNA. Finalmente se precipita con etanol como el DNA y se resuspende en 150µl de solución de hibridación.

Se testaron las dos sondas sintetizadas (T3 y T7) y una hibrida y la otra no como era de esperar puesto que una es el control negativo.

10X Buffer de Transcripción

0,4M Tris.-HCl pH 7,5
0,06 MgCl₂
0,1M NaCl
0,02M Spermidina-HCl

2X Buffer Carbonatado (pH 10,2)

120mM Na₂CO₃
80mM NaHCO₃

Solución Stop (pH 6)

0,2M NaAc

a) Protocolo para embriones

En embriones se utilizó la técnica FISH y ISH. En primer lugar es necesario decorionar los embriones de estadio 12 se en lejía durante

3 minutos, después estos se ponen en un pequeño tamiz para eliminar la lejía y se lavan primero con Tritón al 0,1X y luego con 10mM Tris-HCl pH 7,5. A continuación se fija con 2 ml de PEM, 2 ml de Heptano y 250 µl de formaldehído durante 20 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se extrae el PEM y se añaden 2 ml de metanol y se agitan durante 20 segundos. Se extraen los embriones con una pipeta de cristal que se encuentran al final del vial y se colectan en un eppendorf donde se lavaran 3 veces con metanol.

PEM

0,1M PIPES pH 6,9

2mM MgSO₄

1mM EGTA

- **In situ Fluorescente (FISH)**

En primer lugar, se lavan los embriones 5 veces con etanol, y luego se dejan durante 1 hora en una solución de xileno al 90% y etanol al 10%. Seguidamente se lavan 5 veces con etanol, y después 5 veces con metanol. A continuación, se lavan con metanol al 50% y 50% de la solución PTW y formaldehído al 5%. Luego se lavan 2 veces con formaldehído al 5% en PTW, y se incuban durante 25 minutos con la misma solución. Después, se incuban con acetona al 80% en PTW durante 10 minutos en frío. Se realizan 5 lavados con PTW y se procede a la segunda incubación con formaldehído al 5% en PTW. Se vuelven a lavar 5 veces con PTW y a continuación se incuban los embriones con 50% PTW y 50% solución de hibridación. Se procede a la prehibridación de los embriones durante 2 horas con solución de hibridación a 55°C. El siguiente paso consiste en la hibridación de los embriones con las sondas, en este caso las diluimos a una concentración 1:200 en solución de hibridación y se dejan incubando a 16 a 24 horas a 55°C

Al siguiente día es necesario realizar tres lavados con solución de hibridación nueva de 15 minutos. Y luego se realizan 3 lavados de 5

minutos con PTW. Seguidamente se bloquean los embriones con Western Blocking Reagent (WBR, Roche) al 20% en PTW durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se incuban con el anticuerpo primario durante toda la noche a una concentración 1:125 en solución 20%WBR.

A la mañana siguiente se lavan los embriones 2 veces con PTW durante 15 minutos y se vuelven a bloquear con 20% WBR en PTW durante 30 minutos. Seguidamente se incuban con el anticuerpo secundario 1:500 en 20%WBR en PTW durante 2 horas protegido de la luz a temperatura ambiente, recordando añadir DAPI los últimos 10 minutos de la incubación a una concentración 1:50. Para finalizar se lavan 2 veces con PTW durante 25 minutos en la rueda y se montan con Mowiol. Las muestras se analizan mediante microscopia confocal.

<u>PTW</u>	<u>Solución De Hibridación</u>
0,1X Tween 20	50% Formamida
PBS1X	5XSSC
	100µg/ml DNA espuma de salmón sonicado
	50µg/ml heparina
	0,1% Tween 20

- **Hibridación in situ (ISH)**

Los embriones se lavan los embriones 5 veces con etanol, y luego se dejan durante 1 hora en una solución de xileno al 90% y etanol al 10%. Seguidamente se lavan 5 veces con etanol, y después 5 veces con metanol. A continuación, se lavan con metanol al 50% y 50% de la solución PTW y formaldehído al 5%. Luego se lavan 2 veces con formaldehído al 5% en PTW, y se incuban durante 25 minutos con la misma solución. Después, se incuban con acetona al 80% en PTW durante 10 minutos en frío. Se realizan 5 lavados con PTW y se procede a la segunda incubación con formaldehído al 5% en PTW. Se vuelven a lavar 5 veces con PTW y a continuación se incuban los

embriones con 50% PTW y 50% solución de hibridación. Se procede a la prehibridación de los embriones durante 2 horas con solución de hibridación a 55°C. El siguiente paso consiste en la hibridación de los embriones con las sondas, en este caso las diluimos a una concentración 1:200 en solución de hibridación y se dejan incubando a 16 a 24 horas a 55°C

Al siguiente día es necesario realizar tres lavados con solución de hibridación nueva de 15 minutos. Y luego se realizan 3 lavados de 5 minutos con Solución B. A continuación, se realizan 4 lavados de 10 minutos con PTW a temperatura ambiente. Después se incuban durante 1 hora y 30 minutos los embriones a 1:2000 anticuerpo previamente preabsorbido. A continuación, se realizan 4 lavados de 10 minutos con PTW y por último se realiza otro lavado con buffer AP. El siguiente paso ya es el del revelado, para ello es necesario añadir la *mix* de reacción compuesta de 2 µl NBT (Roche), 2 µL BCIP (Roche) y 600 µl de buffer AP. Mientras se revela es necesario mantener los tejidos a oscuras. Finalmente se para la reacción con 3 lavados de PTW de 10 minutos cada uno y se guardan los embriones en glicerol al 80%. Las muestra se analizan mediante lupa.

PTW

0,1X Tween 20
PBS1X

Solución B

50% Formamida
5XSSC
0,1% Tween 20

Buffer AP

100mM NaCl
50mM MgCl₂
100mM Tris-HCl pH 9,5

Solución De Hibridación

50% Formamida
5XSSC
100µg/ml DNA esperma de salmón sonicado
50 µg/ml heparina
0,1% Tween 20

b) Protocolo en disco genital de larva 3

En este tejido solo realizamos ISH. En primer lugar, después de seleccionar las larvas de sexo masculino se procede a la disección del disco genital. Debido a su pequeño tamaño se diseccionó bajo lupa de fluorescencia y se realizó el experimento sobre el último tercio (dónde se sitúa el disco genital) de la larva del revés. Una vez obtenido unos 20 discos genitales se procede a la fijación con una solución compuesta de 4% de formaldehído en PTW durante 20 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo se repite este último paso. Finalmente se realizan 3 lavados de 5 minutos con PTW. A continuación, se incuba el tejido con una solución de metanol al 50% en PTW durante 2 minutos, después se realiza otra incubación con metanol de 3 minutos y por último se realiza un lavado con PTW de 3 minutos. A continuación, se incuban con acetona al 80% en PTW durante 20 min a -20°C. Seguidamente se realizan 3 lavados con PTW de 5 minutos. El siguiente paso es otra fijación, esta vez de 20 minutos con 5% formaldehído. Transcurrido el tiempo se realizan 3 lavados más con PTW. A continuación, se incuban los embriones con 50%PTW y 50% solución de hibridación. Se procede a la prehibridación de los embriones durante 2 horas con solución de hibridación a 55°C. El siguiente paso consiste en la hibridación de los embriones con las sondas, en este caso las diluimos a una concentración 1:200 en solución de hibridación y se dejan incubando a 16 a 24 horas a 55°C

Al siguiente día es necesario realizar tres lavados con solución de hibridación nueva de 15 minutos. Y luego se realizan 3 lavados de 5 minutos con Solución B. A continuación, se realizan 4 lavados de 10 minutos con PTW a temperatura ambiente. Después se incuban durante 1 hora y 30 minutos con una dilución 1:2000 del anticuerpo previamente preabsorbido. A continuación, se realizan 4 lavados de 10 minutos con PTW y por último se realiza otro lavado con Buffer AP. El siguiente paso ya es el del revelado, para ello es necesario

añadir la *mix* de reacción compuesta de 2 µl NBT (Roche), 2 µL BCIP (Roche) y 600 µl de buffer AP. Mientras se revela es necesario mantener los tejidos a oscuras. Finalmente se para la reacción con 3 lavados de PTW de 10 minutos cada uno. A continuación, bajo la lupa se extraen los discos con cuidado, ya que son muy frágiles y se parten con facilidad.

PTW

0,1X Tween 20

PBS1X

Solución B

50% Formamida

5XSSC

0,1% Tween 20

Buffer AP

100mM NaCl

50mM MgCl₂

100mM Tris-HCl pH 9,5

Solución De Hibridación

50% Formamida

5XSSC

100µg/ml DNA esperma de salmón sonicado

50 µg/ml heparina

0,1% Tween 20

3.2.2.3. Técnicas Para El Estudio De Las Proteínas

3.2.2.3.1. Extracción de proteína total

Para el análisis de la presencia y cuantificación de las proteínas de interés es necesaria la extracción de estas en el tejido o células escogidos. La cantidad de tejido usado para la extracción de proteína varía en función del tejido. En esta tesis se han realizado extracciones de proteicas de $10 \cdot 10^6$ de células y 60 glándulas salivares.

Para los tejidos que provienen de larva se introducen en PBS 1X a medida que se van diseccionando hasta obtener la cantidad deseada. En el caso de las células, después de ser contadas se centrifugan durante 5 minutos a 1000rpm, se les realiza un lavado con PBS 1X.

A continuación, tanto a las muestras de células como a la de los tejidos se les extrae el PBS 1X y se les añade el tampón de carga: PLB 1X-beta mercaptoetanol 2%. Seguidamente con el uso de un émbolo se disgregan mecánicamente. A continuación, se centrifuga la muestra durante 1 min a 13400 rpm y se sónica durante 5 minutos al 30% en un sonicador Branson. Por último, se someten a una incubación de 5 minutos a 95°C.

PLB 5X

0.125M Tris pH 6.8

22% Glicerol

5% SDS

Azul de Bromofenol (punta de una espátula)

3.2.2.3.2. Electroforesi en gel de acrilamida

Ésta técnica nos permite separar proteínas según su peso molecular a través de las condiciones desnaturizantes que nos otorga el SDS i a través de la matriz de poliacrilamida (PAGE). El gel se compone de una matriz compactadora, al 4% de acrilamida, y de una separadora que varía en su porcentaje en función del peso molecular de las proteínas de estudio. El porcentaje de acrilamida tiene una relación inversamente proporcional al peso molecular de la proteína, de manera que para la separación de aquellas más pequeñas necesitaremos porcentajes mayores y al revés pasaría con las de mayor peso molecular, así pues, el porcentaje del gel apilador debe variar en función de la proteína de análisis.

Las muestras de proteína se cargan en el gel para procesar a su separación con el uso del buffer Laemmli al 1X.

Gel apilador

Acrilamida:bisacrilamida 29:1 4%

0,125M Tris-HCl pH 6,8

0,1% SDS

6 µL PSA 10%/ml solución

3 µL TEMED/ml solución

Gel apilador

Acrilamida:bisacrilamida 29:1 %*

0,125M Tris-HCl pH 6,8

0,1% SDS

6 µL PSA 10%/ml solución

3 µL TEMED/ml solución

*porcentaje deseado

Laemmli 1X

1%SDS

3M Glicina

250Mm Tris base

3.2.2.3.3. Western Blot

Después de separar las proteínas de nuestra muestra mediante la electroforesis con un gel de acrilamida (SDS-PAGE) se transfieren a una membrana de nitrocelulosa durante 1 hora a 4°C a 100 V en tampón de transferencia. Seguidamente la membrana con las proteínas transferidas se bloquea con solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se deja incubando con el anticuerpo primario diluido en PBS-Tween 0,1% durante toda la noche a 4°C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se realizan tres lavados de 10 minutos con PBS-Tween 0,1%. El siguiente paso consiste en la incubación de la membrana con anticuerpo secundario que está conjugado con peroxidasa durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se realizan 3 lavados de 10 minutos con PBS-Tween 0,1% y se procede al revelado. Para ello añadimos sobre la membrana (que quede toda cubierta) solución reveladora Inmobilon Western (Millipore) durante 1 minuto. Seguidamente se quita el exceso y se expone a un film de autoradiografía. El revelado del film con un *Hyperprocessor* de Amersham.

3.2.2.3.4. Co-Inmunoprecipitación

El análisis de la interacción de las proteínas se ha realizado mediante co-inmunoprecipitación (Co-IP). Se han utilizado 150 larvas para la obtención de 500 glándulas, las cuales durante su disección se han ido introduciendo en buffer IP en hielo. A continuación, se pasan por un émbolo de 2 ml del tipo B. A continuación, se añade a la muestra NaCl para que quede a un volumen final de 300mM. Se centrifuga la muestra a máxima velocidad a 4°C y recuperamos el sobrenadante y

reservamos el 10% del volumen a inmunoprecipitar como muestra input. A la cantidad de extracto deseado le añadimos 2µl de anticuerpo y se deja incubando durante 3 horas a 4°C. Una vez transcurrido el tiempo se le añaden 50 µl de bolas de sefarosa específicas para el anticuerpo usado y se deja incubando 2 horas más en la rueda a 4°C. A continuación, se realizan lavados a las bolas con buffer de lisis y se eluye en PLB 1X-betamercaptoetanol 2%, hirviendo la muestra a 95°C y vorteando. Finalmente, la muestra inmunoprecipitada es analizada mediante un gel SDS-PAGE y *Western Blot* (WB) junto con el input y una muestra control inmunoprecipitada con un anticuerpo inespecífico.

Buffer de dilución de la IP

0,01% SDS
1,1% Tritón 100X
1,2mM EDTA
16,7Mm Tris HCl pH8
167mM NaCl

Buffer de lisis de núcleo

50mM Tris HCl pH8
10mM EDTA
1%SDS

3.2.2.3.5. Extracción de proteína cromática

Para realizar el experimento se han utilizado embriones de 3-21 horas. Unos 100 µl de embriones se decorionan en lejía durante 3 minutos, se ponen en un pequeño tamiz para eliminar la lejía y se lavan primeo con Tritón al 0,1X y luego con 10mM Tris-HCl pH 7,5. A continuación se resuspenden en buffer ENB y se pasan por un Dounce de 2 ml del tipo A. Una vez realizado 20 subidas y bajadas se cuela la muestra con una gasa y se centrifuga durante 5 min a 5000 rpm a 4°C durante 5 minutos.

Los núcleos se lavan durante 10 minutos con buffer 1, luego con el 2 y finalmente con el buffer 3. Finalmente, para revertir el *crosslinking*

se resuspenden en solución de reversión del *crosslinking* durante 20 minutos a 95°C. La muestra es analizada por gel SDS-PAGE y WB.

Buffer ENB

10% Sacarosa
10mM Tris HCl pH 8
1mM CaCl₂
0,1mM PMSF

Buffer de reversión del *crosslinking*

25mM Tris-HCl pH6.8,
4.4% glycerol
1% SDS
2%-mercaptoethanol
0.005% bromophenol blue

Buffer 1

10mM Tris-HCl pH8
0.25% Triton X-100
Tris-HCl pH8
10mM EDTA
0.5mM EGTA

Buffer 2

0.2M NaCl
10mM Tris-HCl pH8
1mM EDTA
0.5mM EGTA

Buffer 3

1% SDS
10mM Tris-HCl pH8
1mM EDTA

3.2.2.3.6. Inmunofluorescencia en embriones

Los embriones de estadio 12 se decorionan en lejía durante 3 minutos, se ponen en un pequeño tamiz para eliminar la lejía y se lavan primero con Tritón al 0,1X y luego con 10mM Tris-HCl pH 7,5. A continuación se fija con 2ml de PEM, 2ml de Heptano y 250µl de formaldehído durante 20 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se extrae el PEM y se añaden 2ml de metanol y se agitan durante 20 segundos. Se extraen los embriones con una pipeta de cristal que se encuentran al final del vial y se colectan en un eppendorf donde se lavaran 3 veces con metanol.

Seguidamente, se realizan tres lavados con PBS-Tritón 0,1% y se bloquean durante 1 hora con PBS-Tritón 0,1%-BSA 1%. Transcurrido el tiempo se le añade el anticuerpo diluido en la solución anterior y se incubará durante toda la noche a 4°C.

La mañana siguiente se realizan tres lavados de 15 minutos con PBS-Tritón 0,1%-BSA 1% y luego se incuba con el secundario a 1:400 en la misma solución anterior durante 2 horas a temperatura ambiente y

resguardado de la luz. Pasado el tiempo de incubación se realizan tres lavados de 15 minutos con PBS-Tritón 0,1% y un último con PBS1X. Finalmente se montan con DAPI-Mowiol. La muestra es analizada por microscopio confocal.

PEM

0,1M PIPES pH 6,9

2mM MgSO₄

1mM EGTA

3.2.2.4 Técnicas para el estudio en moscas

3.2.2.4.1 Sistema UAS-Gal4

Es una herramienta genética que permite la expresión o la degradación del RNA mensajero en los tejidos deseados. Esto es posible mediante un cruce genético entre una mosca que expresa la proteína Gal4 bajo el promotor del gen al que se encuentra vinculada y otra mosca que contiene insertado en su genoma el promotor *UAS* (*Upstream Activating Sequence*) junto con la secuencia del gen que queremos expresar o el RNAi del gen que queremos silenciar provocando así la deficiencia de a proteína diana. La manera en la que podemos modular la función de este sistema recae sobre el promotor del gen al cual la secuencia UAS está ligada, así pues, si utilizamos un gen de expresión ubicua el sistema funcionará en toda la mosca, y si es un gen específico de un tejido lo hará solamente en ese tejido.

3.2.2.4.2. Estudio de las transformaciones homeóticas

Con la finalidad de estudiar si las proteínas de estudio están involucradas en el silenciamiento regulado por las proteínas PcG se analizan los cambios fenotípicos en fondos genéticos sensibilizados. El fondo genético sensibilizado se obtuvo con las líneas mutantes de Pc: *Pc¹*, *Pc³* y *Pc¹⁵*. En el caso de esta tesis se trata de Haspin, por eso utilizamos la línea *Haspin¹²⁸* (mutante nula) y la línea *Haspin^{RNAi}* (bajo la expresión del gen *Actina5C*). El análisis se realizó en combinación de la línea mutante nula con todas las mutaciones de Pc anteriores en heterocigosis, y con la línea RNAi solo con *Pc³* también en heterocigosis.

3.2.2.4.3. Estudio del *pairing sensitive silencing*

El PSS está relacionado con el reforzamiento del silenciamiento génico regulado por las proteínas PcG al encontrarse las secuencias PRE en el espacio. En esta tesis hemos utilizado dos líneas de *Drosophila melanogaster* distintas para analizar si el PSS se ve afectado en ausencia de Haspin.

La primera de ellas es una línea transgénica con el PRE del *Fab7* junto con el gen repotero mini-*white* y se combinó con la línea mutante *Haspin¹²⁸*. En el caso de verse cambios se muestra un cambio de coloración en los ojos de la mosca.

La segunda utilizada es la línea transgénica 5F24 25,2, caracterizada por la malformación de las alas por efecto del *pairing*. Este fenotipo es debido contiene la secuencia del *Fab7* cerca del gen *scalloped* (*sd*). Al igual que la línea anterior, también se combinó con la línea mutante *Haspin¹²⁸*.

3.2.2.4.4 Estudio del *position-effect variegation*

El PEV se estudia con la finalidad de observar si la estructura de la heterocromatina en interfase se ve afectada. En esta tesis el análisis fue realizado en el estudio de Haspin, por ese motivo se combinó la mutación de *Haspin*¹²⁸ en heterocigosis con la línea *In(1)wm4*. Esta línea contiene el gen *white* cerca de la región heterocromática del cromosoma X, así pues, en el caso de que se produzca la dispersión de la región heterocromática a la eucromática se produce el silenciamiento variegado de la expresión del gen *white*, mostrándose en los ojos de la mosca el cambio de coloración.

RESULTADOS

4.1 Análisis del papel funcional del complejo *insulator* Ibf-CP190

4.1.1. El complejo Ibf-CP190 se sitúa sobre genes con promotores alternativos

El estudio de la localización de las proteínas Ibf1 y Ibf2 en el genoma mediante el análisis por ChIP-seq realizado por Sergi Cuartero en nuestro grupo muestra que el complejo Ibf-CP190 se sitúa en la cromatina preferentemente sobre genes con promotores alternativos (Fig.13) (Cuartero et al., 2014). Puesto que estas proteínas tienen actividad *insulator* hipotetizamos que el complejo formado por las proteínas Ibf y CP190 interviene en la regulación de la correcta expresión de los diferentes transcritos de estos genes.

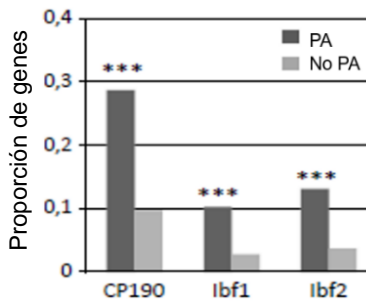


Figura 13. El complejo Ibf-CP190 se une preferentemente a genes con promotores alternativos. Proporción de genes donde se posicionan las proteínas CP190, Ibf1 y Ibf2 en todo el genoma. Los genes se dividen en aquellos con promotores alternativos (PA) y sin promotores alternativos (No PA).

4.1.2. Estudio del papel regulador del complejo *insulator* Ibf-CP190 en la expresión del gen *Abdominal-B*

Uno de los genes con promotores alternativos en los que se sitúa el complejo de estudio es el gen *Abd-B*. Este gen compuesto por 4 promotores distintos expresa diversos transcritos (Casanova et al., 1986) (Fig. 13) que se clasifican en dos grupos en función de cuál de las dos proteínas Abd-B expresan. El grupo A lo forma el transcrito A, conocido también como *Abd-Bm*, *Abd-BA* o *m* y codifica por la proteína Abd-BI. El segundo grupo conocido como B lo forman los transcritos B,C y μ o denominados también *Abd-Br*, *Abd-BB* o *r* codifican por la proteína Abd-BII (Fig. 14) (Birkholz et al., 2013;

Zavortink and Sakonju, 1989). Las dos isoformas comparten el mismo dominio C-terminal, donde se incluye el homeodominio, su diferencia reside en el dominio N-terminal ya que la proteína Abd-BI tiene 223 aminoácidos más (Coutelis et al., 2013; Zavortink and Sakonju, 1989)

La expresión de este gen al igual que el resto de genes homeóticos que forman el BX-C se encuentra regulado por *enhancers* y elementos PRE y TRE los cuales a su vez se encuentran regulados por *insulators* que modulan la topología del BX-C (Savitsky et al., 2016). El análisis por CHIP-seq en células embrionarias S2 de *Drosophila melanogaster* previo a este estudio reveló que las proteínas que forman el complejo de estudio se sitúan en el *insulator* *Fab-8* y entre los promotores distintos que el gen *Abd-B* tiene (Fig. 14).

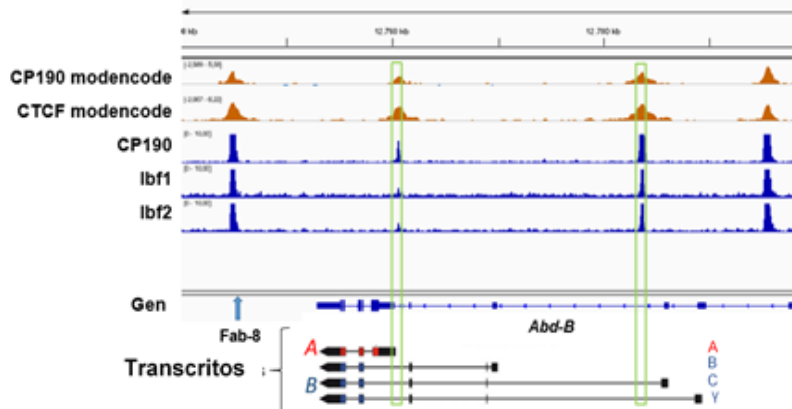


Figura 14. El complejo lbf-CP190 se sitúa en la región de *Abdominal-B* junto con CTCF. Distribución de las proteínas CTCF, CP190, lbf1 y lbf2 en el Fab-8 y en el gen *Abd-B* situado en el cromosoma 3R (Cuartero et al., 2014). Las regiones que se encuentra enriquecida por el complejo lbf-CP190 que separa los dos diferentes transcritos del gen *Abd-B* está remarcado en verde. Los transcritos descritos según Birkholz et al., 2013 están situados a escala. Las líneas representan los intrones, y los cuadros los exones (en negro son las UTRs, y las coloreadas CDSs). Estos transcritos se dividen en dos grupos el A y el B, en función de la proteína que codifican. El grupo A (rojo) lo forma el transcrito A y el grupo B (rojo), lo forman los transcritos B, C y γ .

Así pues, estas observaciones junto con el hecho de que el gen *Abd-B* es un gen muy bien descrito tanto a nivel de regulación como a nivel funcional a lo largo del desarrollo de *Drosophila* hace de él un buen candidato para el estudio del papel del complejo Ibf-CP190 en la regulación de la expresión de los genes con promotores alternativos

4.1.2.1. Estudio del giro en la terminalia masculina de *Drosophila melanogaster*

Tal como ya se ha explicado en la introducción, uno de los tejidos en los que se expresan los transcritos del gen *Abd-B* de manera diferencial es el disco genital de *Drosophila*. Éste tejido lo conforman tres primordios el A8, el A9 y el A10 los cuales se desarrollan de manera diferente en hembra y macho debido a la combinación de las señales de determinación sexual, las vías de señalización y los genes homeóticos. Durante el estadio de pupa el disco genital de los machos de *Drosophila* pasa por un proceso de metamorfosis y de rotación dando lugar a la estructura conocida como terminalia en la etapa adulta. Así pues, el primordio A9 acaba formando los genitales, el A10 el ano y el A8 un pequeño segmento (Foronda et al., 2006). El proceso de rotación viene dado a partir de la expresión del transcrito A del gen *Abd-B* en el primordio A8. La expresión de este promueve la expresión del gen *myoID*, el cual es el efector del giro dextral de 360° de los genitales masculinos. La disrupción de la expresión del gen *Abd-B* en *Drosophila* mediante RNA de interferencia (RNAi) da como resultado una descendencia masculina donde el 75% de los individuos no presentan rotación y el 45% restante presenta un giro parcial (Coutelis et al., 2013).

Si nuestra hipótesis es correcta, la falta del complejo Ibf-CP190 podría alterar la correcta expresión del transcrito A en el disco genital provocando efectos que se podrían ver reflejados en una alteración del giro de los genitales del macho de *Drosophila*. Por ese motivo el

estudio morfogénico en los genitales masculinos nos resulta útil para testar nuestra hipótesis sobre el efecto regulador del complejo Ibf sobre los transcritos del gen *Abd-B*.

4.1.2.1.1. Estudio del giro de la terminalia masculina en la línea mutante *Ibf2^{GSV17}*

En un individuo donde el giro de la terminalia se ha desarrollado de manera normal, se observa que en la parte dorsal se sitúa el ano y en la ventral el pene (Fig. 15). La situación de estos órganos respecto al cuerpo de *Drosophila melanogaster* se utiliza para determinar si el giro de la terminalia presenta alteraciones. En el caso de producirse giros parciales se puede determinar directamente a través de un análisis visual al final del proceso. Sin embargo, la para distinguir si el giro es total (360°) o ausente (0°) es necesario otras estrategias como la grabación durante el proceso de giro.

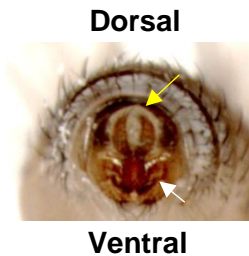


Figura 15. La terminalia de los machos de *Drosophila melanogaster* presenta el pene en la parte ventral y el ano en la dorsal. La imagen corresponde a un individuo control de la línea *w¹¹¹⁸*. El ano está señalado con una flecha amarilla y el pene con una flecha blanca.

La línea de mosca mutante utilizada para el análisis es la *Ibf2^{GSV17}*. Los individuos homocigotos de esta línea son mutantes nulos para la proteína Ibf2. La falta de Ibf2 es suficiente para obtener la disrupción total del complejo *insulator* imposibilitando así la presencia y función del complejo Ibf-CP190 en la cromatina (Cuartero et al., 2014).



Figura 16. La terminalia de *Drosophila melanogaster* aparentemente presenta el mismo fenotipo ante la falta de *lbf-CP190*. La imagen de la izquierda corresponde a un individuo control de la línea w^{1118} y el de la derecha de $lbf2^{GSV17}$. El ano está señalado con una flecha amarilla y el pene con una

Al examinar visualmente la apariencia externa de los genitales masculinos de los individuos mutantes homocigotos de $lbf2^{GSV17}$ observamos que presentan el ano situado en la parte dorsal y el pene en la ventral (Fig. 16). Este patrón puede indicar distintas opciones, como que la falta del complejo *lbf-CP190* no afecta al giro de los genitales masculinos, que los mutantes presentan una disrupción total del giro, es decir, que los genitales no llegan a rotar como es el caso de los mutantes para *Abd-B* (Coutelis et al., 2013). O incluso que el nivel de expresión del transcrito *A* no sea suficiente como para provocar una alteración del giro.

4.1.2.1.2. Análisis de la rotación de la terminalia masculina en la línea mutante $lbf2^{GSV17}$ en un fondo genético sensibilizado

Con el objetivo de analizar si el fenotipo observado en la línea $lbf2^{GSV17}$ era resultado de una disrupción total del giro o un fenotipo de giro normal, decidimos sensibilizar el fondo génico de nuestro modelo de estudio para intentar enfatizar cambios fenotípicos que no son apreciables. En este caso el fondo génico sensibilizado se obtiene mediante el uso de la mutación de la proteína CTCF de la cual se ha descrito que produce un fenotipo de giro anormal de los genitales masculinos (Gambetta and Furlong, 2018; Mohan et al., 2007). La proteína CTCF resulta interesante para el estudio de este

fenotipo puesto que se ha visto que esta proteína regula el gen *Abd-B* a través de su presencia en los *insulators* del BX-C (Gambetta and Furlong, 2018). Además, CTCF colocaliza con el complejo Ibf-CP190 en la región genómica de *Abd-B* tal como se puede ver en la figura 14 (Cuartero et al., 2014)

Para el estudio utilizamos dos líneas de *Drosophila CTCF^{RNAi}*. Decidimos cruzar ambas líneas con diversos *drivers* utilizados en el laboratorio para más tarde decidir cuál es la mejor opción en función de los resultados obtenidos. Los *drivers* utilizados fueron *Actina-Gal4* y *Escargot-Gal4*. El primero de ellos se trata del promotor del gen *actina* que se expresa de manera ubicua en *Drosophila*. El segundo se trata del promotor del gen *escargot* el cual se expresa en los discos imaginales durante el estadio de larva y en los sistemas traqueal, nervioso, digestivo, reproductor y tegumentario (Flybase).

El análisis de los patrones de giros se ha realizado según la figura 17. En esta imagen, está representado el patrón de medida que se ha utilizado para evaluar el giro de los individuos de nuestro experimento, el cual se basa en el giro dextral de 360° que sufren los genitales masculinos durante el desarrollo de *Drosophila* en condiciones normales (Coutelis et al., 2013).

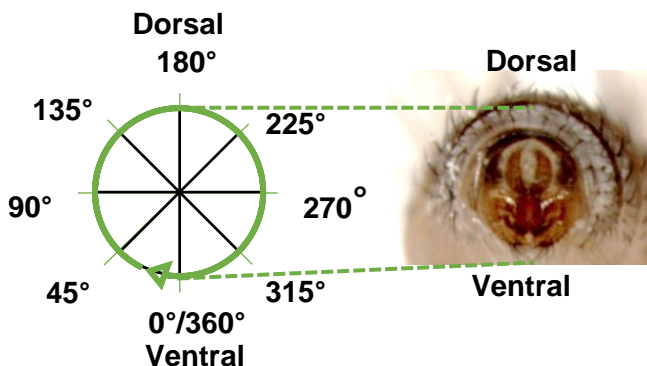


Figura 17. El giro de la terminalia es dextral y de 360°. El ángulo de rotación se calcula partiendo de la parte ventral dónde se sitúa el pene.

Tabla 8. Estudio de la rotación

	<i>Escargot-Gal4</i>			<i>Actina-Gal4</i>		
	Total/inexistente (%)	Parcial (%)	n	Total/inexistente (%)	Parcial (%)	n
<i>CTCF^{GDRNAi}</i>	45	55	53	letal		
<i>CTCF^{KKRNAi}</i>	97	3	67	1	99	96

Los resultados obtenidos del análisis visual se recogen en la tabla 8 para los individuos obtenidos del cruce de *CTCF^{GDRNAi}* y *CTCF^{KKRNAi}* con los distintos drivers. Los individuos han sido separados en dos grupos en función de si presentaban un patrón de giro aparentemente normal, es decir del ano situado en la parte dorsal y el pene en la ventral, o de si presentaban un patrón de giro parcial. Los valores corresponden al porcentaje de individuos obtenidos para cada fenotipo.

El análisis de la depleción de *CTCF* con la línea *CTCF^{GDRNAi}* bajo la expresión del gen *escargot* presenta un 45% de los individuos con un fenotipo aparentemente normal (ano en la parte dorsal y pene en la ventral) mientras que el 55% restante presenta un giro parcial. En el caso de la interferencia de *CTCF* en esta misma línea bajo la expresión del gen *Actina* es letal.

La evaluación del grado del giro para los distintos cruces con *CTCF^{KKRNAi}* ha sido posible para todos los drivers escogidos. El análisis muestra dos tipos de patrones distintos en los resultados. En el caso de los individuos procedentes del cruce con *Escargot-Gal4* observamos que el 97% de los individuos presentan un fenotipo de giro aparentemente normal con mientras que el 3% restante presenta un giro parcial. El resultado para el cruce con *Actina-Gal4* muestra todo lo contrario, ya que prácticamente todos los individuos analizados presentan un giro de tipo parcial.

El criterio utilizado para escoger las líneas de trabajo a partir de los resultados obtenidos se basó en la riqueza en la variedad de giros obtenidos ya que ese aspecto podría ser beneficioso para nuestro análisis. Nosotros necesitamos escoger un fondo genético sensibilizado en el que estudiar la mutación del complejo Ibf y el obtener más variedad de patrones de giro nos podría dar más juego a la hora de evaluar el efecto de la mutación de Ibf en ese fenotipo. Así pues, decidimos trabajar con *Actina-Gal4* y *CTCF^{KKRNAi}* ya que prácticamente la totalidad de los individuos presenta giros parciales.

Una vez escogidas las líneas de trabajo adecuadas, procedimos a la obtención de una mosca con ambas mutaciones. En este caso para la obtención de la mutación del complejo Ibf no se usó el mutante nulo (*Ibf2^{G^{SV17}}*), sino que se utilizó una línea *Ibf1^{RNAi}*, con el que se obtiene la depleción de la proteína Ibf1, suficiente como para disrupir la presencia y funcionalidad del complejo en la cromatina. Así pues, la línea analizada fue *CTCF^{KKRNAi};Ibf1^{RNAi}* bajo la expresión del gen *actina*, la cual fue comparada con el análisis contemporáneo en la línea *CTCF^{KKRNAi}*.

Si analizamos en profundidad los resultados y comparamos los porcentajes de individuos obtenidos para cada uno de ellos observamos que si existen diferencias (Fig. 18). En los individuos de la condición control existe un mayor porcentaje para los giros parciales de 270°, 315° siendo el de 315° el que más individuos presenta. Mientras que en la condición con fondo genético sensibilizado y mutante para Ibf tiene un porcentaje mayor en los giros parciales de, 135°, 180° y 225°, siendo este último grado el que mayor porcentaje tiene.

En general el resultado sugiere que en el patrón de giro en individuos control está más desplazado hacia el giro total (fenotipo normal) que los individuos en los que también disminuyen de los niveles de Ibf1, los cuales presentan menor grado de rotación.

El análisis de los resultados sugiere que la falta del complejo CP190-lbf podría tener un efecto en el proceso de rotación de los genitales masculinos de *Drosophila*.

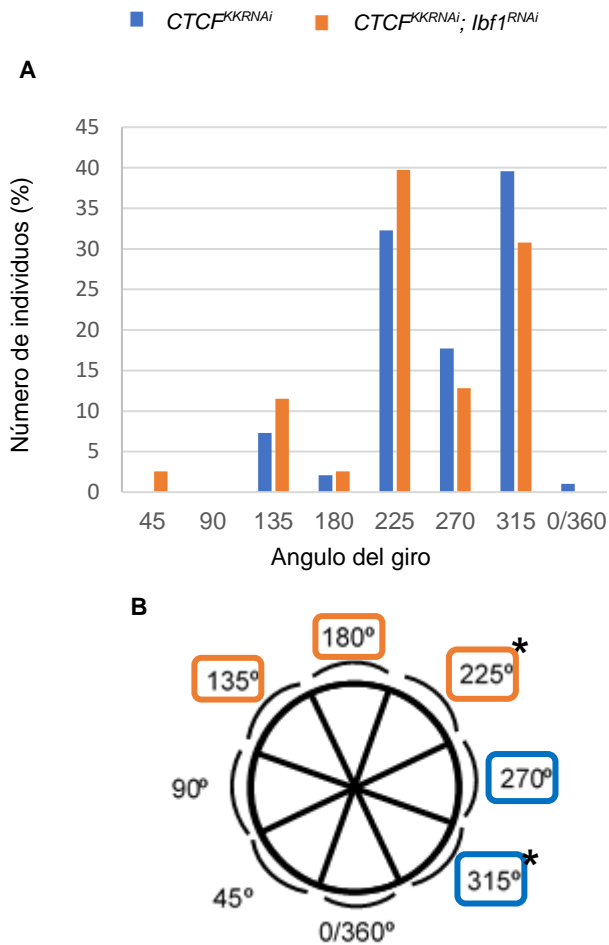


Figura 18. Las proteínas *insulator* CTCF y *lbf1* cooperan en la regulación del giro de la terminalia de *Drosophila melanogaster*. En color azul se representan los datos para el análisis de la mutación de CTCF y en naranja se representan la combinación de la mutación de CTCF y *lbf1*. **A)** El grafico representa el porcentaje de individuos para cada uno de los distintos patrones de giros. **B)** En este dibujo se representa la diversidad de patrón de giros en función de los datos representados en la figura 16A. Los ángulos enmarcados en color azul corresponden a aquellos en los que el mayor porcentaje de individuos se obtienen para la línea *CTCF^{KKRNAi}* y en naranja los que hay más *CTCF^{KKRNAi}; lbf1^{RNAi}*. Los asteriscos indican el ángulo en el que el porcentaje es mayor para cada línea.

4.1.2.2. Análisis de la expresión del gen *Abdominal-B*

El análisis de la expresión del gen *Abd-B* y de los transcritos *A* y *B* de este es necesario con el fin de entender si el efecto fenotípico en el giro de los genitales masculinos es provocado por la desregularización de la expresión de este gen ante la falta del complejo Ibf-CP190.

4.1.2.2.1. Estudio de la expresión del gen *Abdominal-B* y sus transcritos *A* y *B*.

El proceso de rotación se encuentra determinado por la expresión diferencial de los transcritos de *Abd-B* en disco genital de larva 3, por lo tanto, en una primera aproximación analizamos los niveles de expresión de cada uno de los transcritos en larva 3 control (*w¹¹¹⁸*) y en la mutante del complejo de estudio (*Ibf2^{GSV17}*).

El nivel de expresión del gen *Abd-B* y de sus transcritos *A* y *B* se analiza a través RT-PCR mediante la cuantificación del mRNA extraído en larva 3. Para ello es necesario el uso de oligonucleótidos específicos para el RNA de *Abd-B* y para el RNA de los transcritos *A* y *B*.

La gráfica de la figura 19 representa la expresión del gen *Abd-B* y de los transcritos *A* y *B*. Los resultados de la RT-PCR se han normalizado respecto a la expresión del gen *Actina* y luego se calculado su expresión respecto a la expresión de la línea control. Ante la falta del complejo CP190-Ibf observamos un aumento estadísticamente significativo de la expresión en todos los elementos genéticos evaluados respecto a la expresión en la línea control.

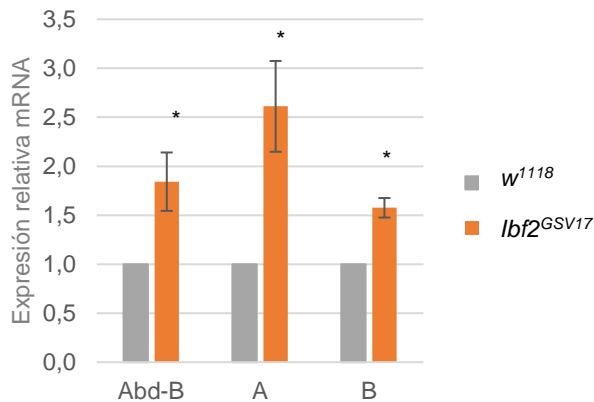


Figura 19. La ausencia de lbf-CP190 provoca el incremento de la expresión del gen *Abd-B* y de sus transcritos *A* y *B* en larva 3 de *Drosophila melanogaster*. Análisis mediante RT-PCR de la expresión relativa del gen *Abd-B* y sus transcritos *A* y *B* en la línea mutante *lbf2^{GSV17}* respecto a la línea control *w¹¹¹⁸* normalizados respecto a la expresión del gen *Actina5C*. Las barras de error son el error estándar de la media de tres replicas biológicas independientes. * $p < 0,05$ determinada por la prueba estadística t de Student.

Así pues, observamos que la falta del complejo lbf provoca un incremento de la expresión del gen *Abd-B* y de los transcritos de este, *A* y *B*, en larva 3 de *Drosophila melanogaster*.

Como se ha dicho el proceso de rotación depende de la expresión del transcrito *A* en el primordio A8 del disco genital de larva 3 (L3). Nuestros resultados muestran que en general en L3 la expresión de *A* no disminuye sino todo lo contrario. Debido a que observamos una desregulación es necesario observar directamente la expresión del transcrito *A* en el disco genital masculino.

4.1.2.2.2. Análisis de la expresión del transcrito *A* en disco genital

El análisis directo en el disco genital es necesario para confirmar si los resultados obtenidos en el análisis morfogénico vienen

derivados de una desregularización de la expresión de la expresión del transcrito *A* ante la falta del complejo CP190-Ibf en el disco genital. Con este fin se decidió realizar sobre el disco genital una hibridación in situ (ISH) y observar si existe un efecto de la falta del complejo Ibf-CP190 en la expresión espacial del transcrito *A*.

El disco genital no es un tejido fácil en el que trabajar, su disección es un poco complicada dada la situación de éste y su tamaño. Por esa razón se diseñó una estrategia para facilitar su disección. Se trata de la expresión de GFP en el disco genital utilizando una línea UAS-GFP y el *driver tsh-Gal4* ya que el gen *teashirt* se expresa en el primordio A8 (Speder et al., 2006). Mientras que el análisis en la condición mutante se realizó en discos de larva 3 mutantes nulas para el complejo de estudio con expresión de GFP (cruce de *tsh-Gal4;Ibf2^{GSV17}* con moscas *UAS-GFP;Ibf2^{GSV17}*).

Los resultados obtenidos sobre discos genitales de machos de larva 3 se muestran en la figura 20. En la condición control vemos que la máxima señal de detección de la sonda se sitúa en el primordio A8 con algo de señal en el A9 tal como está publicado en la bibliografía (Foronda et al., 2006). En cambio, en el disco de la larva mutante se observa la expresión del transcrito *A* de manera uniforme tanto en el A8 y en el A9

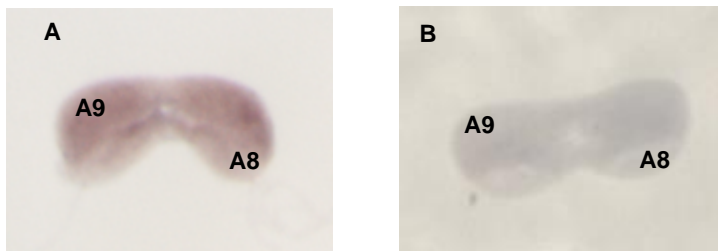


Figura 20. El patrón de expresión del transcrito *A* se ve alterado en ausencia del complejo Ibf-CP190 en disco genital de macho. Análisis de la expresión del transcrito *A* mediante ISH en disco genital de macho de larva 3 de *Drosophila melanogaster*. La imagen corresponde al disco control y el B corresponde al *Ibf2^{GSV17}*.

Aunque es un estudio muy preliminar el resultado sugiere que ante la falta del complejo *insulator* Ibf-CP190 se produce una desregulación espacial de la expresión del transcrito *A* en el primordio A9, lugar de expresión del transcrito *B* (Foronda et al., 2006).

4.1.2.2.3. Estudio de la expresión del transcrito *A* en embrión.

El gen *Abd-B* es un gen necesario durante todo el desarrollo y al igual que el resto de los genes pertenecientes a la familia de los genes homeóticos, es necesario que se exprese en los PSs específicos para que el desarrollo de *Drosophila* sea el correcto (Maeda and Karch, 2006; Mihaly et al., 2006). En embrión está descrito que la expresión del transcrito *A* se restringe al PS13 y el transcrito *B* al PS14 durante el estadio 12 embrionario (Birkholz et al., 2013) aunque en otros trabajos también sitúan la expresión del transcrito *A* del PS10 al PS13 y la del *B* del PS14 al PS15, con máximos en el PS13 y en el PS14 respectivamente (Casanova et al., 1986; Foronda et al., 2006).

Con el fin de comprobar si nuestro complejo interviene en la regulación de la expresión de los transcritos en los PS específicos durante el estadio 12 del desarrollo embrionario se decidió realizar el análisis de la expresión de estos a través de la ISH.

Previamente analizamos la presencia de la proteína Abd-B total en los embriones de estadio 12. Para este experimento la línea de *Drosophila* utilizada para el estudio es la *Ibf2^{GSV17}*, mutante para el complejo Ibf-CP190. *Ibf2^{GSV17}* se mantiene en heterocigosis puesto que los machos homocigotos son estériles, de tal manera que existe en la línea una mezcla de individuos heterocigotos y homocigotos que son posibles de diferenciar mediante la detección de la proteína Ibf2 por inmunohistoquímica, ya que los mutantes nulos serán negativos para Ibf2 mientras que los heterocigotos serán positivos.

Las imágenes recogidas en la figura 21, corresponden al análisis proteico de la línea *lbf2^{GSV17}*. La imagen verde corresponde a la señal proteica de *lbf2* donde se indica con una flecha un embrión negativo (mutante nulo) para *lbf2* al lado de uno que si es positivo. Por último, el color rojo corresponde a la proteína *Abd-B* total, puesto que el anticuerpo no distingue entre las dos distintas isoformas que existen.

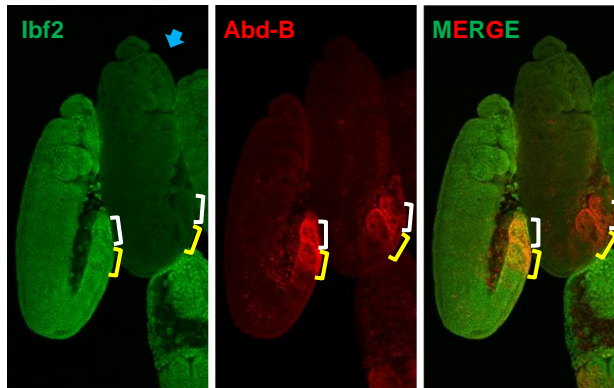


Figura 21. La presencia de *Abd-B* total no cambia en ausencia de *lbf-CP190* en embriones de estadio 12. Análisis inmunohistoquímico en embriones de estadio 12 de la línea de *Drosophila lbf2^{GSV17}*. Tinción para *lbf2* (verde) y *Abd-B* total (rojo). El mutante nulo está señalado con una flecha. El PS13 está remarcado en amarillo y el PS14 en blanco.

Con la combinación de estas señales podemos observar que la máxima señal de la proteína *Abd-B* se encuentra en los PS13-14 tanto en el mutante para *lbf2* como en el control. También se detecta una señal bastante menor en los PS anteriores al 13, como es de esperar, puesto que *Abd-B* se expresa del PS10 al PS14 (Casanova et al., 1986; Foronda et al., 2006).

No se observan cambios en el patrón de expresión y la aparente disminución de los niveles de proteína *Abd-B* en el mutante es debido a la variabilidad experimental.

Puesto que el giro de la terminalia masculina depende de la correcta expresión del transcrito A, decidimos centrarnos en el análisis de este transcrito. Para ello se diseñó una sonda que reconoce específicamente una secuencia que solo está presente en el transcrito A como se muestra en la figura 22.

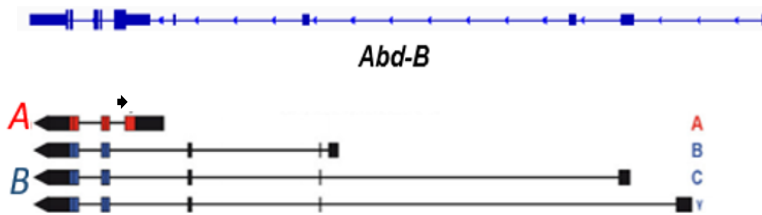


Figura 22. Diseño de la sonda específica para el transcrito A.

En la imagen podemos observar los dos tipos de transcritos descritos de *Abd-B*. La localización de la sonda en el exón está representada con una flecha. Los transcritos son los que han sido descritos según Birkholz et al., 2013.

En un principio se decidió analizar la expresión mediante la combinación de la técnica de la ISH fluorescente (FISH) con la técnica de la inmunofluorescencia para así diferenciar los embriones mutantes nulos de los que no lo eran y a la vez analizar la expresión del transcrito A. Este transcrito tiene un máximo de expresión en el PS13 como se muestra en la figura 23. Sin embargo, al combinar la técnica FISH con la inmunofluorescencia no fue posible obtener resultados por varios problemas experimentales. En primer lugar, el anticuerpo contra *Ibf2* no es capaz de reconocer la proteína después del tratamiento que implica la técnica FISH y por lo tanto no podemos distinguir los embriones homocigotos y los heterocigotos. Y, en segundo lugar, el análisis de la señal es complicado debido a que la baja señal del transcrito A no siempre es detectable debido al ruido de fondo y a la autofluorescencia de los embriones.

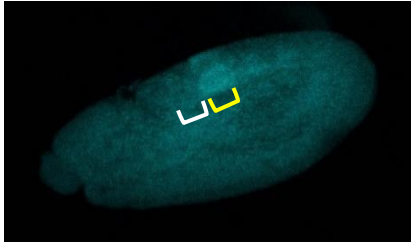


Figura 23. La expresión del transcrito A en embrión de estadio 12 se sitúa en el PS13. Análisis mediante FISH de la expresión del transcrito A en un embrión de la línea control w^{1118} . El PS13 se delimita en amarillo y en blanco el PS14.

Por ello se decidió analizar la expresión del transcrito A mediante la técnica de la hibridación in situ tradicional. En este caso se trata de un ensayo que no permiten distinguir los mutantes nulos de los que no lo son. Por lo tanto, fue necesario realizar un análisis en las líneas de *Drosophila* la w^{1118} como control y la $lbf2^{GSV17}$ como mutante y comparar los patrones de expresión del transcrito A en un número elevado de embriones de cada una de las líneas.

Con el fin de incrementar el número de embriones mutantes nulos en la muestra $lbf2^{GSV17}$ se utilizaron los embriones procedentes del cruce entre hembras mutantes nulas con machos heterocigotos consiguiendo así aumentar al 50% la presencia de los mutantes nulos.

En la figura 24 se muestra el análisis mediante ISH del transcrito A mediante la señal de la sonda específica detectada con fosfatasa alcalina en embriones de estadio 12. El análisis de los distintos individuos muestra que el transcrito A se expresa en el PS13 tanto en individuos control como en los mutantes y además en los mutantes también se observa algo de expresión en el PS14. En este experimento también hemos detectado señal en los segmentos previos al 13 al igual que en otros trabajos donde la expresión del transcrito A la sitúan del PS10 al PS13 en forma de gradiente, teniendo su máxima expresión en este último aunque las diferencias que se observan son experimentales y se observan tanto en los

embriones control como en los mutantes (Foronda et al., 2006; lampietro et al., 2008).

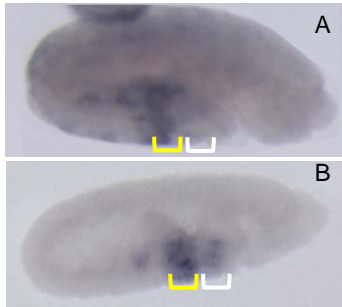


Figura 24. La expresión del transcrito A se ve alterada en ausencia de *lbf*-CP190 en embriones de estadio 12 de *Drosophila melanogaster*. Análisis mediante ISH de la expresión de la sonda específica para el transcrito A. La imagen A es un embrión de la línea *w¹¹¹⁸* y el embrión B corresponde a la línea *lbf2^{GSV17}*. En amarillo se delimita el PS13 y en blanco el PS14.

Tabla 9. Porcentaje de embriones de estadio 12

	Señal de la sonda (%)		
	Parasegmento		
	13	13+14	n
<i>w¹¹¹⁸</i>	94	6	16
<i>lbf2^{GSV17}</i>	60	40	15

Realizamos la clasificación y cuantificación de los embriones en función del PS donde estaba presente la señal del transcrito A tal como se observa en la tabla 9. En la línea *w¹¹¹⁸* el 94% de los individuos presentan la señal únicamente en el PS13, mientras que el 6% lo presentan en dos PS, en el 13 y en el 14. En el caso de la línea *lbf2^{GSV17}* el 60% de los individuos la señal se detecta exclusivamente en el PS13 mientras que el 40% restante lo presentan en el PS13 y PS14 a la vez. En ninguno de los casos se observaron embriones en la que la expresión del transcrito A se delimitara exclusivamente al PS14.

En ambas líneas la totalidad de los embriones presentan señal en el PS13 tal y como la bibliografía describe la localización de la señal del transcrito *A* (Birkholz et al., 2013). En el caso de nuestro análisis también detectamos señal en el PS14 en alguno de los individuos, y es en ese segmento donde se describe la expresión del transcrito *B* (Birkholz et al., 2013). En la línea control el porcentaje de embriones que presentan señal en el PS14 es de tan solo un 6% frente al 40% que presenta la línea mutante. El porcentaje en la línea control es muy bajo probablemente sea el producto de la sobreestimulación de la señal de la fosfatasa alcalina durante el revelado la cual provoca tinciones ectópicas y ruido de fondo (Nagaso et al., 2001).

El porcentaje de embriones en la muestra *lbf2^{GSV17}* en los que se observa señal en el PS14 es mucho más elevado sobre todo teniendo en cuenta que solo el 50% de los individuos son homocigotos.

Este resultado muestra que en la línea mutante el transcrito *A* sigue expresándose en el PS13 como en la condición normal. Ante la falta del complejo CP190-lbf se detecta también su señal en el PS14 en embriones de estadio 12 como resultado de una desregulación espacial de su expresión. Este efecto sugiere que nuestra hipótesis de estudio es cierta, ya que en este caso la falta de la barrera creada por lbf-CP190 podría estar permitiendo que los elementos reguladores encargados de la expresión del transcrito *B* en el PS14 entren en contacto con el promotor del transcrito *A* provocando la expresión ectópica de este transcrito en el PS14.

4.2. Análisis del papel de Haspin como modulador de la arquitectura nuclear

Estudios previos en el laboratorio describieron a la proteína Haspin en *Drosophila melanogaster* como la kinasa que fosforila la Thr3 de la H3 tanto en mitosis como en interfase.

Estos estudios mostraron también que Haspin es necesaria para la actividad *insulator* en ensayos *enhancer-blocking* y que su falta modifica la morfología del núcleo celular y su tamaño.

La H3T3ph se localiza en la heterocromatina pericentromérica y en grandes dominios silenciados flanqueados por proteínas *insulators*, sugiriendo una posible relación entre Haspin y la regulación del silenciamiento génico.

El trabajo de la Dra. Ujué Fresán en nuestro grupo mostró también que Haspin determina la presencia de Pds5, proteína asociada al complejo de las cohesinas, en la cromatina durante la interfase.

Estos resultados previos a esta tesis impulsaron la investigación en primer lugar del papel de Haspin como proteína arquitectural durante la interfase y su relación con la organización de la estructura de la cromatina. En segundo lugar, de la relación de Haspin con el silenciamiento de la expresión génica. Y finalmente, de la relación con Pds5 y con el complejo de las cohesinas.

4.2.1. La condición mutante para Haspin se puede obtener de distintas formas

Para el estudio funcional de cualquier proteína es necesario disponer de un modelo de estudio, ya sea en células en cultivo o en un organismo complejo, en el que la proteína no esté actuando de manera normal, ya sea debido a su falta o a la alteración de alguna

de las regiones de dicha proteína en la que esté implicada su actividad.

A lo largo de esta tesis se abarcó de distintas maneras la creación de un ambiente carente de Haspin las cuales se desarrollarán a continuación en dos apartados distintos según el modelo sobre el que se ha trabajado.

4.2.1.1. Líneas celulares de *Drosophila melanogaster* en cultivo

4.2.1.1.1. Inactivación de la actividad kinasa de Haspin mediante el inhibidor 5-iodotubercidina

En la bibliografía está descrito el uso de 5-iodotubercidina (5-Itu) para la inhibición de la actividad kinasa de Haspin en células en cultivo (De Antoni et al., 2012). Este estudio evalúa el compuesto en células HeLa tratándolas con diferentes concentraciones de 5-itu: 0,1 μ M, 1 μ M y 10 μ M a través de los niveles de la fosforilación de la H3T3, ya que es el único sustrato caracterizado de la kinasa Haspin. Los resultados que presentan mediante la evaluación por inmunofluorescencia muestran una ligera disminución de la H3T3p a 0,1 μ M. Pero es a la concentración de 1 μ M cuando se provoca una fuerte reducción de la señal de H3T3p que pasa a ser totalmente inexistente a 10 μ M.

Debido a que el compuesto nunca ha sido utilizado en líneas celulares de *Drosophila melanogaster* se diseñó un experimento similar al del estudio anteriormente nombrado para testar el compuesto 5-itu sobre células Kc167 y así evaluar, en nuestro caso mediante WB, la cantidad de H3T3p como producto de la actividad de Haspin.

Utilizamos dos concentraciones distintas, 1 μ M y 10 μ M puesto que son en las que ellos observaron un efecto notorio. Además, por experimentos realizados en el laboratorio sabemos que los niveles de H3T3p en *Drosophila melanogaster* son superiores en mitosis que en

interfase como está descrito en células de mamífero (De Antoni et al., 2012). La línea celular utilizada es la Kc167 y se decidió realizar el experimento en dos condiciones celulares distintas, en células en crecimiento exponencial y en células estacionarias por dos motivos. En primer lugar, ya que en las primeras podemos comprobar la eficiencia del tratamiento y comparar con lo publicado y en segundo lugar porque las células estacionarias se asemejan a la interfase que es el estadio del ciclo celular donde las proteínas *insulator* desarrollan su actividad en la cromatina.

Después del tratamiento de 24 horas con 5-itu podemos analizar varios parámetros para valorar que tratamiento es el adecuado. En nuestro caso hemos optado por analizar el crecimiento y la viabilidad de la población con el número de células finales cuantificadas en el momento de la recogida (tabla 10). En la condición de células exponenciales si comparamos el conteo obtenido en las células control respecto las tratadas observamos que para el tratamiento a $1\mu\text{M}$ hay una reducción del 21,87% mientras que las tratadas con $10\mu\text{M}$ la diferencia es del 51.17%.

Tabla 10. Recuento celular tras 24h de tratamiento con 5-itu

Células Exponenciales		
	N.º de células totales	% respecto al control
Control	$32 \cdot 10^6$	100
$1\mu\text{M}$	$25 \cdot 10^6$	78,13
$10\mu\text{M}$	$20 \cdot 10^6$	48,83
Células Estacionarias		
	N.º de células totales	% respecto al control
Control	$46 \cdot 10^6$	100
$1\mu\text{M}$	$45,8 \cdot 10^6$	99,57
$10\mu\text{M}$	$45,7 \cdot 10^6$	98,92

En lo referente a las células en fase estacionaria observamos que prácticamente las diferencias son inexistentes entre los valores obtenidos para cada una de las distintas condiciones (tabla 10). Al compararlas con su correspondiente control sin tratamiento observamos que para $1\mu\text{M}$ se obtiene un 0.43% menos y para $10\mu\text{M}$ un 1,08% menos de células. Esas pequeñas diferencias son insignificantes y pueden ser resultado de diferencias experimentales.

Debido a los resultados obtenidos decidimos utilizar el compuesto a $10\mu\text{M}$ porque siendo la concentración más alta y por tanto más eficaz en células estacionarias no provoca muerte celular. Tras repetir el experimento se analizó por WB los niveles de H3T3p tal como se encuentra representado en la figura 25. En el apartado A de la figura 25 observamos las imágenes correspondientes al WB para H3T3p y H3, el control de carga utilizado para la normalización. Cada una de las muestras de las células en crecimiento exponencial y estacionarias están cargadas por duplicado en concentraciones crecientes. A simple vista observamos que las células en crecimiento exponenciales tienen valores superiores de H3T3p. El resultado de la cuantificación se muestra representado en el gráfico del apartado B de esta misma figura. El análisis en células exponenciales nos demuestra que el tratamiento de 5-itu a $10\mu\text{M}$ es eficiente en la disminución de la actividad de Haspin puesto que la H3T3p disminuye su presencia al 80% en células exponenciales. En células estacionarias el tratamiento con 5-itu también disminuye la presencia de la H3T3p pero la cuantificación resulta difícil porqué los niveles son bajos. Este hecho es un factor limitante, ya que la sensibilidad de la técnica está en el límite y eso dificulta poder hacer una cuantificación real de la disminución de la fosforilación.

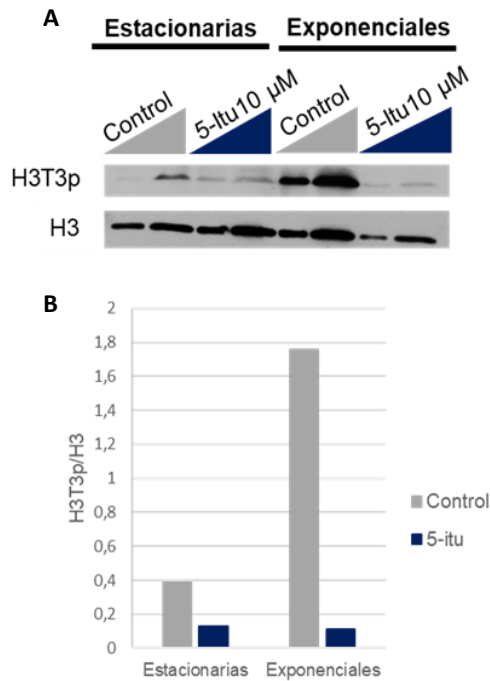


Figura 25. La H3T3p disminuye en células Kc167 tratadas con 5-itu. A) WB de H3T3p y H3 como control de carga de extractos proteicos procedentes de células mitóticas y estacionarias. Para ambas fases del ciclo celulares encontramos 2 cantidades para cada muestra de la condición control y la condición tratada con 5-itu a 10 μ M. Además, ambas muestras de la condición exponencial han sido tratadas con colchemida. B) El gráfico representa la cuantificación del WB. Los valores obtenidos para H3T3p han sido normalizados por los valores de H3.

4.2.1.1.2. Reducción de los niveles de la proteína Haspin mediante tratamiento con RNA de interferencia

El uso del dsRNA para la obtención de una reducción de Haspin es otra estrategia útil para obtener la condición mutante en células. Este método suele garantizar un porcentaje de depleción bastante alto de la proteína en la que se trabaja, aunque en nuestro caso, se nos han presentado varias dificultades en la práctica de esta técnica.

El primer contratiempo surge con la evaluación de la proteína total sintetizada ya que el anticuerpo contra Haspin no funciona para WB impidiendo así su detección y cuantificación. Este problema ya lo contemplábamos desde un inicio, por lo que decidimos analizar la expresión total de Haspin mediante la cuantificación de mRNA por RT-PCR con el uso de oligonucleótidos específicos para el mRNA de Haspin. Por lógica, esperamos que, a menor cantidad de mRNA cuantificado, menor debe de ser la cantidad de proteína que se traduce.

En segundo lugar, pese a poner a punto un tratamiento usando la combinación de dos dsRNA que reconocen 2 regiones distintas con la finalidad de aumentar la eficiencia, la bajada del RNA no siempre ha sido efectiva (Fig. 26). Sin embargo, todos los experimentos realizados se han hecho sobre células con una disminución del mRNA de entre el 70 y el 80% (Fig. 26).

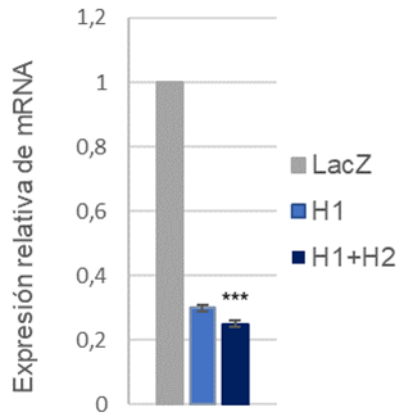


Figura 26. El tratamiento con dsRNA contra Haspin reduce su expresión. En células Kc167 se han realizado tres tratamientos distintos, LacZ (control), H1 (dsRNA Haspin 1) y H1+H2 (combinación del dsRNA Haspin 1 junto con dsRNA Haspin2) para la reducción de la expresión de Haspin. La gráfica representa los niveles de expresión del gen *Haspin* mediante el análisis por rt-qPCR. Los datos se han normalizado respecto a la expresión del gen *Rpl23* y se han representado respecto a la expresión de *Haspin* en el LacZ. Las barras de error son el SEM de dos experimentos independientes de la condición H1 y de tres experimentos independientes de las condiciones LacZ y H1+H2. Las diferencias entre el control y la condición H1+H2 son significativas *** $p < 0,001$ según t-Student.

4.2.1.2. Líneas de *Drosophila melanogaster*

A lo largo del desarrollo de este proyecto se han utilizado tejidos de distintas etapas del desarrollo de la mosca de la fruta para estudiar el papel de Haspin en la organización de la cromatina y las proteínas con las que se le relaciona en la línea mutante de Haspin conocida como *Haspin*¹²⁸ y una línea de *Drosophila* que nos ha servido como control (*w*¹¹¹⁸). La línea mutante *Haspin*¹²⁸ se trata de una línea de *Drosophila* mutante nula para Haspin que fue creada y caracterizada por la Dra. Ujué Fresán durante su tesis. Esta se obtuvo mediante la eliminación de un elemento “P” que se encontraba insertado en la región 5’ no traducida (UTR) del gen Haspin. El salto del elemento “P” de la cromatina se llevó consigo 5700pb, que abarcan los dos

primeros exones, todo el primer intrón y parte del segundo, impidiendo la síntesis de la proteína debido a la escisión del ATG del gen. Además, el análisis de la expresión de *Haspin* en la línea *Haspin*¹²⁸ demuestran una reducción total en la línea mutante respecto a la expresión en la línea control y la desaparición por completo de la H3T3p en inmunotinciones de cromosomas politénicos de glándulas salivares de larva 3 y en células mitóticas de cerebros.

4.2.2. Haspin es necesaria para la organización de la región génica de *Abdominal-B*

4.2.2.1. Análisis del efecto de Haspin en la organización de la región genómica de *Abdominal-B*

En *Drosophila*, Haspin actúa como proteína *insulator* tal como la hemos descrito en el inicio de este apartado. Las proteínas *insulator* están relacionadas con la regulación de la expresión génica a través de la estructura que confieren a la cromatina (Kyrchanova et al., 2008). Resultados previos a esta tesis mostraron que Haspin es necesario para la funcionalidad de los diferentes *insulators* del BX-C, *Fab6*, *Fab7* y *Fab8*, sugiriendo que Haspin podría estar involucrada en la regulación de la estructura de la región genómica de *Abd-B*. La técnica escogida para realizar este estudio es la 3-C ya que permite conocer los contactos existentes entre regiones que se encuentran alejadas en secuencia en el DNA, pero en contacto o próximas en el interior del núcleo.

4.2.2.1.1. Estudio en embriones tardíos

El análisis de la organización de la estructura en el BX-C se realizó a través del estudio de los contactos entre los dos promotores principales de *Abd-B*, el promotor del transcrito A (*PA*) y del transcrito B (*PB*) y diferentes regiones del BX-C. Para ellos se realizó la técnica 3-C en embriones de *Drosophila* de 16 a 18h de desarrollo, puesto

que la actividad mitótica es mucho menor que al inicio del desarrollo embrionario (Giancotti et al., 1984), de esta manera favorecemos la cromatina extraída provenga en su mayoría de células interfásicas. Las líneas de mosca escogidas fueron la *w¹¹¹⁸* como control y la línea mutante *Haspin¹²⁸*. Para normalizar la cantidad de material en las diferentes muestras y el grado de digestión y ligación en cada muestra se ha utilizado una región genómica no relacionada, el gen *ribosomal protein 49 (rp49)*, situado en el cromosoma 2 alejado de la región de estudio y que contiene varias dianas para el enzima utilizado en el experimento en su interior (ver en métodos).

En la figura 27 se encuentra representada la frecuencia de interacciones de los distintos puntos analizados del BX-C. *PA* y *PB* son los dos promotores del gen *Abd-B* utilizados en este estudio como *anchor* para el estudio de los contactos que se dan con diversas zonas de esta región genómica que se encuentran numeradas en el gráfico. Las regiones 1, 3, 4 y 6 corresponden a las regiones reguladoras *Fab8*, *Fab7*, *Fab6*, *Mcp* respectivamente mientras que el número 7 corresponde al promotor del gen *abd-A*. Las dos regiones restantes, la 2 y la 5, corresponden a regiones genómicas que no corresponden a ningún elemento regulador previamente caracterizado.

Estos análisis muestran en primer lugar que existe una mayor frecuencia de interacción entre promotores y elementos reguladores que con regiones intermedias que no son reguladoras. Este hecho da robustez a nuestro estudio puesto que observamos que regiones reguladoras que se encuentran lejos de los promotores como por ejemplo el *Fab7* y el *PA* que se encuentran a unas 40 Kb aproximadamente tienen frecuencias de contactos superiores que regiones intermedias como es el caso de la región número 2 que se encuentran más próximas al *PA* (~25Kb).

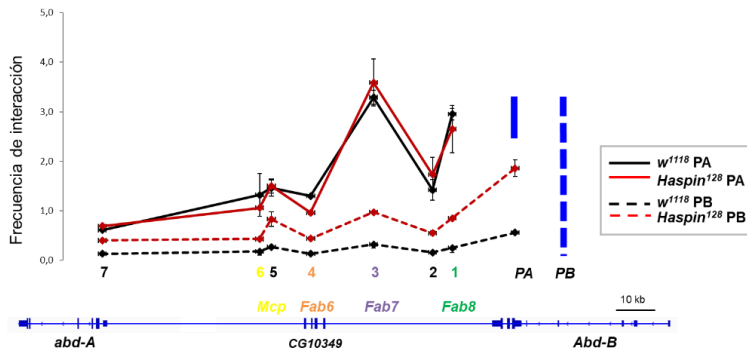


Figura 27. Los contactos del PB en la región del BX-C varían en ausencia de Haspin. En negro se representan los contactos en el control (*w*¹¹¹⁸) y en rojo los de la línea mutante (*Haspin*¹²⁸) analizados mediante 3-C. La línea continua representa los contactos del promotor A y la discontinua del promotor B. Todos los puntos analizados se encuentran situados cerca de secuencias de reconocimiento de la enzima DpnII, indicados por números del 1 al 7. Las separaciones genómicas han sido dibujadas a escala según el mapa de la región genómica de *Abd-B* situado debajo del gráfico. Cada uno de los resultados se han normalizado con el gen control *rp49*. Las barras de error son el SEM de tres replicas biológicas independientes. Las diferencias entre el control y el mutante son significativas y han sido determinadas por el test t de Student ($p < 0.001$ para las interacciones entre el PB y el PA o el *Fab7* y para el resto de las interacciones cuando el PB es el punto de referencia es de $p < 0.05$).

En condiciones normales (*w*¹¹¹⁸) las interacciones que se dan entre el PA y las demás regiones disminuyen con la distancia y es menor la interacción con *Mcp* que la que se da con el *Fab8* o *Fab7*, aunque esta es mayor que con *Fab6* que es la región reguladora de *Abd-B* que menos contactos presenta.

El PB, que se encuentra más lejano que el PA, en condiciones normales no interacciona con las regiones reguladoras tal como se encuentra representada por la línea discontinua negra (Fig. 27).

En ausencia de Haspin, el perfil de las interacciones del PA, representado en la línea continua roja, no cambia. En cambio,

observamos que ante la falta de Haspin el *PB* entra en contacto claramente con las regiones reguladoras y con el *PA* de manera significativa tal como se encuentra representado en la línea discontinua roja.

Así pues, observamos que en embriones de 16 a 18h de desarrollo, la estructura de la cromatina que comprende la región reguladora del gen *Abd-B* cambia ante la falta de Haspin.

4.2.2.1.2. Estudio en líneas celulares en cultivo de *Drosophila melanogaster*

En embriones existe una variedad de las células que presentan expresión de *Abd-B* y células que no lo expresan. Con la finalidad de conocer si existe una correlación entre la estructura de esta región y la expresión del gen *Abd-B* hemos analizado distintas líneas celulares mediante 3-C. Las dos líneas celulares escogidas fueron Kc167 ya que no expresa *Abd-B* y Sg4 que si lo expresa. Ambas líneas proceden de células de embrión (Fly base).

El análisis 3-C se centró en el estudio de los contactos de cada uno de los promotores, *PA* y *PB*, con las regiones reguladoras *Fab7* y *Fab8*. El análisis en las células Kc167 muestra que el promotor *PA* se encuentra interaccionando con ambas regiones reguladoras, siendo la *Fab8* con la que más frecuencia interacciona (Fig. 28). En lo referente al *PB* observamos que la interacción con las dos regiones reguladoras es muy baja casi inexistente. En cuanto el resultado en las células Sg4, observamos que en este caso ambos promotores, *PA* y *PB*, interaccionan con las regiones *Fab7* y *Fab8*, siendo en ambos casos esta última región reguladora con la que más frecuencia de contacto presenta. Como antes, el *PA* es el que más frecuencia de interacción tiene con ambas regiones reguladoras.

Si comparamos ambos resultados observamos que para ambas el *PA* es el que más frecuencia de contacto presenta, siendo las células *Sg4* en la que se obtienen valores más elevados. En cuanto al *PB* los resultados son diferentes ya que para las *Kc167* la frecuencia de contacto es casi indetectable mientras que en las *Sg4* es totalmente lo contrario, llegando a tener niveles similares a la frecuencia que presenta el *PA* en las *Kc167*.

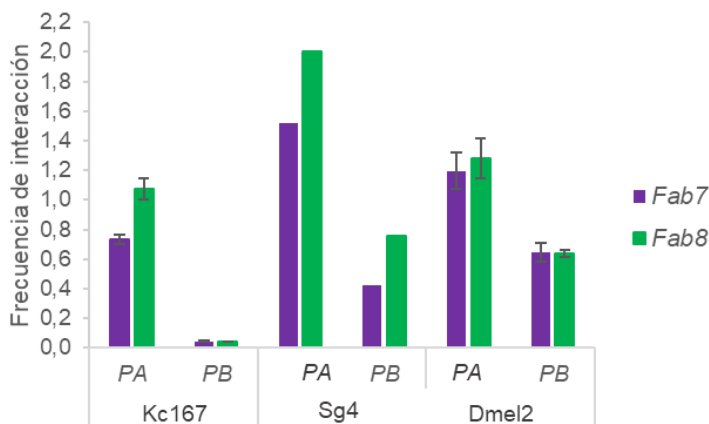


Figura 28. En las líneas celulares *Kc167*, *Sg4* y *Dmel2* los contactos del *PA* y del *PB* con el *Fab7* y *Fab8* son distintas. El resultado es la media de dos experimentos 3-C independientes en las líneas *Kc167* y *Dmel2* y de un experimento en la línea *Sg4*. Las barras de erros son el SEM.

Si observamos estos resultados obtenidos en líneas celulares en cultivo y los comparamos con los obtenidos en embriones (Fig.27), parece que existe un paralelismo. El patrón que presentan las células *Kc167* se asemeja al que presenta la cromatina de embriones de la condición control, donde el *PA* está en contacto con las regiones reguladores y el *PB* no. En cuanto a las *Sg4* vemos que existe una cierta similitud con la estructura que adopta la cromatina ante la falta de Haspin, puesto que en ambos casos los promotores, *PA* y *PB*, están en contacto con el *Fab7* y el *Fab8*. Existen diferencias en cuanto a la región con la que más contactan, en el caso de los

embriones siempre es la *Fab7* la que más frecuencia presentan, mientras que en células siempre es la *Fab8*.

Estas similitudes podrían indicar que Haspin es necesaria para el mantenimiento de la estructura de la región en un estado silenciado tal como la presentan las Kc167, mientras que su falta, promueve la de un estado activo como el de las células Sg4.

Con la finalidad de dar robustez a estos resultados decidimos realizar un análisis 3-C en células Dmel2 las cuales no presentan expresión de *Abd-B* y al igual que las dos líneas anteriores la procedencia del cultivo es de células de embrión (Fig. 28). Los resultados demuestran que ambos promotores están en contacto con las regiones reguladoras *Fab7* y *Fab8*. Si analizamos cada promotor por separado observamos que los contactos entre el *PA* con el *Fab7* y el *Fab8* son similares al igual que pasa con las frecuencias de contactos que se dan entre el *PB* y las regiones reguladoras *Fab7* y *Fab8*, pero a niveles menores.

El resultado obtenido con las células Dmel2 se asemeja más al obtenido con las células Sg4 que al de las Kc167. El hecho de que dos líneas celulares que presentan diferente patrón de expresión para el gen *Abd-B* tengan patrones de contacto similares da pie a pensar que la organización que adopta la cromatina que comprende el *Fab7*, el *Fab8* y el gen *Abd-B* no es crucial para la regulación de expresión genética en células en cultivo de *Drosophila melanogaster*. Hay que destacar el hecho de que las células Dmel2 se mantienen en cultivo sin suero fetal bovino (FBS) a diferencia de las Kc167 y las Sg4 sí. Esta variable puede ser un factor que podría llegar a tener una cierta influencia en la cromatina.

Aunque los resultados obtenidos con este estudio son preliminares no muestran una correlación entre la expresión o silenciamiento y la estructura de la región.

4.2.3. Estudio del papel de Haspin en el silenciamiento de la expresión génica por los complejos Polycomb

Resultados previos a esta tesis indican que Haspin podría estar teniendo algún papel en el mantenimiento del silenciamiento génico mediado por las proteínas del grupo Polycomb (PcG).

4.2.3.1. La unión de Pc a la cromatina disminuye en ausencia de Haspin

Para analizar si la presencia del complejo PRC1 en la cromatina se ve afectada en ausencia de Haspin hemos realizado un análisis de la presencia de Pc por CHIP-qPCR.

El análisis (Fig. 29), indica que la presencia de Pc disminuye significativamente en todas las regiones reguladoras del BX-C en la línea mutante *Haspin*¹²⁸ respecto a la línea control *w*¹¹¹⁸. Concretamente, en los PRE de Mcp, Fab7 y Fab8, que son regiones reguladoras del complejo génico de BX-C donde Pc se une. Y también sucede lo mismo para PA y PB, los dos promotores del gen *Abd-B*.

Así pues, este resultado indica que Haspin es necesaria para la presencia de Pc en la cromatina.

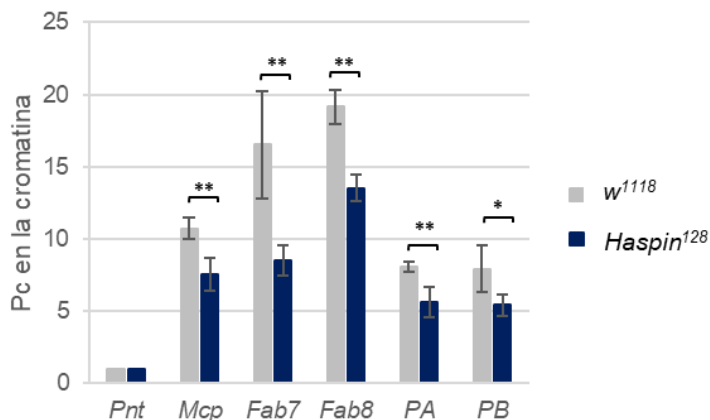


Figura 29. Haspin es necesaria para la presencia de Pc en la cromatina. El análisis mediante ChIP-qPCR de la frecuencia de inmunoprecipitación de diferentes regiones del BX-C con el anticuerpo contra Pc está representado en la gráfica. El experimento se ha realizado en cerebro de larva 3 en la línea control *w*¹¹¹⁸ y en la mutante *Haspin*¹²⁸. Cada una de las medias se han calculado con los datos normalizados con su input y se representan según la ratio de inmunoprecipitación respecto al gen *Pointed* (*Pnt*). Las barras de error son el error estándar de la media de tres experimentos independientes. **p*<0.05, ***p*<0.01, *** *p*<0.001 determinados por la prueba t de Student.

4.2.3.2. La marca del silenciamiento H3K27me3 se ve afectada ante la ausencia de Haspin

El complejo PRC2 es el otro complejo del complejo de proteínas PcG que interviene en el silenciamiento. Se encarga de la deposición de la trimetilación de la H3K27, la cual es necesaria para la unión del PRC1 a través de Pc (Brown et al., 2018; Cheutin and Cavalli, 2018). Con el fin de analizar si este complejo también se veía afectado como en el caso de Pc decidimos analizar si se veía afectada la presencia de su producto en la cromatina mediante ChIP-qPCR.

En la figura 30 se representan los resultados obtenidos en el análisis por CHIP-qPCR de la presencia de la H3K27me3 en los PREs *Mcp*, *Fab7* y *Fab8*, en las líneas *w¹¹¹⁸* (control) y *Haspin¹²⁸* (mutante). Los resultados muestran una ligera bajada en toda la región que es estadísticamente significativa únicamente en el *Fab7*. En el caso de *Mcp* y *Fab8* pese a observar una leve disminución no es significativa.

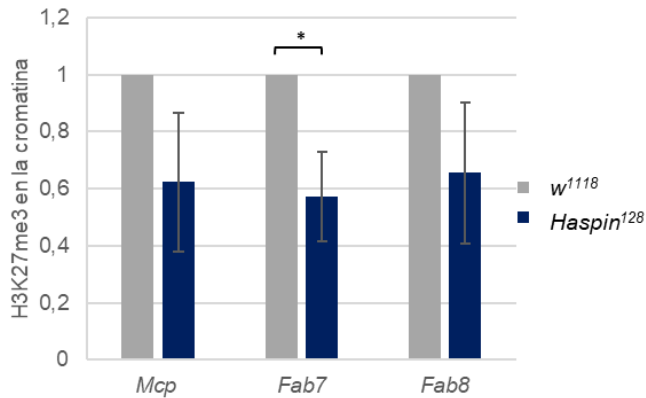


Figura 30. Haspin es necesaria para la presencia de H3K27me3 en la región reguladora *Fab7*. El análisis mediante CHIP-qPCR de la frecuencia de inmunoprecipitación de diferentes regiones del BX-C con el anticuerpo contra la H3K27me3 está representado en la gráfica. El experimento se ha realizado en cerebro en embriones de 21 a 23 h en la línea de *Drosophila* control *w¹¹¹⁸* y en la mutante *Haspin¹²⁸*. Cada una de las medias se han calculado con los datos normalizados con su input y se representan según la ratio de inmunoprecipitación en ausencia de Haspin respecto al control. Las barras de error son el error estándar de la media de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$ determinados por el test t de Student.

Este resultado parece indicar que la H3K27me3 en ausencia de Haspin se ve levemente afectada en estas regiones del BX-C.

4.2.3.3. El silenciamiento regulado por las proteínas del grupo PcG se ve afectado por Haspin

Las proteínas del complejo Pc funcionalmente actúan como represor transcripcional al unirse a los PRE presentes en la cromatina (Bantignies and Cavalli, 2011). Teniendo en cuenta que la presencia de la proteína Pc, miembro del PRC1, disminuye en la cromatina ante la falta de Haspin y que además la marca H3K27me3 efectuada por el PRC2 también se ve afectada se decidió evaluar los niveles de expresión del gen *Abd-B*.

Para ello se llevó a cabo una rt-PCR en las líneas de *Drosophila w¹¹¹⁸* como control y en la línea mutante *Haspin¹²⁸*. El análisis se realizó sobre cromatina procedente de cerebro de larva 3 debido a los resultados del apartado anterior y en ovario de mosca adulta ya que es un tejido con baja expresión para *Abd-B* y se pueden detectar incrementos débiles.

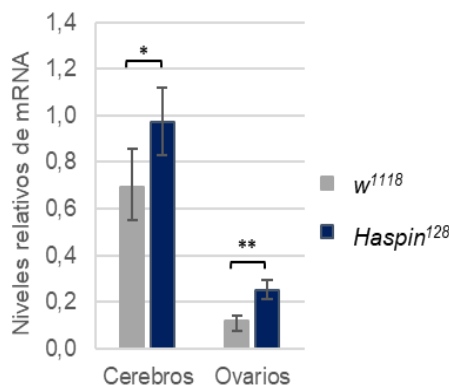


Figura 31. La expresión del gen *Abdominal-B* se ve alterada en ausencia de Haspin. Los niveles de expresión del gen *Abd-B* analizados por rt-PCR han sido normalizados respecto a la expresión del gen *Actina5C* (*Act5c*). En la gráfica se representan los valores de la línea mutante *Haspin¹²⁸* respecto a la línea control *w¹¹¹⁸*. Las barras de error son el error estándar de la media de cuatro replicas biológicas independientes en cerebros y tres en ovarios. *p<0.05 y **p<0.01 determinada por la prueba estadística t de Student.

Los resultados demuestran (Fig. 31) que los niveles de expresión del gen *Abd-B*, tanto en cerebros como en ovarios, aumentan significativamente en la línea mutante. Por lo tanto, podemos decir que la ausencia de Haspin, el gen *Abd-B* se encuentra desreprimido indicando así que la proteína de estudio contribuye al silenciamiento del gen homeótico *Abd-B*.

El gen *Abd-B* expresa dos grupos de transcritos distintos, el A y el B, tal como hemos explicado anteriormente (Birkholz et al., 2013). Debido al efecto observado ante la falta de Haspin hemos querido analizar en uno de los tejidos anteriores si la desrepresión era debida a un aumento de la expresión de un tipo de transcrito en concreto o si era un efecto general en los transcritos del gen.

En la figura 32, se han representado la expresión de ambos transcritos. Tal como vemos la expresión de la condición control (w^{1118}) es menor que en la de mutante (*Haspin¹²⁸*) para los dos grupos de transcritos. Así pues, ante la falta de Haspin existe un aumento de

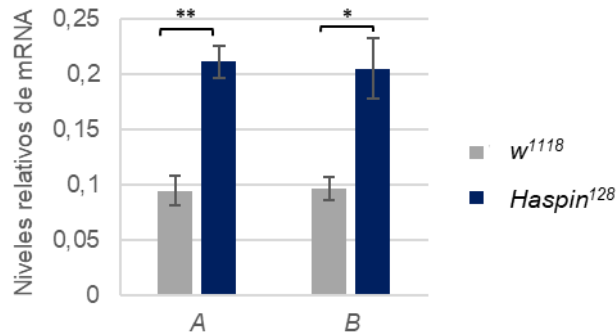


Figura 32. La expresión de ambas clases de transcritos del gen *Abdominal-B* se ven alterados en ausencia de Haspin. La expresión de ambos transcritos ha sido analizada por rt-PCR. La gráfica representa la inducción de la expresión del gen *Abd-B* en la línea mutante *Haspin¹²⁸* respecto la línea control w^{1118} normalizados respecto a *Act5C*. Las barras de error son el error estándar de la media de cuatro replicas biológicas independientes, * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ determinada por la prueba estadística t de Student.

la expresión del gen *Abd-B*, que afecta de manera significativa por igual a ambos grupos de transcritos.

4.2.3.4. Análisis fenotípico de las transformaciones homeóticas derivadas de la ausencia de Haspin

En publicaciones previas a este estudio se ha demostrado una relación directa entre el silenciamiento regulador por las proteínas del complejo PcG y la aparición de transformaciones homeóticas. Este efecto fenotípico es debido a que el grupo de proteínas PcG se encargan del silenciamiento de los genes homeóticos (Kassis et al., 2017; Lewis, 1978).

Las moscas adultas de la línea *Haspin*¹²⁸ no presentan transformaciones homeóticas y sabemos que Haspin disminuye los niveles de Pc en la cromatina, pero no por completo, por ese motivo es interesante llevar a cabo un análisis en un fondo sensibilizado para la mutación de Pc.

Para realizar el estudio utilizamos tres líneas de mosca mutantes diferentes de Pc: *Pc*¹, *Pc*³ y *Pc*¹⁵. En la figura 33 aparecen representados en porcentajes la frecuencia de transformaciones homeóticas obtenidas para las tres líneas utilizadas. Hay dos fenotipos distintos que se pueden observar. En primer lugar, está el denominado *extra sex combs*, que se trata de la aparición de peines sexuales en las patas donde normalmente no están presentes. Hay dos variaciones de este fenotipo, la aparición de pelos en las patas 2 y en algunos casos también en las patas 3 (Fig. 33). El segundo fenotipo observado es la transformación de ala a halterio. Tal como podemos observar los valores de las transformaciones obtenidas para la línea *Haspin*¹²⁸; *Pc* -/+ son superiores para las tres líneas utilizadas respecto a los porcentajes de las líneas que sólo presentan la mutación de la línea Pc en heterocigosis. Llegando en algunos casos de no desarrollarse ningún individuo con transformación a

hacerlo el 100% de la progenie al combinar ambas mutaciones (Fig. 33).

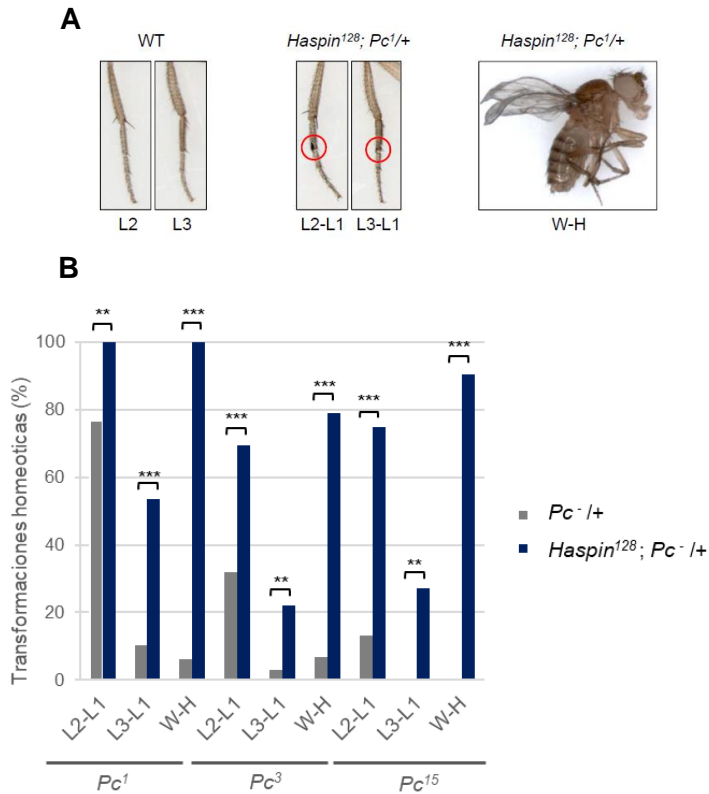


Figura 33. La mutación de Haspin junto con la mutación de Pc estimula la aparición de transformaciones homeóticas. A) Las imágenes son representativas de las transformaciones homeóticas observadas: de la segunda a la primera pata (L2-L1), de la tercera a la primera pata (L3-L1) donde los peines sexuales están rodeados por un círculo rojo y de ala a halterio (W-H). B) En la gráfica se representan los porcentajes de individuos con transformaciones. Las diferencias se han analizado estadísticamente donde ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ están determinadas por el test z.

Con la finalidad de descartar que los resultados anteriores fueran debidos al fondo genético, se decidió realizar el mismo ensayo con otra línea mutante de Haspin. Para ello se decidió usar la línea RNAi de Haspin bajo la expresión del promotor del gen actina para analizarla junto la línea *Pc*³ mutante para Pc.

Tal como podemos observar en la figura 34 el porcentaje de individuos que presentan las transformaciones homeóticas incrementa en aquellos que tienen la combinación de la mutación de Pc con el RNAi de Haspin respecto a los que solo tienen la mutación de Pc. Los individuos analizados mostraban ambas transformaciones homeóticas representadas en la figura 31. En lo referente al fenotipo *extra sex combs* sólo está presente en el segundo par de patas de los machos. El otro fenotipo que se obtiene es el de la aparición de un halterio en el lugar de desarrollo del ala al igual que en el experimento anterior. Al incrementar la temperatura a 29°C para reforzar el efecto del RNAi se produce la letalidad en machos y por tanto hemos analizado solo el fenotipo en hembras.

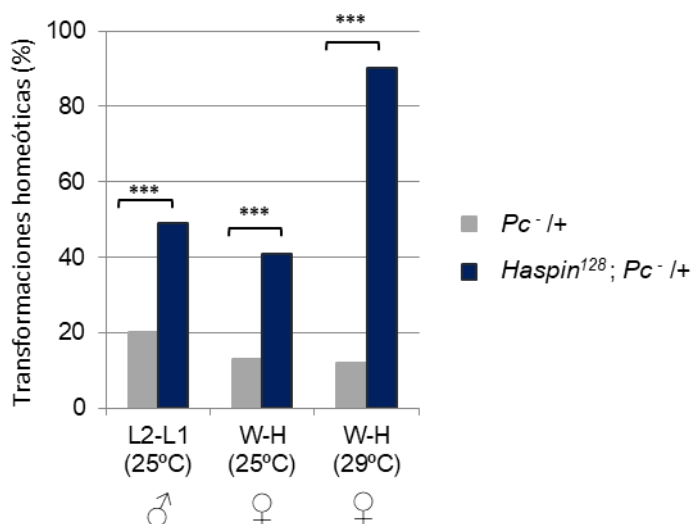


Figura 34. Las transformaciones homeóticas también se producen con el mutante de *Haspin*^{RNAi}. Porcentajes de los individuos con las siguientes transformaciones homeóticas observadas: la segunda a la primera pata (L2-L1) a 25°C y de ala por halterio (W-H) en hembras a 25°C y 29°C. Las diferencias se han analizado estadísticamente donde *** $p < 0.001$ están determinadas por el test z.

Los resultados muestran que Haspin participa en la regulación del silenciamiento junto con Pc, puesto que la mutación de ambas

proteínas aumenta el porcentaje de individuos con transformaciones homeóticas.

4.2.3.5. El *pairing sensitive silencing* depende de Haspin

Está descrito en la bibliografía que los complejos PcG están involucrados en el silenciamiento génico al asociarse a PREs situados en *cis*- y en *trans*-. Esta particularidad da lugar al fenómeno de *pairing sensitive silencing* (PSS) en el que el silenciamiento se ve potenciado debido al encuentro de los PRE, dónde se encuentran unidos los PcG, en el espacio (Bantignies et al., 2003). Tal como sucede en ensayos donde moscas transgénicas con un PRE transgénico en heterocigosis presentan un silenciamiento menor que aquellas moscas transgénicas que son portadoras del PRE transgénico en homocigosis tal como se observa a través del nivel de expresión del gen reportero al que se encuentra asociado en el transgén.

Los resultados obtenidos para el estudio de Haspin y Pc en el laboratorio desarrollados en los apartados anteriores demuestran que la falta de Haspin condiciona el silenciamiento por parte de PcG, debido a una reducción de Pc en la cromatina así pues es probable que el PSS también se pueda ver afectado. El análisis del posible efecto de la falta de Haspin sobre el fenómeno de PSS se ha realizado con el PRE del *Fab7* en 2 líneas diferentes. Esta región es interesante ya que por ChIP-qPCR hemos visto una reducción de Pc como efecto de la ausencia de Haspin.

El primer experimento realizado es la evaluación de la expresión del gen reportero *miniwhite* bajo la regulación del PRE del *Fab7*. En condiciones normales el gen *miniwhite* se encuentra silenciado por las proteínas PcG, y además este silenciamiento es mayor cuando el transgén se encuentra en homocigosis. En ausencia de Haspin el gen

reportero *miniwhite* incrementa su expresión indicando que Haspin contribuye al PSS (Fig. 35).

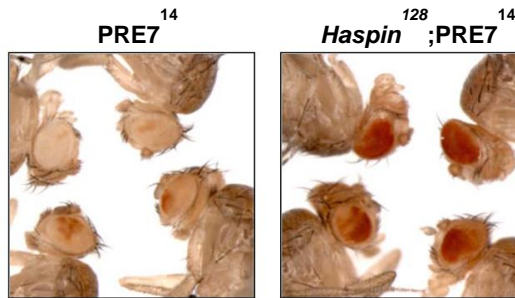


Figura 35. Haspin está involucrada en el PSS. Análisis de la expresión del gen *miniwhite* en el ojo de moscas transgénicas con un PRE-*miniwhite* en un fondo genético control o mutante *Haspin*¹²⁸.

En el segundo experimento utilizamos una línea que tiene un transgén con el elemento Fab7 cerca del inicio de transcripción del gen *scalloped*. Este gen es necesario para la formación del ala y se encuentra situado en el cromosoma X. En hembras de *Drosophila* homocigotas para esta inserción el gen *scalloped* se encuentra silenciado debido al PSS. Los resultados obtenidos que se muestran en la tabla 11 muestran que en ausencia de Haspin observamos que se recupera la expresión a través del rescate del ala en el 66% de las hembras debido a la interferencia en el PSS tal como sucede en mutaciones del grupo de proteínas PcG (Canudas et al., 2005; Cavalli and Paro, 1998).

Tabla 11. Porcentaje de hembras con alas normales

Genotipo	2	1	0	n
<i>w</i> ¹¹⁸	10	25	65	119
<i>Haspin</i> ¹²⁸	66	20	14	122

*2, 1, 0 corresponde al número de alas correctamente desarrolladas; n es el número total de hembras analizadas.

Los resultados indican que Haspin es necesario para el PSS mediado por PRE del *Fab7* y las proteínas del complejo PcG.

4.2.4. La relación de Haspin y el complejo de las Cohesinas en interfase en *Drosophila melanogaster*

Los resultados obtenidos previamente en el laboratorio indicaban una posible relación entre Haspin y el complejo de las Cohesinas. Concretamente los estudios durante la tesis de la Dra. Ujué Fresán, mostraron que Haspin es necesaria para la asociación de Pds5 a la cromatina de *Drosophila melanogaster* durante la interfase.

4.2.4.1. Haspin interacciona con Pds5 y con Rad21

Debido a que Haspin es necesaria para la presencia de Pds5 en la cromatina, quisimos analizar si ambas proteínas interactuaban. Para ello analizamos la presencia de Pds5 a través de la inmunoprecipitación de Haspin en glándulas salivares de larva 3 y así analizar si esta proteína interacciona en células en interfase.

La co-IP se realizó en extractos de glándulas salivares de moscas expresando Pds5-HA-Flag bajo la expresión del promotor *nubbin* con el sistema UAS-Gal4. También se realizó como control la detección de Pds5 mediante su inmunoprecipitación con α Flag. Los resultados en la figura 36 muestran que la co-immunoprecipitación de Haspin y Pds5-HA-Flag es positiva, ya que observamos la banda específica de Pds5 presente en el input y en la muestra α Flag. También está presente en la muestra inmunoprecipitada con α Haspin mientras que no lo está en el control con un anticuerpo no relacionado.

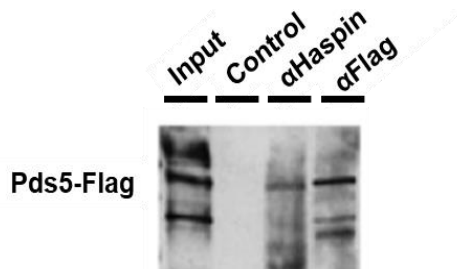


Figura 36. Haspin y Pds5 se asocian. Análisis del extracto proteico de glándulas salivares de larva 3 de *Drosophila melanogaster* que expresan bajo el control del promotor *nubbin* Pds5-HA-Flag, la cual fue inmunoprecipitada con αHaspin y αFlag. El análisis se realizó por WB mediante la detección con αFlag en las muestras input (corresponde al 10% de la muestra inmunoprecipitada) y las inmunoprecipitadas: Control con un anticuerpo no relacionado y αHaspin y αFlag con el anticuerpo que llevan por nombre.

Debido a la interacción entre Pds5, decidimos analizar si Haspin forma un complejo estable con las cohesinas. Para responder a esta pregunta decidimos llevar a cabo la co-IP de Rad21 con el anticuerpo αHaspin en extractos de glándulas salivares. Puesto que no disponemos del anticuerpo contra Rad21 se utilizaron moscas que expresan Rad21 fusionado a un residuo myc bajo la expresión del promotor de *Tubulina*. En este caso, combinamos la expresión ubicua de la proteína Rad21-Myc en un fondo mutante para Rad21 (*Vtd^{ex3}*) con el fin de obtener una línea de *Drosophila melanogaster* con niveles de Rad21 globales similares a una mosca control.

El ensayo nos muestra que observamos señal de Rad21-myc en el extracto total (input) y en la muestra inmunoprecipitada con αHaspin (Fig. 37). Por otro lado, en el control negativo que es muestra IP sin anticuerpo no obtenemos señal. Éste hecho demuestra que la señal que detectamos es específica.

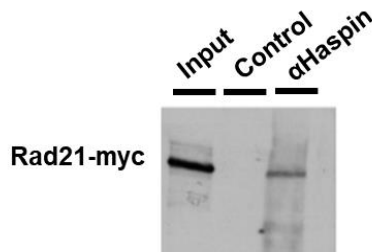


Figura 37. Haspin y Rad21-myc forman un complejo estable.

Inmunoprecipitación con α Haspin en extracto proteico de glándulas salivares de larva 3 de *Drosophila melanogaster* que expresan Rad21-myc en un fondo mutante para Rad21. El análisis se realizó por WB mediante la detección de Rad21-myc con α myc. El input corresponde al 10% del material inmunoprecipitado, la muestra control a la inmunoprecipitación con un anticuerpo no relacionado y la α Haspin a la inmunoprecipitación con el anticuerpo α Haspin.

Así pues, podemos decir que Haspin se encuentra asociada a las proteínas Pds5 al complejo central de las cohesinas durante la interfase.

4.2.4.2. La distribución de las cohesinas no cambia ante la falta de Haspin en Kc167

Puesto que Haspin está relacionada con las cohesinas ya que es necesaria para la unión de Pds5 a la cromatina y a su vez interacciona con Rad21 es interesante realizar un estudio sobre la distribución del complejo central de las cohesinas a lo largo de la cromatina en ausencia de Haspin.

El análisis mediante CHIP-seq se realizó en la Universidad de Emory en Atlanta en 2017 durante mi estancia en el laboratorio del Dr. Victor Corcés. Esta técnica nos permite analizar el perfil de distribución de las proteínas a lo largo de todo el genoma. En este caso se decidió utilizar células Kc167 estacionarias para realizar el experimento y estudiar el perfil de Stromalin Antigen (SA), otra proteína que forma parte del complejo central de las cohesinas. Las dos condiciones celulares de trabajo, control y reducción de Haspin, se obtuvieron

mediante tratamiento con RNAi contra LacZ para la primera y contra Haspin la segunda. Los datos obtenidos después de la secuenciación fueron normalizados con una muestra representativa de la cromatina total.

El análisis observacional de los perfiles de unión de SA indica que el perfil obtenido en las células con bajos niveles de Haspin y el de las células control son el mismo ya que existe solapamiento entre ellos. Así pues, en todas las regiones donde están presentes en condiciones normales también lo están ante la falta de Haspin y viceversa como se observa por el ejemplo en una región del cromosoma X representada en la figura 38. Si observamos la distribución del complejo de las cohesinas mediante el análisis de la presencia de SA observamos que muestra una tendencia a presentarse enriquecida en regiones activas puesto que colocaliza parcialmente con Pol II (Henriques et al., 2018).

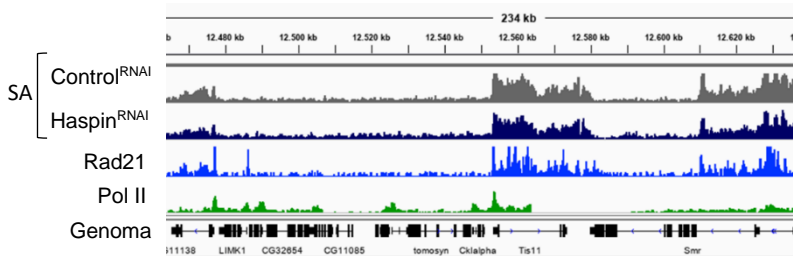


Figura 38. La distribución de SA no cambia ante la falta de Haspin. Esta imagen comprende unas 200Kb del cromosoma X. En ella se observa la distribución de SA en el Control^{RNAi} y en Haspin^{RNAi} de los ChIP-seq realizados durante esta tesis en el laboratorio de Dr. Víctor Corcés. Además, también se encuentra la distribución en la cromatina de Rad21 (GEO *database*, GSM15360009) y de Pol II total procedente del modEncode *database*).

Debido a que SA está unida en las mismas regiones en ambas condiciones demuestra que Haspin no afecta al lugar de unión de estas.

4.2.4.3. Análisis cuantitativo de las Cohesinas presentes en la cromatina

Con la finalidad de estudiar si Haspin compromete la cantidad de cohesinas en la cromatina se decidió realizar un análisis cuantitativo de la presencia de las cohesinas en la cromatina en 2 tejidos distintos de *Drosophila melanogaster* y en células Kc167 con el fin de obtener una visión más amplia de su relación. El beneficio de trabajar sobre tejidos de la línea mutante nos asegura la alteración total de Haspin frente al uso de tratamientos en cultivos celulares con RNAi.

4.2.4.3.1. Cohesinas presentes en la cromatina de Kc167

En un apartado previo hemos desarrollado los resultados obtenidos en el análisis por CHIP-seq de la presencia de SA en células. El análisis por secuenciación de un CHIP nos permite saber en qué lugares del genoma se encuentra unida nuestra proteína de estudio, en este caso el complejo de las cohesinas, pero no la cantidad de proteína presente en la cromatina. Para obtener un análisis cuantitativo del CHIP es necesario que se analice por q-PCR. Con la finalidad de conocer si la cantidad de cohesinas se veía modificada ante la ausencia de Haspin, se realizó un análisis por CHIP-qPCR en células Kc167 estacionarias. Al igual que en el CHIP-seq las células se trataron con RNAi contra Haspin y contra LacZ para obtener la condición mutante para Haspin y la condición control respectivamente. La cromatina fue inmunoprecipitada con SA y analizada por q-PCR. Se analizaron 2 regiones representativas que en el análisis por CHIP-seq mostraron un enriquecimiento de SA, una de ellas es *schnurri* (*shn*) y la otra *Smrter* (*Smr*) (Fig. 39).

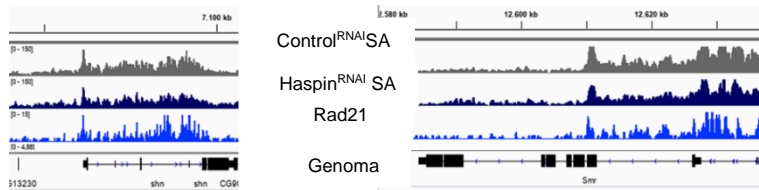


Figura 39. SA está presente en las regiones *Smr* y *shn* en células Kc167. Análisis de la distribución de SA por ChIP-seq en células Kc167 de *Drosophila melanogaster*. *Shn* y *Smr* son dos genes que se encuentran enriquecidos en SA. Además, también se encuentra la distribución en la cromatina de Rad21 (GEO *database*, GSM15360009).

Los resultados muestran un ligero aumento de la presencia de SA en *shn* y *Smr* ante la falta de Haspin (Fig. 40), sugiriendo que en células Kc167 la disminución de los niveles de Haspin modula la cantidad de cohesinas presentes en la cromatina.

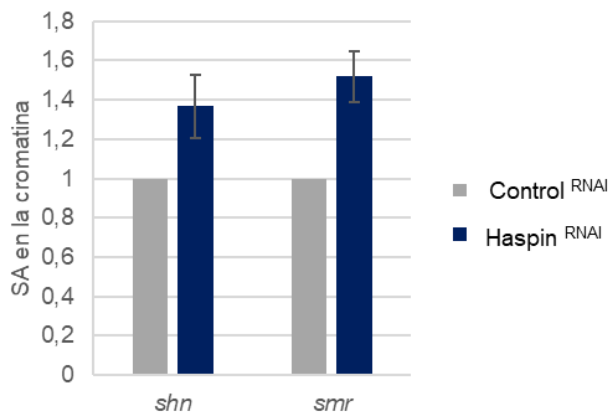


Figura 40. La presencia de SA aumenta en las regiones *shn* y *Smr* ante la ausencia de Haspin en células Kc167. Análisis mediante ChIP-qPCR de la frecuencia de inmunoprecipitación de las regiones *shn* y *Smr* con el anticuerpo α SA. Las ratios de la frecuencia de inmunoprecipitación están calculadas de la condición mutante respecto a la condición de las regiones *shn* y *Smr* normalizadas con el input están representadas en el gráfico. Las barras de error son el SEM de dos experimentos independientes.

4.2.4.3.2. Cohesinas presentes en la cromatina de cerebro de larva 3 de *Drosophila melanogaster*

Con la finalidad de analizar la cantidad de cohesinas presentes en la cromatina en ausencia total de Haspin decidimos realizar el análisis en cerebros de larva 3 de *Drosophila melanogaster*. Ya que la línea mutante *Haspin*¹²⁸ nos proporciona el análisis en una condición totalmente nula para Haspin a diferencia del análisis en células Kc167 donde la condición mutante se obtiene mediante reducción de la expresión con RNAi.

La inmunoprecipitación de SA de cromatina procedente de cerebros de larva 3 de la línea *w*¹¹⁸ como control y *Haspin*¹²⁸ como mutante fue analizada mediante q-PCR. En este caso la selección de las regiones dónde analizar la presencia de nuestra proteína de estudio era más complicada ya que no teníamos conocimiento del perfil de unión de SA en la cromatina de cerebros de larva 3 de *Drosophila melanogaster*. Por ese motivo realizamos un primer análisis en cerebros de la línea *w*¹¹⁸ de varias regiones representativas según el análisis por ChIP-seq en Kc167. Las regiones analizadas fueron *pnt*, *shn*, *Moesin* (*Moe*) y *torso* (*tor*). Donde las tres primeras son regiones ricas en SA y la cuarta no en Kc167.

En ese primer análisis en la línea control observamos que la presencia de las regiones *pnt*, *Moe* estaba a los mismos niveles que *tor*, de tal manera que descartamos la presencia de SA en la cromatina de cerebros. Por lo contrario, *shn* si se encontraba enriquecida, de tal manera que decidimos analizar si existían diferencias en la cantidad de SA en esta región ante la falta de Haspin. Tal como se observa en la figura 41, existe un ligero aumento de SA estadísticamente significativo ante la falta de Haspin.

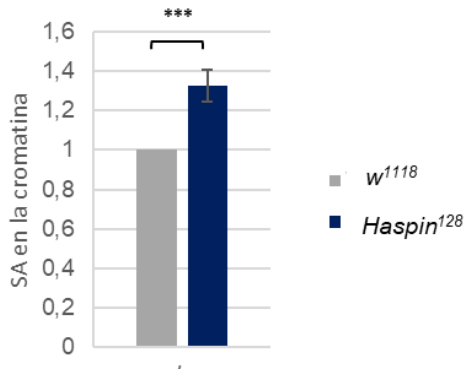


Figura 41. La presencia de SA aumenta en la región *shn* en ausencia de Haspin en cerebro de larva de *Drosophila melanogaster*. Análisis mediante ChIP-qPCR inmunoprecipitando con el anticuerpo SA. El gráfico representa la frecuencia de inmunoprecipitación de *shn* normalizadas con el input. Los datos son la media de tres experimentos independientes. Donde *** $p < 0,001$ según el test t de Student.

4.2.4.3.3. Análisis de las Cohesinas presentes en la cromatina de embriones de *Drosophila melanogaster*

En este caso utilizamos la línea que expresa Rad21-myc en un fondo genético mutante para Rad21 (*Vtd^{ex3}*) y purificamos cromatina que analizamos por WB.

El análisis de los datos muestra una disminución estadísticamente significativa de la cantidad de Rad21-myc presente en la cromatina en ausencia de Haspin en embriones de *Drosophila* (Fig. 42).

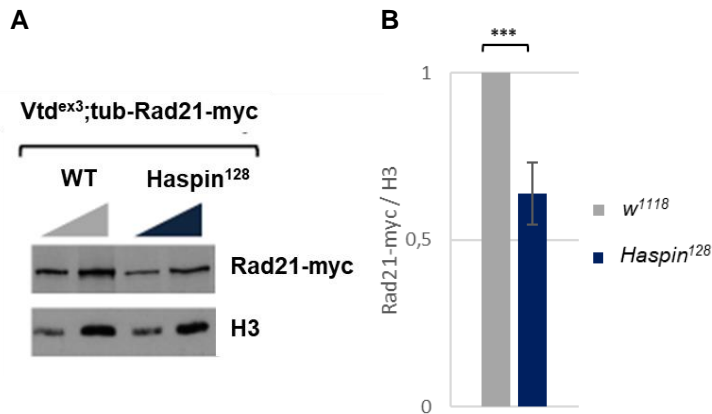


Figura 42. La presencia de Rad21-myc en la cromatina disminuye en ausencia de Haspin. A) Análisis por WB de extractos de cromatina purificada en cantidades crecientes de embriones WT como control y Haspin¹²⁸ como fondo mutante. Las proteínas detectadas son Rad21-myc y H3 como control de carga. B) Gráfica representativa de la cantidad de Rad-21myc normalizado respecto H3 en la cromatina embrionaria control o en el mutante *Haspin¹²⁸*. La barra de error es el error estándar de tres replicados biológicos independientes. *** $p < 0,001$ determinado por el test t de Student.

Los resultados obtenidos en este análisis que engloba el apartado 4.2.4.3. son contradictorios puesto que en embriones la cantidad de cohesinas a nivel global baja, y en regiones concretas en cerebros y Kc167 se observa una ligera subida. Hay que tener en cuenta que los resultados son el análisis de dos proteínas distintas, SA y Rad21, pero los resultados también pueden sugerir que el efecto es distinto en diferentes tejidos o en diferentes momentos del desarrollo o en diferentes tipos de cromatina. Por tanto, podemos concluir que Haspin modula la unión de las cohesinas a la cromatina, pero son necesarios más estudios para determinar como lo hace.

4.2.4.4. Estudio de las interacciones mediadas por las Cohesinas

El papel de las cohesinas durante la interfase, tal y como se ha descrito en la introducción de esta tesis, está involucrado en la formación de *loops* (giros en la cromatina) formando parte así del grupo de proteínas involucradas en la conformación de la estructura 3D de la cromatina. Debido a los efectos que la falta de Haspin provoca en las cohesinas, quisimos analizar si su ausencia altera las conexiones de la cromatina que éstas median.

El estudio de las interacciones específicas de una proteína que se llevan a cabo en el genoma es posible a través de la técnica conocida como Hi-ChIP. Como su nombre indica se trata de la combinación de dos técnicas, el Hi-C y el ChIP-seq. Funcionalmente se trata de analizar las interacciones, como se hace con el ensayo Hi-C, de las regiones específicas dónde la proteína de interés está presente, a través de la inmunoprecipitación de estas, tal cual se hace en el ChIP-seq. En este caso se estudiaron los contactos entre SA. Este experimento se llevó a cabo y se analizó en la Universidad de Emory en Atlanta en 2017 durante mi estancia en el laboratorio del Dr. Víctor Corcés. El experimento se realizó en células Kc167 tratadas con RNAi contra LacZ o contra Haspin para la obtención de la muestra control y *knockdown* de Haspin tal como se ha descrito en experimentos previos. Además, las células utilizadas se encontraban en estado estacionario con la finalidad de evitar cromatina procedente de células mitóticas. Los datos obtenidos con la secuenciación de las muestras fueron tratados para la generación de los mapas de las interacciones que se dan en la célula como por ejemplo las que se observan entre el gen *Malvolio* (*Mvl*) con distintas regiones del cromosoma 3R, que al igual que en este gen, la proteína SA se encuentra posicionada (Fig. 43B). Este gen, situado en 21.050 Kb del cromosoma 3R, interacciona con regiones cercanas, como el gen *Insulin-like receptor* (*InR*), que se encuentra en la posición 21.600 Kb

(amarillo), y con regiones lejanas, como el gen *locomotion defects* (*loco*) separados a unas 1000Kb, ya que se encuentra situado en la posición 22600Kb (negro) (Fig. 43A).

La comparación de los mapas a nivel global muestra un patrón similar en ambas condiciones tal como se observa en los dos mapas superiores de la figura 44. Este resultado indica que las regiones que interaccionan no varían ante la falta de Haspin. Sin embargo, si analizamos la riqueza de los contactos regidos por SA que se dan de manera general en el genoma entre ambas condiciones de estudio observamos que si existen diferencias tal como muestra el mapa de los contactos inferior de la figura 44. Mientras que en la condición control (azul) observamos que existe un mayor número de contactos en las regiones pericentroméricas, en la condición mutante se observan más contactos a lo largo de los brazos de los cromosomas sobre todo en las conexiones intra-TADS. No hay que olvidar que estamos hablando de una técnica analizada por secuenciación y tiene sus limitaciones a la hora de hablar de cantidades, ya que los efectos observados podrían también estar causados por diferencias en la cantidad de las muestras. Sin embargo, el hecho de que unas interacciones suban y otras bajen indica que todos los cambios no son debidos a diferencias en la cantidad de material inicial. Sin embargo, sería necesario realizar experimentos cuantitativos para determinar si Haspin modula las interacciones entre lugares ricos en cohesinas solo en la heterocromatina o en la eucromatina o en ambas.

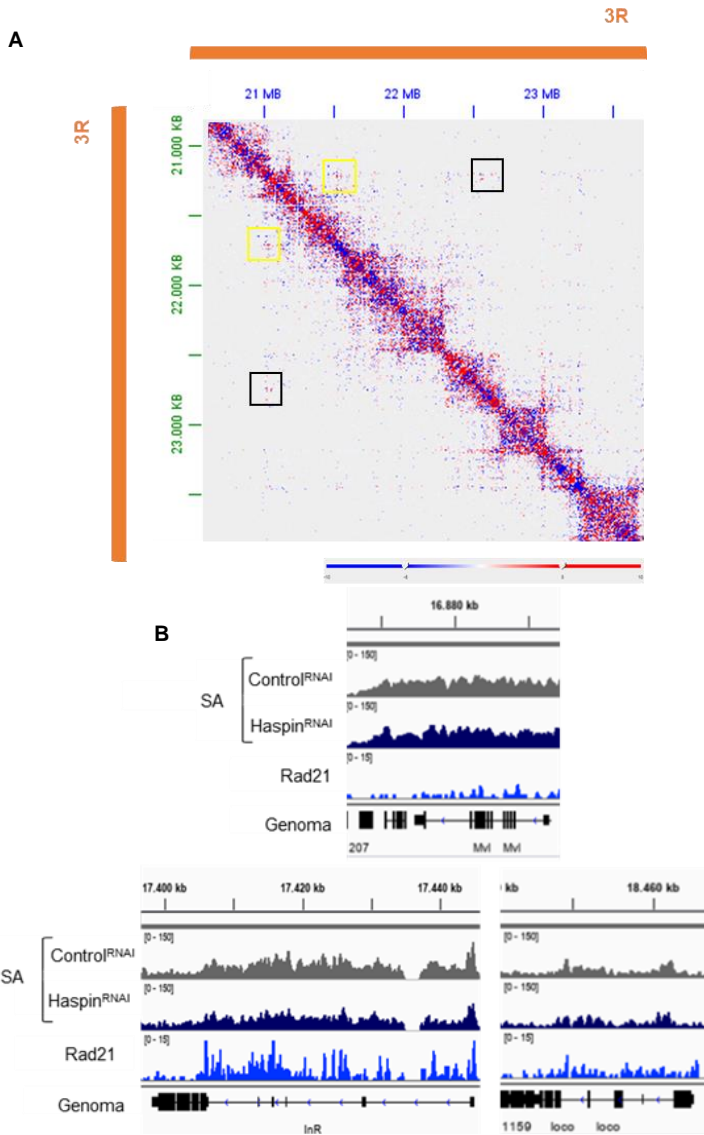


Figura 43. SA está presente en contactos entre regiones de la cromatina próximas y lejanas. Análisis en células Kc167 de *Drosophila* en la condición control (Control^{RNAi}) y mutante (Haspin^{RNAi}). A) Análisis Hi-ChIP del cromosoma 3R de los contactos intracromosómicos que contienen SA (genoma dm6). En azul son los contactos más ricos en la condición control y en rojo la mutante. En amarillo está delimitado el contacto entre *Mvl* y *InR* y en negro el contacto entre *Mvl* y *loco*. B) Imágenes del IGV muestran la presencia de SA (ChIP-seq) en los genes *Mvl*, *InR* y *loco*. Los ChIP-seq (genoma dm3) Control^{RNAi} SA, Haspin^{RNAi} SA están realizados en el laboratorio del Dr. Corcés y Rad21 (GEO database GSM15360009).

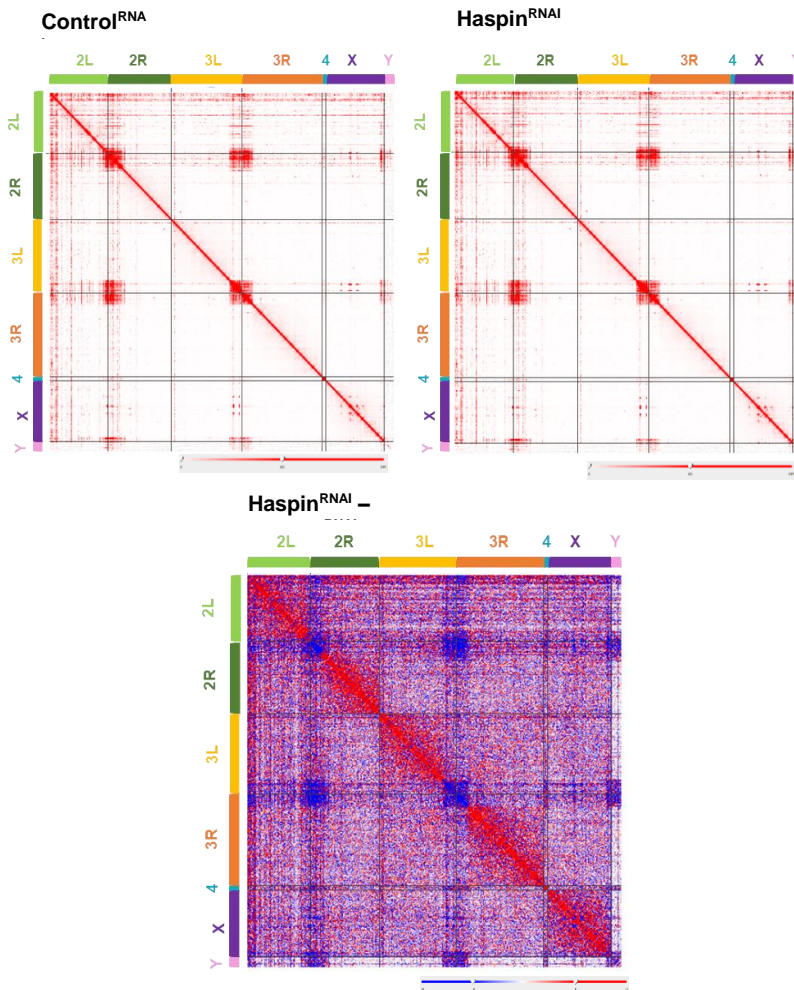


Figura 44. La riqueza de los contactos entre regiones de la cromatina donde SA está presente cambia en ausencia de Haspin en células Kc167. Las imágenes corresponden a la visualización de los contactos generados por SA en todo el genoma obtenidos mediante Hi-ChIP con el anticuerpo α SA. El gráfico superior izquierda corresponde a la condición control ($\text{LacZ}^{\text{RNAi}}$) y el superior derecha a la condición sin Haspin ($\text{Haspin}^{\text{RNAi}}$). El gráfico inferior es el diferencial entre lo observado en el mutante ($\text{Haspin}^{\text{RNAi}}$) menos el control ($\text{LacZ}^{\text{RNAi}}$) donde los puntos azules corresponden a las interacciones que están más enriquecidas en el control mientras que los rojos son las interacciones más enriquecidas en las células $\text{Haspin}^{\text{RNAi}}$.

4.2.5. Estudio de la organización de la heterocromatina en ausencia de Haspin

Debido a que las interacciones con presencia de cohesinas cambian en la cromatina pericentromérica en ausencia de Haspin, decidimos analizar si la proteína Haspin es necesaria para la organización de la heterocromatina en interfase.

Para ello realizamos ensayos de *position-effect variegation* (PEV) en ausencia de Haspin. En estos ensayos utilizamos la línea de *Drosophila melanogaster white-mottled-4* ($In(1)w^{m4}$) en la que el gen *white* se encuentra al lado de la heterocromatina pericentromérica debido a una inversión cromosómica (Vogel et al., 2009). Esto hace que la expresión del gen *white* se encuentre reprimido de manera variegada de manera que la mosca presenta los ojos blancos con puntos rojos, es decir, que solo algunas células expresan *white* mientras que en la mayoría está reprimido por efecto de la heterocromatina cercana (Fig. 45). En ausencia de Haspin, el gen *white* se expresa mucho más indicando que Haspin es un supresor del PEV necesario para la organización de la estructura de la heterocromatina centromérica.

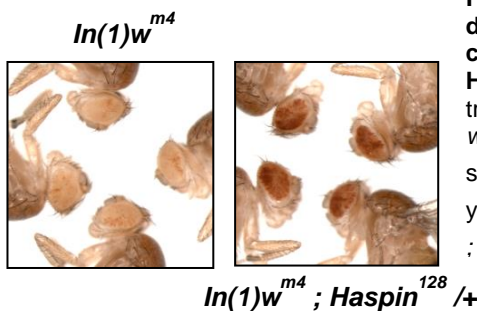


Figura 45. La estructura de la heterocromatina cambia en ausencia de Haspin. Análisis del PEV a través del gen reportero *white*. Las líneas utilizadas son la como control $In(1)w^{m4}$ y la como mutante $In(1)w^{m4}; Haspin^{128}/+$

DISCUSIÓN

5.1. Análisis del papel funcional del complejo *insulator* Ibf-CP190

El complejo formado por las proteínas *insulator* Ibf1 y Ibf2 junto con la proteína accesoria CP190 se descubrió en estudios previos a esta tesis en el laboratorio (Cuartero et al., 2014). El complejo Ibf-CP190 se encuentra situado preferentemente en las regiones reguladoras de genes con promotores alternativos (Cuartero et al., 2014). Este detalle, junto con el hecho de que las proteínas *insulator* intervienen en la regulación de la expresión génica y en la organización genómica en dominios (Ali et al., 2016; Nora et al., 2013; Schwartz and Cavalli, 2017; Sexton et al., 2012) dio pie a la formulación de la hipótesis sobre la posible función reguladora de la expresión de los transcritos de estos genes por parte del complejo Ibf-CP190 y en la que hemos trabajado en este apartado de la tesis. Del conjunto de genes con promotores alternativos decidimos escoger el gen *Abd-B* puesto que se trata un gen muy bien descrito a lo largo del desarrollo de *Drosophila melanogaster*. Este gen, transcribe 4 transcritos que se clasifican en 2 grupos según la proteína que traducen, el A formado por el transcrito A y el B formado por los transcritos B, C y γ (Birkholz et al., 2013) (Fig. 46). La expresión de ambas clases se sitúa en las partes más posteriores del eje anteroposterior, aunque también están involucrados en el desarrollo de órganos de *Drosophila melanogaster* desde la etapa de embrión hasta la adulta (Estrada and Sanchez-Herrero, 2001).

En el estadio embrionario el transcrito del grupo A y la proteína para la que codifica se expresan en la epidermis embrionaria del PS10 al PS13, mientras que el del grupo B y la proteína que codifica lo hace en el PS14 (Boulet et al., 1991) (Fig. 46A). Concretamente, Birkholz et al en 2013 publicó un trabajo sobre la expresión de estos transcritos en embriones de estadio 12 situando los máximos de expresión del A en el PS13 y las del B en el PS14. El motivo por el

que el transcrito A no se expresa en el PS14 se debe a que el B ejerce una función represora sobre el A y evita su expresión (Foronda et al., 2006). Nosotros hemos observado que el patrón del transcrito A se modifica ante la falta del complejo Ibf-CP190, puesto que expande su expresión también al PS14.

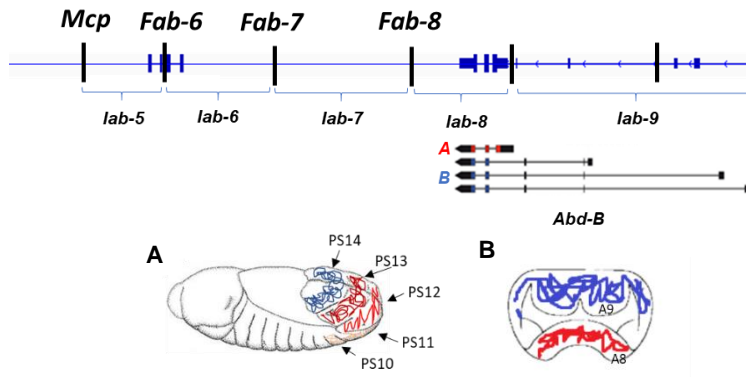


Figura 46. La región reguladora del gen *Abdominal-B*. La región reguladora del gen *Abd-B* está dividida en 5 dominios *iab* (*iab-5*, *iab-6*, *iab-7*, *iab-8* y *iab-9*) separados por regiones *insulators* (*Mcp*, *Fab-6*, *Fab-7*, *Fab-8*). El gen *Abd-B* expresa 4 transcritos distintos que se clasifican en dos grupos el A (rojo) formado por el transcrito A y el B (azul) formado por los transcritos B,C y γ (de arriba a bajo). Estos se expresan de manera diferencial durante el desarrollo de *Drosophila melanogaster*. Debido a la temática de esta tesis mostramos sus expresiones en embrión de estadio 12 (A) y en disco genital masculino (B).

Durante el estadio larvario *Abd-B* se expresa en diversos tejidos, como la epidermis, el sistema digestivo, el disco genital o el sistema nervioso (Birkholz et al., 2013; Coutelis et al., 2013; Gummalla et al., 2014). Los resultados obtenidos en el análisis de la expresión génica de *Abd-B* y de sus transcritos indican que ante la falta de Ibf-CP190 se provoca un leve aumento de la expresión global de ambos tipos de transcritos, A y B, sugiriendo que la falta del complejo *insulator* de estudio afecta a la regulación de ambos transcritos durante el estadio larvario.

La proteína Abd-B es un factor de transcripción con un homeodominio que regula la expresión de diversos genes a lo largo del desarrollo de *Drosophila*. Uno de los procesos en los que se encuentra involucrado es en el giro de la terminalia (genitalia y analia) del macho de *Drosophila*. La correcta expresión del transcrito *A* en el segmento A8 promueve la expresión del gen *myoID* precursor del giro de 360° de la terminalia masculina durante el estadio de pupa (Coutelis et al., 2013; Speder et al., 2006) (Fig. 46B). Nuestro análisis en el disco genital, aunque es preliminar, sugiere que ante la falta del complejo Ibf-CP190 se produce la desregulación espacial del transcrito *A*, ya que este también pasa a expresarse en el primordio A9, donde se expresa el transcrito de la clase *B* en condiciones normales (Foronda et al., 2006). Aunque nuestros resultados indican una actividad cooperativa entre los *insulators* CTCF y Ibf-CP190 que hace más robusta la regulación del giro de la terminalia no lo podemos relacionar con la desregulación de la expresión del transcrito *A* en el disco ante la falta de Ibf-CP190. Esto se debe a que la alteración del giro se produce en ausencia de la expresión del transcrito *A* en el primordio A8 (Coutelis et al., 2013) y el resultado que hemos obtenido en el disco genital parece indicar que esta expresión se mantiene en ausencia de Ibf-CP190, permitiendo así la expresión del gen *myoID* y el correcto desarrollo de la terminalia.

El análisis de la expresión espacial del transcrito *A* tanto en disco como en embrión muestra que en ausencia del complejo Ibf-CP190 la expresión del transcrito *A* se expresa tanto en el PS13 como en el PS14 y en el disco tanto en el primordio A8 como en el A9. Estos resultados indican que el complejo Ibf-CP190 está involucrado en la regulación espacial del transcrito *A*. En condiciones normales los complejos *insulator* se unen a la cromatina regulando la estructura de esta durante la interfase, de esta manera intervienen en la delimitación de la expresión de los genes. En el caso de estos dos

tipos de transcritos, *A* y *B*, se encuentran regulados por diversos elementos reguladores en *cis*- en función del PS (Fig. 47).

En el caso del transcrito *A*, que es el más estudiado, se encuentra regulado por *iab-5*, *iab-6*, *iab-7* y *iab-8* del PS10 al 13 respectivamente (Herold et al., 2012) (Fig. 47) . Y en el caso del transcrito *B*, por el *iab-9* en el PS14 aunque poco se conoce de la regulación de este (Celniker et al., 1990) (Fig. 47).

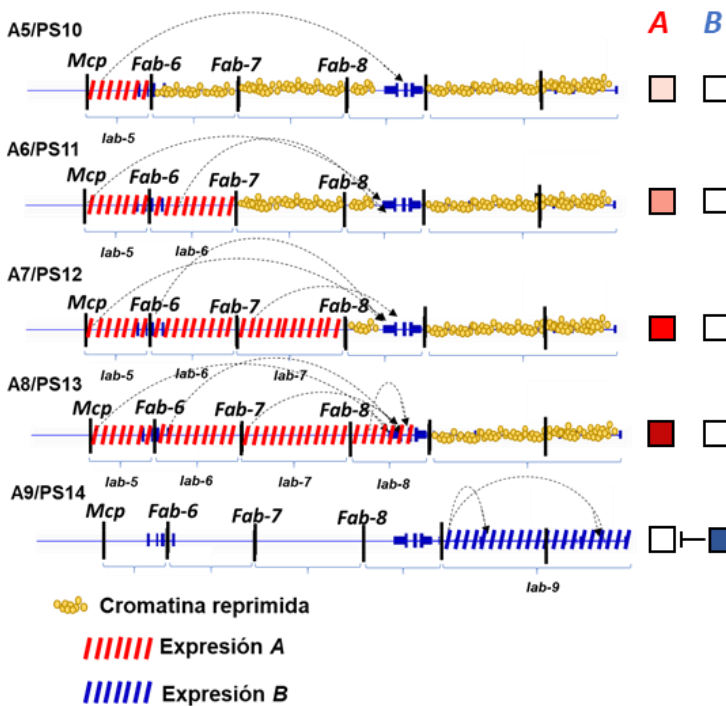


Figura. 47. La regulación de la expresión del gen *Abdominal-B*. El modelo representa la activación secuencial de los dominios regulatorios de la región regulatoria del gen *Abd-B*. En rayas rojas se presenta la expresión del transcrito de la clase A, el de la clase B en rayas azules y la cromatina reprimida en bolitas amarillas. Cada uno de los PS tiene una regulación independiente, en la cual solo aparece el nombre de las regiones que se encuentran activas y se marca con una flecha el contacto de la región reguladora con el promotor pertinente. En los cuadros de la derecha se indican la expresión del transcrito que se observa en cada segmento. En el caso del transcrito A se expresan en todos los segmentos donde el transcrito B no es expresa, teniendo su máximo de expresión en el A8/PS13 (color rojo más intenso). El transcrito B reprime a A por eso no se expresa en el A9/PS14.

Análisis previos a esta tesis en el laboratorio mostraron que el complejo lbf-CP190 se situaba en los distintos *insulators* de *Drosophila melanogaster* y que su ausencia provocaba en hembras la transformación homeótica del segmento A7 (PS12) en el A6 (PS11) debido a una alteración en el *Fab-8* (Cuartero et al., 2014) (Fig. 48).

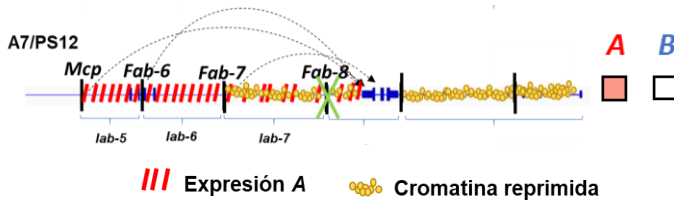


Figura 48. La falta del complejo lbf-CP190 afecta al *Fab8*. La ausencia del complejo lbf-CP190 provoca la transformación del segmento A7 en A6 debido a la disrupción del *Fab-8* (cruz verde). En rayas rojas se presenta la expresión del transcrito de la clase A y la cromatina reprimida en bolitas amarillas. En este PS el transcrito B no se expresa y la expresión del transcrito A es similar a la del A6/PS11 tal como se observa en los cuadros de la derecha debido a la ausencia del complejo lbf-CP190 en el *insulator Fab-8*.

En esta tesis hemos observado que ante la falta del complejo lbf-CP190 el patrón de expresión del transcrito A varía, ya que se extiende a los lugares de expresión del transcrito B. Este resultado puede tener varias explicaciones, en primer lugar, podría ser que debido a la falta del complejo lbf-CP190 en la región reguladora del transcrito B se producen cambios en la estructura de la cromatina impidiendo la transcripción del transcrito B en el PS14 (Fig. 49). El hecho de que el transcrito posterior no se exprese, provocaría que la inhibición de la transcripción de los genes anteriores no se cumpla, permitiendo la expresión del transcrito de la clase A donde el de la clase B.

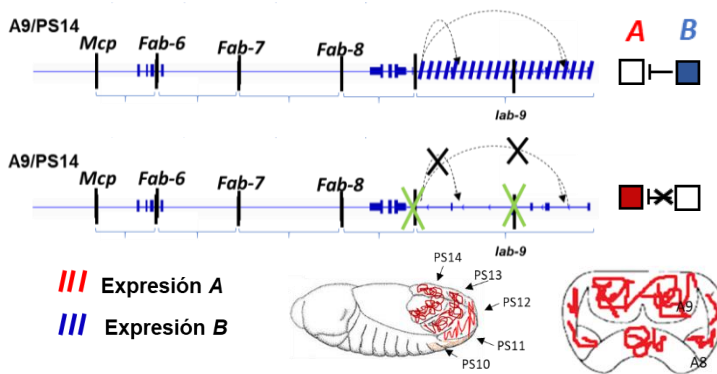


Figura 49. Hipótesis 1. Proponemos un primer modelo en el que la expresión del transcrito A es posible en el PS14 debido a la ausencia de expresión del transcrito B (cruces negras) debido a la inexistencia del complejo Ibf-CP190 en el *insulator* que separan ambos transcritos (cruces verdes). El primer esquema de la región reguladora corresponde a una situación control donde el transcrito B se expresa (cuadros de la derecha). El esquema inferior corresponde a una situación mutante para el complejo Ibf-CP190 donde la expresión del transcrito A es posible debido a la ausencia del B tal como se ve en el cuadro de la derecha y en los modelos inferiores. En rojo se presenta la expresión del transcrito de la clase A y el de la clase B en azul. También se encuentran representadas en el embrión de estadio 12 y en el disco genital masculino su expresión.

La segunda opción podría ser, que ante la falta del complejo los límites entre regiones desaparecen de tal manera que las regiones reguladoras son capaces de regular la expresión del transcrito que suelen regular en condiciones normales y también la expresión del transcrito contrario, es decir, que el *iab-8* es capaz de regular la expresión del transcrito A en algunas células y el B en otras y el *iab-9* también con ambos transcritos (Fig. 50). Así pues, observaríamos la expresión de ambos transcritos en ambos PSs.

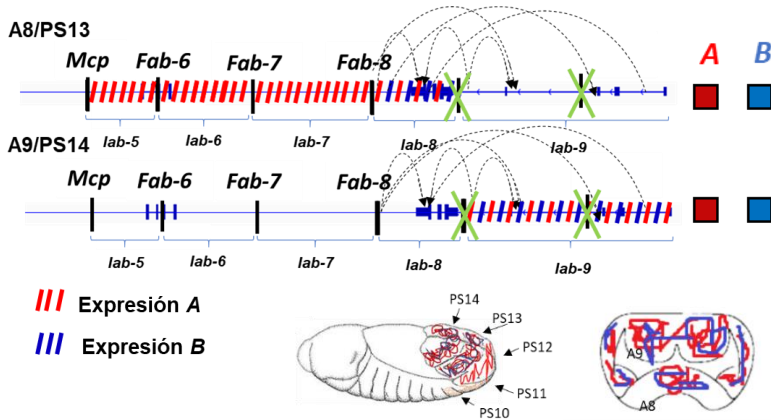


Figura 50. Hipótesis 2. Proponemos un segundo modelo en el que la expresión de ambos transcritos es posible en los PS13 y PS14 causado por la inexistencia del complejo Ibf-CP190 en los *insulator* que separan ambos transcritos (cruces verdes). Su ausencia causa la desaparición de los límites que los separa y provoca la interacción de las secuencias reguladoras de una región y de otra. En rojo se presenta la expresión del transcrito de la clase A y el de la clase B en azul. También se encuentran representadas en el embrión de estadio 12 y en el disco genital masculino su expresión.

En esta tesis no hemos analizado la localización de la expresión del transcrito B mediante la hibridación in situ, pero debido a que observamos que en larva existe un aumento de la expresión de ambos transcritos y que no observamos la transformación de los genitales en pata o en antena ante la falta de la expresión del transcrito B (Foronda et al., 2006), descartamos la primera hipótesis sobre el efecto de la ausencia del complejo Ibf-CP190 sobre la regulación de la expresión de las dos clases de transcritos del gen *Abd-B*. No obstante, sería interesante conocer la localización de la expresión del transcrito del grupo B con la finalidad de dar robusteza a nuestra teoría.

Así pues, en este estudio hemos observado evidencias que indican que el complejo Ibf-CP190 tienen un papel regulatorio en la correcta expresión del transcrito A del gen *Abd-B* de *Drosophila melanogaster*.

5.2. Haspin y su rol como modulador de la organización de la cromatina

Haspin, es la kinasa encargada de la fosforilación H3T3 en *Drosophila melanogaster* tanto en mitosis como en interfase tal como la Dra. Ujué Fresán demostró en su tesis. El estar presente durante la interfase y que sus análisis mostraron que Haspin tiene actividad *enhancer-blocking* motivaron el estudio de esta kinasa como proteína *insulator* y su función en la regulación de la estructura de la cromatina.

A lo largo de esta tesis se han realizado varios análisis de la estructura de la cromatina para analizar la función de Haspin en la regulación de esta. Todos los resultados obtenidos refuerzan nuestra hipótesis de Haspin como kinasa involucrada en la regulación de la estructura de la cromatina, tanto de la heterocromatina como de la eucromatina. A nivel de eucromatina hemos observado cambios en los contactos que se dan entre distintas regiones de la región reguladora del gen *Abd-B*. En cuanto a la heterocromatina vemos efectos causados por la ausencia de Haspin en el *position-effect variegation*.

Una de las posibles vías en las que Haspin podría estar actuando en la regulación de la estructura de la cromatina es mediante las cohesinas. Estas están involucradas en la formación de contactos en la cromatina durante la interfase. En ausencia de Haspin los contactos en la cromatina donde las cohesinas están presentes se mantienen, pero presentan diferencias en la riqueza de los contactos. Concretamente se observa, un mayor enriquecimiento de contactos en las regiones intracromosómicas, mientras que hay una disminución en las pericentroméricas. Este resultado puede ser

debido a tres posibilidades, a que solo cambien uno de los dos tipos de regiones, o las pericentroméricas o las intracromosómicas, o que sea una mezcla de una disminución en las regiones pericentroméricas y un enriquecimiento en las regiones intracromosómicas ante la ausencia de Haspin. No hay que olvidar que las técnicas de análisis por secuenciación no son cuantitativas, por ese motivo, esta diferencia observada es relativa. Las cuantificaciones realizadas en proteínas miembro del complejo central de las cohesinas en regiones eucromáticas muestran que la presencia del complejo central de las cohesinas sube, mientras que en el análisis cuantitativo total disminuyen, sugiriendo que la reducción observada en el total refleja la reducción de la presencia del complejo central de las cohesinas en las zonas pericentroméricas. Teniendo en cuenta que la variabilidad observada en los resultados cuantitativos es posible en el mismo momento en una misma célula refuerza la posibilidad de que distintos tipos de enriquecimiento de contactos también existan. Así pues, con estas evidencias nosotros apostamos por la tercera opción en la que la ausencia de Haspin provoca una disminución en las zonas pericentroméricas y un aumento en las intracromosómicas.

La manera en la que la presencia del complejo central de las cohesinas se puede ver afectada es mediante la relación de Pds5 con Haspin. Durante la interfase Haspin condiciona la presencia de Pds5 en la cromatina interfásica tal como la Dra. Ujué Fresán demostró durante su tesis. La ausencia de Haspin no afecta a la localización del complejo central de las cohesinas en la cromatina, pero si la cantidad que están posicionadas. Este resultado sugiere que tal vez la función de Haspin está relacionada con la deposición, mantenimiento y/o extracción de la cromatina similar a la que tiene Pds5 y no con la localización de las cohesinas en la cromatina, de tal manera que en este caso los cambios serían visibles a nivel cuantitativo. El análisis cuantitativo global realizado en embriones

muestra que en ausencia de Haspin, la proteína Rad21-myc, miembro del complejo central de las cohesinas disminuye su presencia en la cromatina. En cambio, al analizar por ChIP-qPCR en algunas regiones de la cromatina de células Kc167 y cerebro de larva de *Drosophila* observamos que existe un aumento de la presencia de SA, otra proteína del complejo de las cohesinas. Los resultados en este caso son opuestos, pero no hay que obviar distintos factores. En primer lugar, hay que tener en cuenta que los tejidos utilizados aparte de estar formados por células interfásicas también estamos analizando la cromatina de células mitóticas donde sabemos que las cohesinas disminuyen por ausencia de Haspin de tal manera que esos efectos se ven reflejados también en nuestros resultados. En segundo lugar, se ha observado que disminuciones totales en los niveles de Rad21, no reflejan el aumento que si presenta en ciertas regiones específicas, así pues, podríamos estar delante de un mismo caso para ambas proteínas (Pherson et al., 2019). Aunque, también podemos estar delante de una regulación dual en las cohesinas en función de si está posicionadas en la heterocromatina o en la eucromatina por parte de Haspin si tenemos en cuenta que co-inmunoprecipita con Pds5 (Goto et al., 2017). Pds5 en algunos casos ayuda al mantenimiento del complejo en la cromatina y en otros casos interviene en la extracción (Losada et al., 2005; Minamino et al., 2015; Muir et al., 2016; Rowland et al., 2009; Vaur et al., 2012). Si tenemos en cuenta de que Haspin también co-inmunoprecipita Rad21-myc refuerza la relación que existe con las cohesinas y sugiere la posibilidad de la función similar a la de pds5 en la regulación de las cohesinas.

En mamíferos se ha visto que Haspin interviene en la deposición de las cohesinas en los centrómeros a través de su interacción con HP1 durante mitosis (Yi et al., 2018). Así que, si Haspin compite con Wapl no es de extrañar que la ausencia de la kinasa de estudio provoque una disminución del complejo central de las cohesinas en la

heterocromatina en interfase tal como sugieren nuestros resultados. En cuanto a la eucromatina, las cohesinas están relacionadas con otras proteínas involucradas en la regulación de la estructura de la cromatina como lo son las proteínas Polycomb (PcG). Está demostrado que la mutación de Rad21 provoca una disminución de los contactos entre lugares ricos en Pc, en el complejo *invected-engrailed* (Schaaf et al., 2013) y en diferentes loci en células en cultivo después de sufrir un *heatshock* (Li et al., 2015). Además, está descrito que existe una interacción funcional entre el PRC1 y las cohesinas en *Drosophila* ya que tienen una función co-reguladora en los genes activos y antagonista en los genes silenciados por PcG (Schaaf et al., 2013).

En ausencia de Haspin observamos una reducción del *pairing sensitive silencing*, el fenómeno de reforzamiento del silenciamiento provocado por la formación de los *Polycomb bodies* (Pb) debida a la unión de las proteínas PcG que se encuentran unidas a distintos PRE (Ogiyama et al., 2018; Schwartz and Cavalli, 2017). Estos cambios vienen acompañados por un aumento de la expresión del gen *Abd-B* y al aumento de la aparición de transformaciones homeóticas al unir la mutación de Haspin a la de Pc en heterocigosis. Esto puede ser causado por varias razones, por un lado, puede ser provocado por la disminución de Polycomb (Pc) en la cromatina tal como se observa en las zonas analizadas de la región reguladora del gen *Abd-B* debido a que Haspin pueda estar involucrado en su posicionamiento. O, por otro lado, puede ser el efecto de un cambio en la estructura de la cromatina provocada por la ausencia de Haspin, tal como hemos observado en otros análisis de la estructura de la cromatina. No tenemos indicaciones de que Haspin y Pc interaccionen directamente, pero el conjunto de resultados obtenidos en esta tesis podría indicar que Haspin está involucrado en la regulación de la expresión génica mediante la regulación de la estructura de la cromatina a través de las cohesinas. Esto tendría sentido si

relacionamos los resultados obtenidos en los análisis de la cohesinas y de las proteínas PcG, ya que en ausencia de Haspin se provoca un aumento de las cohesinas en la heterocromatina, el cual puede venir acompañado por una mayor retención del PRC1 impidiendo de esta manera el correcto funcionamiento del silenciamiento génico (Schaaf et al., 2013).

Nuestros resultados podrían indicar que Haspin durante la interfase está implicado en la regulación de la estructura de la cromatina a través de la modulación de la presencia de las cohesinas en la cromatina, las cuales son necesarias para el correcto funcionamiento del silenciamiento génico.

CONCLUSIONES

1. El complejo Ibf-CP190 interviene en la regulación de los diferentes transcritos del gen *Abdominal-B* en *Drosophila melanogaster*.
2. El complejo Ibf-CP190 participa en la correcta expresión espacial del transcrito A del gen *Abdominal-B*.
3. El complejo Ibf-CP190 junto con CTCF altera el correcto desarrollo del giro de la terminalia de los machos de *Drosophila* pero esto no parece estar causado por la desregulación del transcrito A del gen *Abdominal-B*.
4. Haspin interviene en la regulación de la estructura de la cromatina de la región reguladora de *Abdominal-B*.
5. Haspin modula la presencia de la proteína Polycomb en la cromatina y es necesaria para el silenciamiento del gen homeótico *Abdominal-B* en *Drosophila melanogaster*.
6. La mutación de Haspin incrementa los fenotipos de transformaciones homeóticas asociados a los complejos de proteínas PcG.
7. Haspin altera el reforzamiento del silenciamiento regulado por las proteínas PcG denominado *pairing sensitive silencing*.
8. La ausencia de Haspin altera el *position-effect variegation* indicando que la estructura de la heterocromatina está desregulada.
9. Haspin modula la dinámica de la asociación de las cohesinas a la cromatina.
10. Las conexiones mediadas por las cohesinas se ven alteradas ante la ausencia de Haspin.

BIBLIOGRAFÍA

- Akasaka, T., van Lohuizen, M., van der Lugt, N., Mizutani-Koseki, Y., Kanno, M., Taniguchi, M., Vidal, M., Alkema, M., Berns, A., and Koseki, H. (2001). Mice doubly deficient for the Polycomb Group genes *Mel18* and *Bmi1* reveal synergy and requirement for maintenance but not initiation of *Hox* gene expression. *Development* *128*, 1587-1597.
- Akbari, O.S., Bousum, A., Bae, E., and Drewell, R.A. (2006). Unraveling cis-regulatory mechanisms at the abdominal-A and Abdominal-B genes in the *Drosophila* bithorax complex. *Developmental biology* *293*, 294-304.
- Ali, T., Renkawitz, R., and Bartkuhn, M. (2016). Insulators and domains of gene expression. *Curr Opin Genet Dev* *37*, 17-26.
- Bantignies, F., and Cavalli, G. (2011). Polycomb group proteins: repression in 3D. *Trends Genet* *27*, 454-464.
- Bantignies, F., Grimaud, C., Lavrov, S., Gabut, M., and Cavalli, G. (2003). Inheritance of Polycomb-dependent chromosomal interactions in *Drosophila*. *Genes & development* *17*, 2406-2420.
- Barges, S., Mihaly, J., Galloni, M., Hagstrom, K., Muller, M., Shanower, G., Schedl, P., Gyurkovics, H., and Karch, F. (2000). The Fab-8 boundary defines the distal limit of the bithorax complex *iab-7* domain and insulates *iab-7* from initiation elements and a PRE in the adjacent *iab-8* domain. *Development* *127*, 779-790.
- Barkess, G., and West, A.G. (2012). Chromatin insulator elements: establishing barriers to set heterochromatin boundaries. *Epigenomics* *4*, 67-80.
- Bartkuhn, M., Straub, T., Herold, M., Herrmann, M., Rathke, C., Saumweber, H., Gilfillan, G.D., Becker, P.B., and Renkawitz, R. (2009). Active promoters and insulators are marked by the centrosomal protein 190. *EMBO J* *28*, 877-888.
- Belton, J.M., McCord, R.P., Gibcus, J.H., Naumova, N., Zhan, Y., and Dekker, J. (2012). Hi-C: a comprehensive technique to capture the conformation of genomes. *Methods* *58*, 268-276.
- Birkholz, O., Vef, O., Rogulja-Ortmann, A., Berger, C., and Technau, G.M. (2013). Abdominal-B and caudal inhibit the formation of specific neuroblasts in the *Drosophila* tail region. *Development* *140*, 3552-3564.
- Blackledge, N.P., Rose, N.R., and Klose, R.J. (2015). Targeting Polycomb systems to regulate gene expression: modifications to a complex story. *Nature reviews Molecular cell biology* *16*, 643-649.
- Bonev, B., and Cavalli, G. (2016). Organization and function of the 3D genome. *Nat Rev Genet* *17*, 772.
- Boros, I.M. (2012). Histone modification in *Drosophila*. *Brief Funct Genomics* *11*, 319-331.
- Boulet, A.M., Lloyd, A., and Sakonju, S. (1991). Molecular definition of the morphogenetic and regulatory functions and the cis-regulatory elements of the *Drosophila* *Abd-B* homeotic gene. *Development* *111*, 393-405.
- Brown, J.L., Sun, M.A., and Kassisi, J.A. (2018). Global changes of H3K27me3 domains and Polycomb group protein distribution in the absence of recruiters *Spps* or *Pho*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *115*, E1839-E1848.
- Canudas, S., Perez, S., Fanti, L., Pimpinelli, S., Singh, N., Hanes, S.D., Azorin, F., and Espinas, M.L. (2005). *dSAP18* and *dHDAC1* contribute to the functional regulation of the *Drosophila* *Fab-7* element. *Nucleic acids research* *33*, 4857-4864.

- Cao, R., Wang, L., Wang, H., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Jones, R.S., and Zhang, Y. (2002). Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* *298*, 1039-1043.
- Casanova, J., Sanchez-Herrero, E., and Morata, G. (1986). Identification and characterization of a parasegment specific regulatory element of the abdominal-B gene of *Drosophila*. *Cell* *47*, 627-636.
- Casares, F., Sanchez, L., Guerrero, I., and Sanchez-Herrero, E. (1997). The genital disc of *Drosophila melanogaster*. : I. Segmental and compartmental organization. *Dev Genes Evol* *207*, 216-228.
- Cavalli, G., and Paro, R. (1998). The *Drosophila* Fab-7 chromosomal element conveys epigenetic inheritance during mitosis and meiosis. *Cell* *93*, 505-518.
- Celniker, S.E., Keelan, D.J., and Lewis, E.B. (1989). The molecular genetics of the bithorax complex of *Drosophila*: characterization of the products of the Abdominal-B domain. *Genes & development* *3*, 1424-1436.
- Celniker, S.E., Sharma, S., Keelan, D.J., and Lewis, E.B. (1990). The molecular genetics of the bithorax complex of *Drosophila*: cis-regulation in the Abdominal-B domain. *EMBO J* *9*, 4277-4286.
- Cheutin, T., and Cavalli, G. (2018). Loss of PRC1 induces higher-order opening of Hox loci independently of transcription during *Drosophila* embryogenesis. *Nature communications* *9*, 3898.
- Coutelis, J.B., Geminard, C., Speder, P., Suzanne, M., Petzoldt, A.G., and Noselli, S. (2013). *Drosophila* left/right asymmetry establishment is controlled by the Hox gene abdominal-B. *Dev Cell* *24*, 89-97.
- Cuartero, S., Fresan, U., Reina, O., Planet, E., and Espinas, M.L. (2014). Ibf1 and Ibf2 are novel CP190-interacting proteins required for insulator function. *EMBO J* *33*, 637-647.
- Cubenas-Potts, C., and Corces, V.G. (2015). Architectural proteins, transcription, and the three-dimensional organization of the genome. *FEBS letters* *589*, 2923-2930.
- Czermin, B., Melfi, R., McCabe, D., Seitz, V., Imhof, A., and Pirrotta, V. (2002). *Drosophila* enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell* *111*, 185-196.
- Dai, J., Sullivan, B.A., and Higgins, J.M. (2006). Regulation of mitotic chromosome cohesion by Haspin and Aurora B. *Dev Cell* *11*, 741-750.
- Dai, J., Sultan, S., Taylor, S.S., and Higgins, J.M. (2005). The kinase haspin is required for mitotic histone H3 Thr 3 phosphorylation and normal metaphase chromosome alignment. *Genes & development* *19*, 472-488.
- De Antoni, A., Maffini, S., Knapp, S., Musacchio, A., and Santaguida, S. (2012). A small-molecule inhibitor of Haspin alters the kinetochore functions of Aurora B. *The Journal of cell biology* *199*, 269-284.
- de Napoles, M., Mermoud, J.E., Wakao, R., Tang, Y.A., Endoh, M., Appanah, R., Nesterova, T.B., Silva, J., Otte, A.P., Vidal, M., *et al.* (2004). Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation. *Dev Cell* *7*, 663-676.

- Dixon, J.R., Selvaraj, S., Yue, F., Kim, A., Li, Y., Shen, Y., Hu, M., Liu, J.S., and Ren, B. (2012). Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature* *485*, 376-380.
- Dorsett, D. (2009). Cohesin, gene expression and development: lessons from *Drosophila*. *Chromosome Res* *17*, 185-200.
- Dorsett, D., Eissenberg, J.C., Misulovin, Z., Martens, A., Redding, B., and McKim, K. (2005). Effects of sister chromatid cohesion proteins on cut gene expression during wing development in *Drosophila*. *Development* *132*, 4743-4753.
- Dorsett, D., and Merckenschlager, M. (2013). Cohesin at active genes: a unifying theme for cohesin and gene expression from model organisms to humans. *Curr Opin Cell Biol* *25*, 327-333.
- Duncan, I. (1987). The bithorax complex. *Annual review of genetics* *21*, 285-319.
- Estrada, B., Casares, F., and Sanchez-Herrero, E. (2003). Development of the genitalia in *Drosophila melanogaster*. *Differentiation* *71*, 299-310.
- Estrada, B., and Sanchez-Herrero, E. (2001). The Hox gene Abdominal-B antagonizes appendage development in the genital disc of *Drosophila*. *Development* *128*, 331-339.
- Eswaran, J., Patnaik, D., Filippakopoulos, P., Wang, F., Stein, R.L., Murray, J.W., Higgins, J.M., and Knapp, S. (2009). Structure and functional characterization of the atypical human kinase haspin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *106*, 20198-20203.
- Filion, G.J., van Bommel, J.G., Braunschweig, U., Talhout, W., Kind, J., Ward, L.D., Brugman, W., de Castro, I.J., Kerkhoven, R.M., Bussemaker, H.J., *et al.* (2010). Systematic protein location mapping reveals five principal chromatin types in *Drosophila* cells. *Cell* *143*, 212-224.
- Fischle, W., Wang, Y., Jacobs, S.A., Kim, Y., Allis, C.D., and Khorasanizadeh, S. (2003). Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. *Genes & development* *17*, 1870-1881.
- Foronda, D., Estrada, B., de Navas, L., and Sanchez-Herrero, E. (2006). Requirement of Abdominal-A and Abdominal-B in the developing genitalia of *Drosophila* breaks the posterior downregulation rule. *Development* *133*, 117-127.
- Francis, N.J., and Kingston, R.E. (2001). Mechanisms of transcriptional memory. *Nature reviews Molecular cell biology* *2*, 409-421.
- Francis, N.J., Kingston, R.E., and Woodcock, C.L. (2004). Chromatin compaction by a polycomb group protein complex. *Science* *306*, 1574-1577.
- Fudenberg, G., Imakaev, M., Lu, C., Goloborodko, A., Abdennur, N., and Mirny, L.A. (2016). Formation of Chromosomal Domains by Loop Extrusion. *Cell Rep* *15*, 2038-2049.
- Gambetta, M.C., and Furlong, E.E.M. (2018). The Insulator Protein CTCF Is Required for Correct Hox Gene Expression, but Not for Embryonic Development in *Drosophila*. *Genetics* *210*, 129-136.
- Gandhi, R., Gillespie, P.J., and Hirano, T. (2006). Human Wapl is a cohesin-binding protein that promotes sister-chromatid resolution in mitotic prophase. *Current biology : CB* *16*, 2406-2417.
- Gaul, U., and Jackle, H. (1989). Analysis of maternal effect mutant combinations elucidates regulation and function of the overlap of hunchback and Kruppel gene expression in the *Drosophila* blastoderm embryo. *Development* *107*, 651-662.

Gerasimova, T.I., Lei, E.P., Bushey, A.M., and Corces, V.G. (2007). Coordinated control of dCTCF and gypsy chromatin insulators in *Drosophila*. *Molecular cell* **28**, 761-772.

Ghenoiu, C., Wheelock, M.S., and Funabiki, H. (2013). Autoinhibition and Polo-dependent multisite phosphorylation restrict activity of the histone H3 kinase Haspin to mitosis. *Molecular cell* **52**, 734-745.

Giancotti, V., Russo, E., de Cristini, F., Graziosi, G., Micali, F., and Crane-Robinson, C. (1984). Histone modification in early and late *Drosophila* embryos. *The Biochemical journal* **218**, 321-329.

Goto, Y., Yamagishi, Y., Shintomi-Kawamura, M., Abe, M., Tanno, Y., and Watanabe, Y. (2017). Pds5 Regulates Sister-Chromatid Cohesion and Chromosome Bi-orientation through a Conserved Protein Interaction Module. *Current biology : CB* **27**, 1005-1012.

Guacci, V., Koshland, D., and Strunnikov, A. (1997). A direct link between sister chromatid cohesion and chromosome condensation revealed through the analysis of MCD1 in *S. cerevisiae*. *Cell* **91**, 47-57.

Gummalla, M., Galetti, S., Maeda, R.K., and Karch, F. (2014). Hox gene regulation in the central nervous system of *Drosophila*. *Front Cell Neurosci* **8**, 96.

Haarhuis, J.H., and Rowland, B.D. (2017). Cohesin: building loops, but not compartments. *EMBO J* **36**, 3549-3551.

Hagstrom, K., Muller, M., and Schedl, P. (1996). Fab-7 functions as a chromatin domain boundary to ensure proper segment specification by the *Drosophila* bithorax complex. *Genes & development* **10**, 3202-3215.

Hara, K., Zheng, G., Qu, Q., Liu, H., Ouyang, Z., Chen, Z., Tomchick, D.R., and Yu, H. (2014). Structure of cohesin subcomplex pinpoints direct shugoshin-Wapl antagonism in centromeric cohesion. *Nat Struct Mol Biol* **21**, 864-870.

Henriques, T., Scruggs, B.S., Inouye, M.O., Muse, G.W., Williams, L.H., Burkholder, A.B., Lavender, C.A., Fargo, D.C., and Adelman, K. (2018). Widespread transcriptional pausing and elongation control at enhancers. *Genes & development* **32**, 26-41.

Herold, M., Bartkuhn, M., and Renkawitz, R. (2012). CTCF: insights into insulator function during development. *Development* **139**, 1045-1057.

Higgins, J.M. (2001). Haspin-like proteins: a new family of evolutionarily conserved putative eukaryotic protein kinases. *Protein science : a publication of the Protein Society* **10**, 1677-1684.

Higgins, J.M. (2003). Structure, function and evolution of haspin and haspin-related proteins, a distinctive group of eukaryotic protein kinases. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **60**, 446-462.

Holohan, E.E., Kwong, C., Adryan, B., Bartkuhn, M., Herold, M., Renkawitz, R., Russell, S., and White, R. (2007). CTCF genomic binding sites in *Drosophila* and the organisation of the bithorax complex. *PLoS genetics* **3**, e112.

Hou, C., Li, L., Qin, Z.S., and Corces, V.G. (2012). Gene density, transcription, and insulators contribute to the partition of the *Drosophila* genome into physical domains. *Molecular cell* **48**, 471-484.

Iampietro, C., Cleard, F., Gyurkovics, H., Maeda, R.K., and Karch, F. (2008). Boundary swapping in the *Drosophila* Bithorax complex. *Development* **135**, 3983-3987.

- Isono, K., Fujimura, Y., Shinga, J., Yamaki, M., J, O.W., Takihara, Y., Murahashi, Y., Takada, Y., Mizutani-Koseki, Y., and Koseki, H. (2005). Mammalian polyhomeotic homologues Phc2 and Phc1 act in synergy to mediate polycomb repression of Hox genes. *Mol Cell Biol* 25, 6694-6706.
- Kagey, M.H., Newman, J.J., Bilodeau, S., Zhan, Y., Orlando, D.A., van Berkum, N.L., Ebmeier, C.C., Goossens, J., Rahl, P.B., Levine, S.S., *et al.* (2010). Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature* 467, 430-435.
- Kahn, T.G., Dorafshan, E., Schultheis, D., Zare, A., Stenberg, P., Reim, I., Pirrotta, V., and Schwartz, Y.B. (2016). Interdependence of PRC1 and PRC2 for recruitment to Polycomb Response Elements. *Nucleic acids research* 44, 10132-10149.
- Kahn, T.G., Schwartz, Y.B., Dellino, G.I., and Pirrotta, V. (2006). Polycomb complexes and the propagation of the methylation mark at the *Drosophila* *ubx* gene. *The Journal of biological chemistry* 281, 29064-29075.
- Kang, H., McElroy, K.A., Jung, Y.L., Alekseyenko, A.A., Zee, B.M., Park, P.J., and Kuroda, M.I. (2015). Sex comb on midleg (*Scm*) is a functional link between PcG-repressive complexes in *Drosophila*. *Genes & development* 29, 1136-1150.
- Kharchenko, P.V., Alekseyenko, A.A., Schwartz, Y.B., Minoda, A., Riddle, N.C., Ernst, J., Sabo, P.J., Larschan, E., Gorchakov, A.A., Gu, T., *et al.* (2011). Comprehensive analysis of the chromatin landscape in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 471, 480-485.
- Kassis, J.A., Kennison, J.A., and Tamkun, J.W. (2017). Polycomb and Trithorax Group Genes in *Drosophila*. *Genetics* 206, 1699-1725.
- Kassis, J.A., VanSickle, E.P., and Sensabaugh, S.M. (1991). A fragment of engrailed regulatory DNA can mediate transvection of the white gene in *Drosophila*. *Genetics* 128, 751-761.
- Keisman, E.L., Christiansen, A.E., and Baker, B.S. (2001). The sex determination gene *doublesex* regulates the A/P organizer to direct sex-specific patterns of growth in the *Drosophila* genital imaginal disc. *Dev Cell* 1, 215-225.
- Kerppola, T.K. (2009). Polycomb group complexes--many combinations, many functions. *Trends in cell biology* 19, 692-704.
- Kidder, B.L., Hu, G., and Zhao, K. (2011). ChIP-Seq: technical considerations for obtaining high-quality data. *Nat Immunol* 12, 918-922.
- Klymenko, T., Papp, B., Fischle, W., Kocher, T., Schelder, M., Fritsch, C., Wild, B., Wilm, M., and Muller, J. (2006). A Polycomb group protein complex with sequence-specific DNA-binding and selective methyl-lysine-binding activities. *Genes & development* 20, 1110-1122.
- Kueng, S., Hegemann, B., Peters, B.H., Lipp, J.J., Schleiffer, A., Mechtler, K., and Peters, J.M. (2006). Wapl controls the dynamic association of cohesin with chromatin. *Cell* 127, 955-967.
- Kyrchanova, O., and Georgiev, P. (2014). Chromatin insulators and long-distance interactions in *Drosophila*. *FEBS letters* 588, 8-14.
- Kyrchanova, O., Toshchakov, S., Podstreshnaya, Y., Parshikov, A., and Georgiev, P. (2008). Functional interaction between the Fab-7 and Fab-8 boundaries and the upstream promoter region in the *Drosophila* *Abd-B* gene. *Mol Cell Biol* 28, 4188-4195.
- Levine, S.S., King, I.F., and Kingston, R.E. (2004). Division of labor in polycomb group repression. *Trends in biochemical sciences* 29, 478-485.

Lewis, E.B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276, 565-570.

Li, H.B., Muller, M., Bahechar, I.A., Kyrchanova, O., Ohno, K., Georgiev, P., and Pirrotta, V. (2011). Insulators, not Polycomb response elements, are required for long-range interactions between Polycomb targets in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* 31, 616-625.

Li, H.B., Ohno, K., Gui, H., and Pirrotta, V. (2013). Insulators target active genes to transcription factories and polycomb-repressed genes to polycomb bodies. *PLoS genetics* 9, e1003436.

Li, L., Lyu, X., Hou, C., Takenaka, N., Nguyen, H.Q., Ong, C.T., Cubenas-Potts, C., Hu, M., Lei, E.P., Bosco, G., *et al.* (2015). Widespread rearrangement of 3D chromatin organization underlies polycomb-mediated stress-induced silencing. *Molecular cell* 58, 216-231.

Liang, C., Chen, Q., Yi, Q., Zhang, M., Yan, H., Zhang, B., Zhou, L., Zhang, Z., Qi, F., Ye, S., *et al.* (2018). A kinase-dependent role for Haspin in antagonizing Wapl and protecting mitotic centromere cohesion. *EMBO Rep* 19, 43-56.

Littau, V.C., Allfrey, V.G., Frenster, J.H., and Mirsky, A.E. (1964). Active and Inactive Regions of Nuclear Chromatin as Revealed by Electron Microscope Autoradiography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 52, 93-100.

Lopez-Serra, L., Lengronne, A., Borges, V., Kelly, G., and Uhlmann, F. (2013). Budding yeast Wapl controls sister chromatid cohesion maintenance and chromosome condensation. *Current biology : CB* 23, 64-69.

Losada, A., Yokochi, T., and Hirano, T. (2005). Functional contribution of Pds5 to cohesin-mediated cohesion in human cells and *Xenopus* egg extracts. *Journal of cell science* 118, 2133-2141.

Loubiere, V., Delest, A., Thomas, A., Bonev, B., Schuettengruber, B., Sati, S., Martinez, A.M., and Cavalli, G. (2016). Coordinate redeployment of PRC1 proteins suppresses tumor formation during *Drosophila* development. *Nature genetics* 48, 1436-1442.

Ma, Z., Li, M., Roy, S., Liu, K.J., Romine, M.L., Lane, D.C., Patel, S.K., and Cai, H.N. (2016). Chromatin boundary elements organize genomic architecture and developmental gene regulation in *Drosophila* Hox clusters. *World J Biol Chem* 7, 223-230.

Maeda, R.K., and Karch, F. (2006). The ABC of the BX-C: the bithorax complex explained. *Development* 133, 1413-1422.

Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T., and Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298, 1912-1934.

Marston, A.L. (2017). Dalmatian: spotting the difference in cohesin protectors. *EMBO J* 36, 1468-1470.

McQuilton, P., St Pierre, S.E., Thurmond, J., and FlyBase, C. (2012). FlyBase 101--the basics of navigating FlyBase. *Nucleic acids research* 40, D706-714.

Michaelis, C., Ciosk, R., and Nasmyth, K. (1997). Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell* 91, 35-45.

Mihaly, J., Barges, S., Sipos, L., Maeda, R., Cleard, F., Hogga, I., Bender, W., Gyrkovics, H., and Karch, F. (2006). Dissecting the regulatory landscape of the Abd-B gene of the bithorax complex. *Development* 133, 2983-2993.

- Miller, L., and Gonzales, F. (1976). The relationship of ribosomal RNA synthesis to the formation of segregated nucleoli and nucleolus-like bodies. *The Journal of cell biology* **71**, 939-949.
- Minamino, M., Ishibashi, M., Nakato, R., Akiyama, K., Tanaka, H., Kato, Y., Negishi, L., Hirota, T., Sutani, T., Bando, M., *et al.* (2015). Esco1 Acetylates Cohesin via a Mechanism Different from That of Esco2. *Current biology* : **CB 25**, 1694-1706.
- Mohan, M., Bartkuhn, M., Herold, M., Philippen, A., Heintz, N., Bardenhagen, I., Leers, J., White, R.A., Renkawitz-Pohl, R., Saumweber, H., *et al.* (2007). The Drosophila insulator proteins CTCF and CP190 link enhancer blocking to body patterning. *EMBO J* **26**, 4203-4214.
- Morey, L., and Helin, K. (2010). Polycomb group protein-mediated repression of transcription. *Trends in biochemical sciences* **35**, 323-332.
- Muir, K.W., Kschonsak, M., Li, Y., Metz, J., Haering, C.H., and Panne, D. (2016). Structure of the Pds5-Sccl Complex and Implications for Cohesin Function. *Cell Rep* **14**, 2116-2126.
- Muller, J., and Bienz, M. (1992). Sharp anterior boundary of homeotic gene expression conferred by the fushi tarazu protein. *EMBO J* **11**, 3653-3661.
- Muller, J., Hart, C.M., Francis, N.J., Vargas, M.L., Sengupta, A., Wild, B., Miller, E.L., O'Connor, M.B., Kingston, R.E., and Simon, J.A. (2002). Histone methyltransferase activity of a Drosophila Polycomb group repressor complex. *Cell* **111**, 197-208.
- Murayama, Y., and Uhlmann, F. (2015). DNA Entry into and Exit out of the Cohesin Ring by an Interlocking Gate Mechanism. *Cell* **163**, 1628-1640.
- Nagaso, H., Murata, T., Day, N., and Yokoyama, K.K. (2001). Simultaneous detection of RNA and protein by in situ hybridization and immunological staining. *J Histochem Cytochem* **49**, 1177-1182.
- Negre, N., Brown, C.D., Shah, P.K., Kheradpour, P., Morrison, C.A., Henikoff, J.G., Feng, X., Ahmad, K., Russell, S., White, R.A., *et al.* (2010). A comprehensive map of insulator elements for the Drosophila genome. *PLoS genetics* **6**, e1000814.
- Nespoli, A., Vercillo, R., di Nola, L., Diani, L., Giannattasio, M., Plevani, P., and Muzi-Falconi, M. (2006). Alk1 and Alk2 are two new cell cycle-regulated haspin-like proteins in budding yeast. *Cell cycle* **5**, 1464-1471.
- Nishiyama, T., Ladurner, R., Schmitz, J., Kreidl, E., Schleiffer, A., Bhaskara, V., Bando, M., Shirahige, K., Hyman, A.A., Mechtler, K., *et al.* (2010). Sororin mediates sister chromatid cohesion by antagonizing Wapl. *Cell* **143**, 737-749.
- Nora, E.P., Dekker, J., and Heard, E. (2013). Segmental folding of chromosomes: a basis for structural and regulatory chromosomal neighborhoods? *Bioessays* **35**, 818-828.
- Nora, E.P., Lajoie, B.R., Schulz, E.G., Giorgetti, L., Okamoto, I., Servant, N., Piolot, T., van Berkum, N.L., Meisig, J., Sedat, J., *et al.* (2012). Spatial partitioning of the regulatory landscape of the X-inactivation centre. *Nature* **485**, 381-385.
- Nothiger, R., Dubendorfer, A., and Epper, F. (1977). Gynandromorphs reveal two separate primordia for male and female genitalia in *Drosophila melanogaster*. *Wilehm Roux Arch Dev Biol* **181**, 367-373.
- O'Keefe, R.T., Henderson, S.C., and Spector, D.L. (1992). Dynamic organization of DNA replication in mammalian cell nuclei: spatially and temporally defined replication of chromosome-specific alpha-satellite DNA sequences. *The Journal of cell biology* **116**, 1095-1110.

- Ocampo-Hafalla, M.T., and Uhlmann, F. (2011). Cohesin loading and sliding. *Journal of cell science* *124*, 685-691.
- Ogiyama, Y., Schuettengruber, B., Papadopoulos, G.L., Chang, J.M., and Cavalli, G. (2018). Polycomb-Dependent Chromatin Looping Contributes to Gene Silencing during *Drosophila* Development. *Molecular cell* *71*, 73-88 e75.
- Ong, C.T., and Corces, V.G. (2014). CTCF: an architectural protein bridging genome topology and function. *Nat Rev Genet* *15*, 234-246.
- Orlando, V. (2003). Polycomb, epigenomes, and control of cell identity. *Cell* *112*, 599-606.
- Ouyang, Z., and Yu, H. (2017). Releasing the cohesin ring: A rigid scaffold model for opening the DNA exit gate by Pds5 and Wapl. *Bioessays* *39*.
- Ouyang, Z., Zheng, G., Tomchick, D.R., Luo, X., and Yu, H. (2016). Structural Basis and IP6 Requirement for Pds5-Dependent Cohesin Dynamics. *Molecular cell* *62*, 248-259.
- Parey, E., and Crombach, A. (2019). Evolution of the *Drosophila melanogaster* Chromatin Landscape and Its Associated Proteins. *Genome Biol Evol* *11*, 660-677.
- Pherson, M., Misulovin, Z., Gause, M., and Dorsett, D. (2019). Cohesin occupancy and composition at enhancers and promoters are linked to DNA replication origin proximity in *Drosophila*. *Genome Res* *29*, 602-612.
- Polioudaki, H., Markaki, Y., Kourmouli, N., Dialynas, G., Theodoropoulos, P.A., Singh, P.B., and Georgatos, S.D. (2004). Mitotic phosphorylation of histone H3 at threonine 3. *FEBS letters* *560*, 39-44.
- Prigent, C., and Dimitrov, S. (2003). Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? *Journal of cell science* *116*, 3677-3685.
- Qian, J., Beullens, M., Lesage, B., and Bollen, M. (2013). Aurora B defines its own chromosomal targeting by opposing the recruitment of the phosphatase scaffold Repo-Man. *Current biology* : *CB* *23*, 1136-1143.
- Qian, J., Lesage, B., Beullens, M., Van Eynde, A., and Bollen, M. (2011). PP1/Repo-man dephosphorylates mitotic histone H3 at T3 and regulates chromosomal aurora B targeting. *Current biology* : *CB* *21*, 766-773.
- Qian, S., Capovilla, M., and Pirrotta, V. (1991). The bx region enhancer, a distant cis-control element of the *Drosophila* Ubx gene and its regulation by hunchback and other segmentation genes. *EMBO J* *10*, 1415-1425.
- Rando, O.J., and Chang, H.Y. (2009). Genome-wide views of chromatin structure. *Annual review of biochemistry* *78*, 245-271.
- Rank, G., Prestel, M., and Paro, R. (2002). Transcription through intergenic chromosomal memory elements of the *Drosophila* bithorax complex correlates with an epigenetic switch. *Mol Cell Biol* *22*, 8026-8034.
- Rao, S.S., Huntley, M.H., Durand, N.C., Stamenova, E.K., Bochkov, I.D., Robinson, J.T., Sanborn, A.L., Machol, I., Omer, A.D., Lander, E.S., *et al.* (2014). A 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping. *Cell* *159*, 1665-1680.
- Ringrose, L., and Paro, R. (2007). Polycomb/Trithorax response elements and epigenetic memory of cell identity. *Development* *134*, 223-232.

- Roig, M.B., Lowe, J., Chan, K.L., Beckouet, F., Metson, J., and Nasmyth, K. (2014). Structure and function of cohesin's Scc3/SA regulatory subunit. *FEBS letters* *588*, 3692-3702.
- Rowland, B.D., Roig, M.B., Nishino, T., Kurze, A., Uluocak, P., Mishra, A., Beckouet, F., Underwood, P., Metson, J., Imre, R., *et al.* (2009). Building sister chromatid cohesion: smc3 acetylation counteracts an antiestablishment activity. *Molecular cell* *33*, 763-774.
- Sanchez-Herrero, E., and Crosby, M.A. (1988). The Abdominal-B gene of *Drosophila melanogaster*: overlapping transcripts exhibit two different spatial distributions. *EMBO J* *7*, 2163-2173.
- Sanchez-Herrero, E., Vernos, I., Marco, R., and Morata, G. (1985). Genetic organization of *Drosophila* bithorax complex. *Nature* *313*, 108-113.
- Savitsky, M., Kim, M., Kravchuk, O., and Schwartz, Y.B. (2016). Distinct Roles of Chromatin Insulator Proteins in Control of the *Drosophila* Bithorax Complex. *Genetics* *202*, 601-617.
- Schaaf, C.A., Misulovin, Z., Gause, M., Koenig, A., Gohara, D.W., Watson, A., and Dorsett, D. (2013). Cohesin and polycomb proteins functionally interact to control transcription at silenced and active genes. *PLoS genetics* *9*, e1003560.
- Schuettengruber, B., Bourbon, H.M., Di Croce, L., and Cavalli, G. (2017). Genome Regulation by Polycomb and Trithorax: 70 Years and Counting. *Cell* *171*, 34-57.
- Schupbach, T., Wieschaus, E., and Nothiger, R. (1978). The embryonic organization of the genital disc studied in genetic mosaics of *Drosophila melanogaster*. *Wilehm Roux Arch Dev Biol* *185*, 249-270.
- Schwartz, Y.B., and Cavalli, G. (2017). Three-Dimensional Genome Organization and Function in *Drosophila*. *Genetics* *205*, 5-24.
- Schwartz, Y.B., Linder-Basso, D., Kharchenko, P.V., Tolstorukov, M.Y., Kim, M., Li, H.B., Gorchakov, A.A., Minoda, A., Shanower, G., Alekseyenko, A.A., *et al.* (2012). Nature and function of insulator protein binding sites in the *Drosophila* genome. *Genome Res* *22*, 2188-2198.
- Sexton, T., and Cavalli, G. (2015). The role of chromosome domains in shaping the functional genome. *Cell* *160*, 1049-1059.
- Sexton, T., Yaffe, E., Kenigsberg, E., Bantignies, F., Leblanc, B., Hoichman, M., Parrinello, H., Tanay, A., and Cavalli, G. (2012). Three-dimensional folding and functional organization principles of the *Drosophila* genome. *Cell* *148*, 458-472.
- Shao, Z., Raible, F., Mollaaghababa, R., Guyon, J.R., Wu, C.T., Bender, W., and Kingston, R.E. (1999). Stabilization of chromatin structure by PRC1, a Polycomb complex. *Cell* *98*, 37-46.
- Shintomi, K., and Hirano, T. (2009). Releasing cohesin from chromosome arms in early mitosis: opposing actions of Wapl-Pds5 and Sgo1. *Genes & development* *23*, 2224-2236.
- Sowpati, D.T., Ramamoorthy, S., and Mishra, R.K. (2015). Expansion of the polycomb system and evolution of complexity. *Mech Dev* *138 Pt 2*, 97-112.
- Speder, P., Adam, G., and Noselli, S. (2006). Type ID unconventional myosin controls left-right asymmetry in *Drosophila*. *Nature* *440*, 803-807.

- Suzanne, M., Petzoldt, A.G., Speder, P., Coutelis, J.B., Steller, H., and Noselli, S. (2010). Coupling of apoptosis and L/R patterning controls stepwise organ looping. *Current biology : CB* *20*, 1773-1778.
- Tanaka, H., Iguchi, N., Nakamura, Y., Kohroki, J., de Carvalho, C.E., and Nishimune, Y. (2001). Cloning and characterization of human haspin gene encoding haploid germ cell-specific nuclear protein kinase. *Mol Hum Reprod* *7*, 211-218.
- Tanaka, H., Yoshimura, Y., Nishina, Y., Nozaki, M., Nojima, H., and Nishimune, Y. (1994). Isolation and characterization of cDNA clones specifically expressed in testicular germ cells. *FEBS letters* *355*, 4-10.
- Tanaka, H., Yoshimura, Y., Nozaki, M., Yomogida, K., Tsuchida, J., Tosaka, Y., Habu, T., Nakanishi, T., Okada, M., Nojima, H., *et al.* (1999). Identification and characterization of a haploid germ cell-specific nuclear protein kinase (Haspin) in spermatid nuclei and its effects on somatic cells. *The Journal of biological chemistry* *274*, 17049-17057.
- Tautz, D. (1988). Regulation of the *Drosophila* segmentation gene hunchback by two maternal morphogenetic centres. *Nature* *332*, 281-284.
- Tedeschi, A., Wutz, G., Huet, S., Jaritz, M., Wuensche, A., Schirghuber, E., Davidson, I.F., Tang, W., Cisneros, D.A., Bhaskara, V., *et al.* (2013). Wapl is an essential regulator of chromatin structure and chromosome segregation. *Nature* *501*, 564-568.
- Tiong, S., Bone, L.M., and Whittle, J.R. (1985). Recessive lethal mutations within the bithorax-complex in *Drosophila*. *Molecular & general genetics : MGG* *200*, 335-342.
- Vagnarelli, P., Ribeiro, S., Sennels, L., Sanchez-Pulido, L., de Lima Alves, F., Verheyen, T., Kelly, D.A., Ponting, C.P., Rappsilber, J., and Earnshaw, W.C. (2011). Repo-Man coordinates chromosomal reorganization with nuclear envelope reassembly during mitotic exit. *Dev Cell* *21*, 328-342.
- Van Bortle, K., and Corces, V.G. (2012). Nuclear organization and genome function. *Annu Rev Cell Dev Biol* *28*, 163-187.
- Van Bortle, K., Nichols, M.H., Li, L., Ong, C.T., Takenaka, N., Qin, Z.S., and Corces, V.G. (2014). Insulator function and topological domain border strength scale with architectural protein occupancy. *Genome Biol* *15*, R82.
- van der Lugt, N.M., Alkema, M., Berns, A., and Deschamps, J. (1996). The Polycomb-group homolog Bmi-1 is a regulator of murine Hox gene expression. *Mech Dev* *58*, 153-164.
- Vaur, S., Feytout, A., Vazquez, S., and Javerzat, J.P. (2012). Pds5 promotes cohesin acetylation and stable cohesin-chromosome interaction. *EMBO Rep* *13*, 645-652.
- Vogel, M.J., Pagie, L., Talhout, W., Nieuwland, M., Kerkhoven, R.M., and van Steensel, B. (2009). High-resolution mapping of heterochromatin redistribution in a *Drosophila* position-effect variegation model. *Epigenetics Chromatin* *2*, 1.
- Waizenegger, I.C., Hauf, S., Meinke, A., and Peters, J.M. (2000). Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase. *Cell* *103*, 399-410.
- Wang, F., Ulyanova, N.P., Daum, J.R., Patnaik, D., Kateneva, A.V., Gorbsky, G.J., and Higgins, J.M. (2012). Haspin inhibitors reveal centromeric functions of Aurora B in chromosome segregation. *The Journal of cell biology* *199*, 251-268.

Wang, F., Ulyanova, N.P., van der Waal, M.S., Patnaik, D., Lens, S.M., and Higgins, J.M. (2011). A positive feedback loop involving Haspin and Aurora B promotes CPC accumulation at centromeres in mitosis. *Current biology* : CB 21, 1061-1069.

Watanabe, Y. (2012). Geometry and force behind kinetochore orientation: lessons from meiosis. *Nature reviews Molecular cell biology* 13, 370-382.

White, R. (2012). Packaging the fly genome: domains and dynamics. *Brief Funct Genomics* 11, 347-355.

Wutz, G., Varnai, C., Nagasaka, K., Cisneros, D.A., Stocsits, R.R., Tang, W., Schoenfelder, S., Jessberger, G., Muhar, M., Hossain, M.J., *et al.* (2017). Topologically associating domains and chromatin loops depend on cohesin and are regulated by CTCF, WAPL, and PDS5 proteins. *EMBO J* 36, 3573-3599.

Xie, J., Wooten, M., Tran, V., Chen, B.C., Pozmanter, C., Symbolon, C., Betzig, E., and Chen, X. (2015). Histone H3 Threonine Phosphorylation Regulates Asymmetric Histone Inheritance in the *Drosophila* Male Germline. *Cell* 163, 920-933.

Xu, C., and Corces, V.G. (2016). Towards a predictive model of chromatin 3D organization. *Semin Cell Dev Biol* 57, 24-30.

Yamagishi, Y., Honda, T., Tanno, Y., and Watanabe, Y. (2010). Two histone marks establish the inner centromere and chromosome bi-orientation. *Science* 330, 239-243.

Yi, Q., Chen, Q., Liang, C., Yan, H., Zhang, Z., Xiang, X., Zhang, M., Qi, F., Zhou, L., and Wang, F. (2018). HP1 links centromeric heterochromatin to centromere cohesion in mammals. *EMBO Rep* 19.

Yoshimura, Y., Tanaka, H., Nozaki, M., Yomogida, K., Yasunaga, T., and Nishimune, Y. (2001). Nested genomic structure of haploid germ cell specific haspin gene. *Gene* 267, 49-54.

Zavortink, M., and Sakonju, S. (1989). The morphogenetic and regulatory functions of the *Drosophila* Abdominal-B gene are encoded in overlapping RNAs transcribed from separate promoters. *Genes & development* 3, 1969-1981.

Zhou, L., Tian, X., Zhu, C., Wang, F., and Higgins, J.M. (2014). Polo-like kinase-1 triggers histone phosphorylation by Haspin in mitosis. *EMBO Rep* 15, 273-281.

Zhou, L., Liang, C., Chen, Q., Zhang, Z., Zhang, B., Yan, H., Qi, F., Zhang, M., Yi, Q., Guan, Y., *et al.* (2017). The N-Terminal Non-Kinase-Domain-Mediated Binding of Haspin to Pds5B Protects Centromeric Cohesion in Mitosis. *Current biology* : CB 27, 992-1004.

