



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOMÉDICAS
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS**

**CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS CODIFICADAS
POR EL GEN *DADD* Y SU POSIBLE INTERACCIÓN CON
DATRX.**

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
BRENDA ARACELI LÓPEZ FALCÓN PIZA**

**TUTOR:
Dr. MARIO ENRIQUE ZURITA ORTEGA, IBT, UNAM.**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
Dr. FÉLIX RECILLAS TARGA, IFC, UNAM.
Dra. LEONOR PÉREZ MARTÍNEZ, IBT, UNAM.**

Cuernavaca, Morelos; Junio de 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS

PDCB/Grad/019/Jur/2016

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACIÓN
ESCOLAR, UNAM
Presente.

Nos permitimos informarle que el Comité Académico de **DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**, en su reunión **383°** celebrada el **24 de Febrero de 2016**, designó el siguiente jurado para examen de **DOCTOR EN CIENCIAS** de **LÓPEZ FALCÓN PIZA BRENDA ARACELI**, con número de cuenta **506021439** con la tesis titulada: **CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS CODIFICADAS POR EL GEN DADD, Y SU POSIBLE INTERACCIÓN CON DATRX**. Dirigida por el **Dr. Mario Enrique Zurita Ortega**.

Presidente: Dra. Diana María Escalante Alcalde
Secretario: Dr. Mario Enrique Zurita Ortega
Vocal: Dr. Armando Aranda Anzaldo
Vocal: Dr. Juan Miranda Ríos
Vocal: **Dra. Rocio Salceda Sacanelles**

El Comité Académico, aprobó que la integración del jurado se realizará a solicitud del alumno, **con cinco sinodales**, en apego a la nueva normatividad, acogiéndose al artículo **QUINTO TRANSITORIO**, con base a lo establecido en el **Artículo 31** del Reglamento General de Estudios de Posgrado.

Atentamente

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cd. Universitaria, a 25 de Febrero de 2016.

DRA. SUSANA BROM KLANNER
RESPONSABLE
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS

DRA. AUREA OROZCO RIVAS
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente alumno

AGRADECIMIENTOS A INSTITUCIONES Y AL COMITÉ TUTORAL

Agradezco al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por el apoyo y facilidades otorgadas para la elaboración de esta Tesis.

A la supervisión de los miembros del Comité Tutorial: Dr. Mario Zurita Ortega, Dra. Viviana Valadez Graham, Dr. Félix Recillas Targa y Dra. Leonor Pérez Martínez.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca (176609) que me fue otorgada para realizar mis estudios.

A la UNAM por los apoyos PAEP 2013 y 2014 que se utilizaron para exponer este trabajo en: el 17º congreso internacional de la Sociedad de Biología del Desarrollo realizado en Cancún, Quintana Roo, México del 15 al 21 de Junio del 2013 y la 73ª reunión anual de la sociedad de Biología del Desarrollo en Seattle, Washington Estados Unidos realizada del 17 al 21 de Julio del 2014.

A la revista "Genesis" (The Journal of Genetics and Development) por el premio que fue otorgado a mi poster durante el 17º congreso internacional de Biología del Desarrollo.

APOYOS ECONÓMICOS

Este trabajo fue financiado por:

- El apoyo 127440 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología otorgado al Dr. Mario Zurita.
- El apoyo 177393 del programa Joven Investigador del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología otorgado a la Dra. Viviana Valadez Graham.
- El apoyo IA200613 del programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la Universidad Nacional Autónoma de México otorgado a la Dra. Viviana Valadez Graham.

Este trabajo de tesis se realizó bajo la Dirección del Dr. Mario Zurita Ortega y la Dra. Viviana Valadez Graham en el Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNAM cubriendo los requisitos del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (PDCB), UNAM con sede en el Centro de Ciencias Genómicas (CCG) de la UNAM.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Mario Zurita Ortega quien como jefe de grupo y tutor principal supervisó el desarrollo y resultados del trabajo experimental. También le agradezco por haberme aceptado para formar parte de su laboratorio y brindarme un espacio y las herramientas necesarias para desarrollar este trabajo.

Agradezco a la Dra. Viviana Valadez Graham por transmitirme su conocimiento y enseñarme a planear, diseñar, elaborar y criticar el trabajo experimental que realicé y plasmé en esta tesis. Así mismo, le agradezco ampliamente por haber supervisado todo mi desempeño en el laboratorio y en todas las actividades que realicé para cubrir los créditos del PDCB. También le agradezco por aportarme sus ideas, estímulo, críticas y orientación fungiendo de esta manera como tutor invitado. Así mismo le agradezco por todo su tiempo y dedicación, que fueron muchas horas en las que me guió para poder realizar este trabajo y sobre todo por las experiencias y aprendizajes que me ha transmitido.

Agradezco a Silvia Meyer Nava por aportar sus resultados de análisis por PCR y de inmunohistoquímica que se encuentran en esta tesis.

Agradezco a Benjamin Hernández Rodríguez por aportar los resultados de análisis filogenético que se encuentran en esta tesis.

Agradezco a Adam Campos y al Dr. Enrique Rudiño por aportar los resultados de la estructura 3D del dominio ADD de la proteína hATRX, dAdd1 y DNMT3L que se encuentran en esta tesis.

Agradezco a la Dra. Viviana Valadez Graham por aportar los resultados del ensayo de β -galactosidasa y CHIP que se encuentran en esta tesis.

Agradezco a la Dra. Martha Vazquez por brindar sus conocimientos para el análisis de los resultados de la cruza de las moscas portadoras de los diferentes alelos reportados en esta tesis.

Agradezco a Juan José Suárez y Angélica Díaz por su valioso apoyo y orientación.

Finalmente, agradezco a todos mis compañeros del laboratorio que de una u otra forma contribuyeron con su tiempo, energía y consejos para el desarrollo de esta tesis.

DEDICATORIAS

A mi hijo Alonso Correa por tu tiempo y por que cada sonrisa tuya me motiva a superarme.

A la memoria de Maria Luisa Falcon Piza.

A mi papá Carlos López y mis hermanos:
Carlos y Sandy.

A Héctor Correa por tu apoyo, comprensión y motivación.

A Rafaela Arizmendi por su apoyo.

RESUMEN

El gen *hATRX* codifica una proteína remodeladora de la cromatina que tiene dos dominios importantes, un dominio helicasa/ATPasa y un dominio compuesto de dos dedos de zinc llamado dominio ADD. El dominio ADD se une a extremos amino de histonas y se ha propuesto que media la unión de hATRX a la cromatina. La proteína homóloga de ATRX en *Drosophila* (XNP/dAtrx) tiene un dominio helicasa/ATPasa conservado pero carece del dominio ADD. En el laboratorio se realizó una búsqueda bioinformática en la base de datos del genoma de *Drosophila melanogaster* y se encontró que el gen anotado como: CG8290 (el cual recientemente ha sido llamado *dadd1* por Alekseyenko y cols. (2014)) codifica 3 proteínas que comparten una región común en el extremo amino terminal que contiene un dominio ADD, el cual se encuentra altamente conservado con respecto al dominio ADD de la proteína hATRX. Lo que es más, el modelaje en 3D de este dominio muestra que la estructura y aminoácidos que median los contactos con el extremo amino de la histona H3 se encuentran altamente conservados. Estas isoformas (dAdd1-a, b y c) son generadas por “splicing” alternativo y se expresan a través de todo el desarrollo de *D. melanogaster*. Utilizando ensayos de pull-down y coinmunoprecipitación (COIP), se determinó que estas proteínas interactúan físicamente con XNP_L/dAtrx_L y HP1a. Lo que es más, la coinmunofluorescencia de los cromosomas politénicos con anticuerpos específicos mostró que estas proteínas colocalizan principalmente en el cromocentro, con XNP_L/dAtrx_L y HP1a, aunque también se observó colocalización en la eucromatina de los brazos cromosomales. Ensayos de CHIP demostraron que estas proteínas se encuentran presentes *in vivo* en las

mismas regiones heterocromáticas. Para determinar si los alelos *xnp/datr*x y *dadd1* interaccionan genéticamente, se realizaron cruces entre moscas portadoras de cada uno de los alelos. Las mutaciones hipomórficas en ambos genes resultan en la generación de masas melanóticas en el organismo. Las isoformas dAdd1-b, c y d tienen dominios extra que sugieren que estas proteínas tienen nuevas funciones adquiridas. Estos resultados sugieren fuertemente que en *Drosophila* el gen *ATRX* sufrió una fisión evolutiva y que las proteínas codificadas por el gen *dadd1* participan junto con las proteínas codificadas por el gen *xnp/datr*x en algunas funciones celulares como el mantenimiento de la heterocromatina.

ABSTRACT

The human *hATR*X gene encodes a chromatin remodeling protein that has two important domains, an helicase/ATPase domain and a domain composed of two zinc fingers called the ADD domain. The ADD domain binds to histone tails and has been proposed to mediate hATR_X binding to chromatin. The putative ATR_X homolog in *Drosophila* (XNP/dAtr_x) has a conserved helicase/ATPase domain but lacks the ADD domain. We performed a bioinformatic search in the data bank of the *Drosophila* genome and found that the annotated gene: CG8290 (very recently the CG8290 annotated gene has been named *dadd1* by Alekseyenko *et al* (2014)) encodes three proteins that share a common region in the amino terminal end that contains an ADD domain highly conserved with the ADD domain of the hATR_X protein. These isoforms (dAdd-a, b and c) are generated by alternative splicing and are expressed throughout the development of *D. melanogaster*. 3D modeling of the domain shows that the structure and aminoacids which mediate the histone tail contacts are highly conserved. We determined using pull-down and coimmunoprecipitation (CoIP) assays that they interact physically with XNP_L/dAtr_{xL} and HP1a. Furthermore coimmunostaining of polytene chromosomes with specific antibodies show that they colocalize mainly in the chromocenter, with XNP_L/dAtr_{xL} and HP1a, although euchromatic localization can also be seen through the chromosome arms. ChIP experiments demonstrate that these proteins are present *in vivo* in the same heterochromatic regions. To determine if the *xnp/datrx* and *dadd1* alleles interact genetically, we performed crosses between them. Hypomorphic mutations in both genes result in the generation of melanotic masses in the

organism. The dAdd1-b, c and d isoforms have extra domains which suggest newly acquired functions. These results strongly support that in *Drosophila* the *ATRX* gene suffered an evolutionary split and that the *dadd1* encoded proteins participate with the *xnp/datr*x encoded proteins in some cellular functions such as heterochromatin maintenance.

INDICE

INTRODUCCIÓN	29
Estructura de la cromatina y complejos remodeladores.....	31
Clasificación de los complejos remodeladores de la cromatina.....	32
ANTECEDENTES	35
La ATPasa ATRX.....	35
El síndrome de α -talasemia con retraso mental ligado al cromosoma X (Síndrome ATR-X).....	37
Características de hATRX.....	38
- Dominio ADD.....	38
- Dominio SNF2.....	40
Isoformas de hATRX.....	40
Relación entre el síndrome ATR-X y la proteína ATRX.....	41
Mutaciones de la proteína hATRX.....	43
Relación de las mutaciones de <i>ATR</i> X con la penetrancia del fenotipo de ATR-X.....	44

Proteínas que interaccionan con ATRX identificadas en humano y ratón.....	46
El Papel de la proteína ATRX en vertebrados.....	49
- ATRX y su papel en el desarrollo embrionario de vertebrados.....	49
- Papel de ATRX en el desarrollo del cerebro.....	51
- Papel de ATRX en el desarrollo del ojo.....	52
- Papel de ATRX en el desarrollo del testículo.....	53
- Las funciones moleculares propuestas para ATRX en el mantenimiento de la estructura de la cromatina.....	54
- ATRX y la deposición de variantes de histonas.....	55
- ATRX y su interacción con la histona H3.3.....	55
- ATRX y su asociación con la macroH2A.....	58
Características y función de XNP/dAtrx en <i>Drosophila sp.</i>	60
- Isoformas de XNP/dAtrx.....	60
- Proteínas con las que interacciona XNP/dAtrx.....	61
- Actividad ATPasa de XNP/dAtrx.....	63

- Papel molecular de XNP/dAtrx en la variegación.....	64
- Papel molecular de XNP/dAtrx en la formación de heterocromatina y eucromatina.....	67
ATRX y cáncer.....	69
<i>Drosophila</i> como modelo de estudio del cáncer.....	71
- Hematopoyesis en <i>Drosophila</i>	73
- Respuesta inmune en <i>Drosophila</i> ante una invasión parasitaria	74
- La hematopoyesis en <i>Drosophila</i> y las vías de señalización que la controlan.....	75
- La vía JAK/STAT en <i>Drosophila</i>	77
- El proceso de diferenciación de lamelocitos, la vía JAK/STAT y su relación con la formación de masas melanóticas.....	84
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	87
OBJETIVO GENERAL.....	91
Objetivos particulares.....	91
MATERIAL Y MÉTODOS.....	93
RESULTADOS.....	121

El dominio ADD de dAtrx está altamente conservado en <i>Drosophila</i> y otros invertebrados.....	121
Las proteínas dAdd1 se expresan a lo largo de todo el desarrollo de <i>Drosophila melanogaster</i> y son proteínas nucleares preferencialmente que pueden unirse a diferentes regiones de la cromatina.....	126
Las proteínas dAdd1 interaccionan directamente con la proteína dAtrx _L	130
<i>dtrx</i> y <i>dadd1</i> interaccionan genéticamente.....	133
Las proteínas dAdd1 colocalizan con HP1a en regiones heterocromáticas y cooperan con dAtrx en el mantenimiento de la heterocromatina pericentromérica.....	138
<i>Su(var)205</i> interacciona genéticamente con <i>dadd1</i> y <i>atrx</i>	144
DISCUSIÓN	145
CONCLUSIONES	153
PERSPECTIVAS	154
LITERATURA CITADA	155
ANEXOS	167

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. La organización del ADN en el núcleo.	30
Figura 2. Las diferentes maneras de remodelaje de la cromatina.	31
Figura 3. Secuencia y características estructurales de la región ATPasa de la familia Snf2.	33
Figura 4. Clasificación de los complejos remodeladores de la cromatina.	35
Figura 5 ATRX es una proteína evolutivamente conservada.	36
Figura 6. Representación de la posición relativa de los dominios dentro de la proteína ATRX.	40
Figura 7. Las mutaciones en <i>ATRX</i> y su relación con la penetrancia del síndrome ATR-X.	46
Figura 8 Vía JAK/STAT en <i>Drosophila sp.</i>	83
Figura 9 Ubicación de los epitopes de anticuerpos contra dAtrx y dAdd1.	98
Figura 10 El dominio ADD de las proteínas hATR _X se encuentra conservado en las proteínas dAdd1 de <i>Drosophila</i>	124
Figura 11 El dominio ADD de ATR _X se encuentra conservado tanto en vertebrados como invertebrados.	125
Figura 12 Las proteínas dAdd1 se expresan a través del desarrollo.	129
Figura 13 Las proteínas dAtrx y dAdd1 interactúan físicamente.	132
Figura 14 Interacción genética entre <i>dadd1</i> y <i>datrx</i>	137
Figura 15 Las proteínas dAdd1 colocalizan en regiones heterocromáticas con HP1a y cooperan con dAtrx en el mantenimiento de la heterocromatina pericentromérica.	143

INDICE DE FIGURAS SUPLEMENTARIAS

Figura S1. Los anticuerpos contra dAdd1 reconocen específicamente a las proteínas dAdd1.	167
Figura S2. El gen <i>atrx</i> sufre un evento de fisión en la clase insecta.	168
Figura S3. Las proteínas dAdd1 se localizan en muchas regiones de la cromatina en los cromosomas politénicos.	169
Figura S4. Los alelos <i>dadd1^{NP1240}</i> y <i>dadd1^{NP0793}</i> son hipomorfos.	170
Figura S5. Las proteínas dAdd1 colocalizan <i>in vivo</i> con dAtr _X y HP1a en algunas regiones de la cromatina.	171
Figure S6. Al comparar la estructura tridimensional del dominio ADD de Add1 y DNMT3L se observa que tienen poca semejanza.	172

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Proteínas con las que interacciona hATRX.....	47
Tabla 2 Proteínas con las que interacciona dAtrx.....	62
Tabla 3 Datos sobre clonación de fragmentos de dAtrx y dAdd1.....	108
Tabla 4 Interacción entre <i>dadd1</i> y <i>atrx</i>	132
Tabla 5 Interacción de <i>Su(var)205</i> con <i>dadd1</i> y <i>atrx</i>	145

LISTA DE ABREVIATURAS

- **α -talasemia** se refiere a una disminución en la producción de cadenas α de la hemoglobina, lo que lleva a la formación de agregados inestables de cadenas β (conocidos como inclusiones HbH) (Gibbons, 2006).
- **ADN:** Ácido desoxiribonucleico.
- **Adf1:** cuyas siglas provienen de su nombre en inglés “Adh transcription factor 1”
- **ALT:** cuyas siglas provienen de su nombre en inglés: “Alternative Lengthening of Telomeres Pathway”.
- **AR:** receptor de andrógenos.
- **ARN:** Ácido ribonucleico.
- **ARNi:** ARN de interferencia. Secuencia de ARN específica para una secuencia de ARN mensajero. Tiene como propósito interferir con la expresión del gen blanco reduciendo los niveles de producción de esa proteína.
- **ATP:** Adenosina trifosfato.
- **ATPasa:** Enzima que hidroliza ATP para realizar su función.
- **ATR-X:** Síndrome de α -talasemia con retraso mental ligado al cromosoma X.
- **ATRX:** Proteína reguladora de la transcripción que contiene un dominio helicasa ATPasa y un dominio ADD. Pertenece a la familia de los remodeladores de la cromatina tipo SWI/SNF. Su nombre hace referencia a que pacientes que presentan el síndrome ATR-X portan mutaciones en esta proteína (Picketts *et al*, 1996).
- **BCL6:** por sus siglas en inglés proto-oncogene B-Cell Lymphoma 6.
- **Bromodominios:** Un bromodominio es un dominio proteico que reconoce residuos de lisina acetilados, como por ejemplo, los residuos de lisina del extremo N-terminal de las histonas. Este reconocimiento suele ser un requisito indispensable y previo para que pueda producirse la asociación proteína-histona y así el reordenamiento de la cromatina. El bromodominio adopta por sí mismo un plegamiento de todo α , que consiste en un conjunto de cuatro hélices alfa (Zeng y Zhou, 2002).
- **ChIP:** por sus siglas en inglés Chromatin immunoprecipitation.
- **CoIP:** Coinmunoprecipitación.
- **Cromodominios.-** Un cromodominio es un dominio proteico de unos 40-50 aminoácidos que es encontrado muy frecuentemente en proteínas relacionadas con el reordenamiento y la manipulación de la cromatina. Este dominio se encuentra altamente conservado tanto en plantas como en animales. En mamíferos, las proteínas que contienen cromodominios están implicadas en la regulación de la expresión génica relacionada con el reordenamiento de la cromatina y la formación de regiones de heterocromatina. Las proteínas que contienen cromodominios también unen

histonas metiladas y aparecen en los complejos de silenciamiento transcripcional mediado por ARN (Jones *et al*, 2000).

- **C-terminal:** Extremo carboxilo terminal de una proteína.
- **CyO:** “Curly of Oster”. Balanceador del cromosoma 2. Homocigo letal, cuyo marcador dominante es *Cy*: Las moscas presentan las alas curvadas hacia arriba (Lindsley y Zimm, 1992).
- **cmi:** cuyas siglas provienen de su nombre en inglés “cara mitad”, también conocido como Lpt
- **dadd1:** gen identificado en el genoma de *Drosophila* como CG8290. Se le ha llamado *dadd1* porque las proteínas a las que codifica contienen un dominio ADD.
- **dAtrx_L:** proteína homóloga a ATRX de *Drosophila* la isoforma larga.
- **dAtrxs:** proteína homóloga a ATRX de *Drosophila* la isoforma corta.
- **DAPI:** DAPI ó (4',6-diamino-2-fenilindol) es un marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas en Adenina y Timina en secuencias de ADN.
- **DAXX:** Proteína cuyo nombre en inglés es “Death domain associated protein”.
- **Dedo de zinc:** Los dedos de zinc son pequeños motivos estructurales de proteínas que pueden coordinar uno o más iones de zinc para ayudar a estabilizar sus pliegues. Se pueden clasificar en diferentes familias estructurales y normalmente funcionan como módulos de interacción que unen el ADN, ARN, proteínas y moléculas pequeñas (Matthews y Sunde, 2002).
- **Dip3:** cuyas siglas provienen de su nombre en inglés “Dorsal interacting protein 3”.
- **DNMT:** DNA metiltransferasas.
- **Dominio ADD:** Dominio conservado en las proteínas ATRX, DNMT3a, DNMT3L
- **Dominio PHD.-** El dedo PHD fue descubierto en 1993 como un motivo Cys4-His-Cys3 en las proteínas HAT3.1 de *Arabidopsis thaliana* tipo “plant homeodomain” (PHD de donde toma su nombre este dominio). Cabe destacar que muchos, si no todos los dedos PHD se encuentran en las proteínas nucleares cuyo sustrato tiende a ser la cromatina (Matthews y Sunde, 2002).
- **Dominios SH2:** El dominio SH2 (del inglés Src Homology 2) es un dominio de proteínas estructuralmente muy conservado en la oncoproteína Src2 y en muchas otras proteínas de transducción de señales intracelulares.
- **Dome:** receptor: Domeless.
- **DREF:** Por sus siglas en inglés “DNA replication related element binding factor”. Factor de transcripción de unión al ADN implicado en el proceso de replicación.
- **DSB:** por sus siglas en inglés “double-strand break”.

- **ECS**: complejo ubiquitina ligasa E3, cuyas siglas provienen de su nombre en inglés: “Elongin-Cullin-SOCS”.
- **EPO**: eritropoyetina.
- **ET**: Proteína cuyas siglas provienen de su nombre en inglés: “Eye transformer”, también llamado latran.
- **EZH2**: Proteína cuyas siglas provienen de su nombre en inglés: “Enhancer of Zeste homolog 2”.
- **G4**: estructura G-cuadruplex.
- **GAL4**: Proteína activadora de la transcripción requerida para la activación de genes *gal* (galactosa).
- **GH**: hormona de crecimiento.
- **GM-CSF**: factor estimulador de colonias de granulocitos-macrofagos.
- **gp130**: Proteína cuyas siglas provienen de su nombre en inglés: Glycoprotein 130 (también se le conoce como gp130, IL6ST, IL6-beta o CD130) es una proteína transmembranal y es miembro de los receptores de citoquinas (Abbas *et al*, 2008).
- **H3.3**: variante de la histona H3 en mamíferos.
- **H3K9me3**: marca epigenética de trimetilación de la lisina 9 en la histona 3.
- **H3K4me0**: Indica que la lisina 4 de la histona 3 está libre de metilación.
- **HP1**: Proteína cuyo nombre proviene de sus siglas en inglés “Heterochromatin Protein 1”.
- **Hh**: cuyas siglas provienen de su nombre en inglés “Hedgehog”.
- **Hira**: Proteína cuyo nombre en inglés es “histone cell cycle regulator”. Es una proteína chaperona de histonas.
- **hop**: cuyas siglas provienen de su nombre en inglés *hopscotch*
- **HSCs**: cuyas siglas provienen de su nombre en inglés “Hematopoietic stem cells”.
- **IL-3, IL-5**: Las interleucinas, son un conjunto de citoquinas que son sintetizadas principalmente por los leucocitos (Abbas *et al*, 2008).
- **Inclusiones HbH**-. Las proteínas β -globinas son capaces de formar los homo tetrámeros (β_4) y estos tetrámeros se llaman hemoglobina H (HbH). Un exceso de HbH en los glóbulos rojos de la sangre conduce a la formación de los cuerpos de inclusión comúnmente observados en pacientes con α -talasemia. Además, los tetrámeros de HbH tienen una marcada discapacidad para transportar oxígeno (Gibbons, 2006).
- **JAK** : cuyas siglas provienen de su nombre en inglés “Janus kinase”.
- **JNK**: quinasas c-Jun N-terminal.
- **kDa**: Kilo Daltones.
- **Ken**: Ken & Barbie es un factor de transcripción de *Drosophila* que tiene tres motivos tipo dedos de zinc CCHH (Lukacsovich *et al*, 2003).
- **MADF**: toman su nombre de las siglas en inglés: “myb/Sant-like”. Los dominios MADF pueden reconocer secuencias repetitivas en el ADN, se sabe que en las proteínas Adf1 (Adh transcription factor 1) y Dip3 (Dorsal interacting protein 3) los dominios MADF dirigen la unión de estos factores

transcripcionales a secuencias promotoras específicas (Bhaskar y Courey, 2002). Aunque existen algunos ejemplos en los cuales los dominios MADF también pueden unirse a proteínas, aparentemente su especificidad depende del punto isoeléctrico del dominio (Maheshwari *et al*, 2008).

- **MeCP2**: Proteína cuyo nombre proviene de sus siglas en inglés: "metil-CpG binding protein 2".
- **MKRS**: Balanceador del cromosoma 3. Homocigo letal, cuyo marcador dominante es *Sb*: "Stubble", donde las moscas presentan quetas cortas en todo el cuerpo (Lindsley y Zimm, 1992).
- **N-terminal**: Extremo amino terminal de una proteína.
- **pb**: Pares de bases.
- **PBS**: Buffer de fosfatos.

- **PCR**: Reacción en cadena de la polimerasa.
- **PEV**: variegación por efecto de la posición
- **PIAS**: por sus siglas en inglés "Protein Inhibitors of Activated STATs".
- **PIC**: análisis proteómicos de segmentos de cromatina.
- **PML**: cuerpos nucleares promielocíticos.
- **pnr**: pannier. Gen que codifica para un factor transcripcional del tipo GATA.

- **Polycomb**: familia de proteínas que participan en el silenciamiento epigenético de ciertos genes.
- **PSC** por sus siglas en inglés: "posterior signaling center".
- **RanBP3**: por sus siglas en inglés "Ran binding protein 3".
- **RHOX5**: Proteína cuyo nombre se conforma de las siglas en inglés: "reproductive homeobox 5".
- **RT-PCR**: del inglés (Reverse transcription polymerase chain reaction) es una variante de PCR donde una hebra de ARN se copia a ADN (ADNc) usando una enzima llamada transcriptasa reversa.

- **S2R+**: línea celular de *Drosophila* aislada de la línea de células Schneider 2 que se encuentra en una etapa embrionaria tardía.
- **SANT**: Dominios conservados que se unen a las colas de histonas o presentan unión al ADN (según su punto isoeléctrico), presentes en proteínas asociadas a complejos remodeladores de la cromatina (SWI/SNF). Su nombre se forma a partir de las siglas de las proteínas en los estos dominios se encontraron por primera vez: Swi3, Ada2, N-Cor y IFIIIB).
- **SMC1 y SMC3**: Cohesinas (SMC1 y SMC3) Proteínas cuyo nombre proviene de las siglas en inglés "Structural Maintenance of Chromosomes". Representan una gran familia de ATPasas que participan en la organización de la cromatina y su dinámica (Nasmyth y Haering (2005).

- **SNF2**: Por sus siglas en inglés "Sucrose Non Fermenting 2" Subfamilia de proteínas que pertenece a la familia SWI/SNF.
- **SOCS** proteínas supresoras de señalización de citoquinas para las cuáles los humanos tienen 8 genes (SOCS1-7 y CIS) (Abbas *et al*, 2008).

- **Sp**: "Sternopleural". Marcador en el cromosoma 2. Homocigo letal. Las moscas presentan quetas extras en la región del esternopleuro (Lindsley y Zimm, 1992).
- **STAT**: por sus siglas en inglés "signal transducer and activator of transcription".
- **SUMO**: por sus siglas en inglés "Small ubiquitin-like modifier".
- **SU(VAR) 3-9**: enzima metiltransferasa de histonas que trimetila la H3 en la lisina 9.
- **SWI/SNF**: Por sus siglas en inglés "Switching-defective/sucrose non-fermenting". Familia de complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP.
- **TM2**: Balanceador del cromosoma 3. Homocigo letal, cuyo marcador dominante es **Ubx**: "Ultrabitorax", donde las moscas presentan una o varias quetas en el alterio (Lindsley y Zimm, 1992).
- **TM3**: Balanceador del cromosoma 3. Homocigo letal, cuyo marcador dominante es **Ser**. "Beaded-Serrate", el cuál se caracteriza porque las moscas presentan las alas quebradas en la punta, en algunos casos está acompañado por "Stubble" (**Sb**) el cual se caracteriza por que las moscas tienen quetas quetas rasuradas y gruesas en el torax (Lindsley y Zimm, 1992).
- **TM6B, Tb**. Balanceador del cromosoma 3. Homocigo letal. Larvas, pupas y adultos son más cortos que los organismos silvestres.
- **TAS-L**: secuencias asociadas a telómeros.
- **TRR**: cuyas siglas provienen de su nombre en inglés "Trithorax-related protein" de la familia de genes de *Drosophila* "monkey King" (mkg).
- **UAS**: "Upstream activating sequence". Secuencia activadora río arriba.
- **Upd**: por sus siglas en inglés "unpaired"
- **W¹¹⁸**: Marcador del cromosoma 1. "White", variante del alelo *w**, donde las moscas presentan ojos blancos (despigmentación) debido a una deleción.
- **WB**: "Western blot".
- **Wild type**: organismo con genotipo silvestre.
- **Wg**: por las siglas en inglés *Wingless*.
- **XNP/dAtrx**: proteína homóloga a ATRX en *Drosophila melanogaster* también llamada XNP (por sus siglas en inglés X-linked nuclear protein).

INTRODUCCIÓN

La información genética que determina las características de cada organismo se encuentra codificada por el ADN, el cual se encuentra empaquetado en la cromatina y dividido en compartimentos en el núcleo de cada una de sus células. El nucleosoma es la unidad fundamental de la cromatina (Kornberg, 1974). El nucleosoma es un octámero proteico que se conforma de 2 moléculas de cada histona canónica (H2A, H2B, H3 y H4), alrededor del cual se enrollan 147pb de ADN [Figura 1a, 1b] (Hargreaves y Crabtree, 2011). Además, la histona H1 promueve una estructura de mayor orden en la compactación de la cromatina, lo cual induce la compactación de los nucleosomas vecinos en una fibra de 11 nm llamada “collar de perlas”. Se sabe muy poco acerca del mecanismo de cómo estas fibras son empacadas posteriormente en el núcleo para formar estructuras de mayor orden [Figura 1c] (Felsenfeld y Groudine, 2003).

La cromatina se caracteriza por ser dinámica, debido a que existe en muchas configuraciones. Históricamente, la cromatina se ha clasificado como eucromatina y heterocromatina. La eucromatina es la cromatina descondensada. Ésta puede encontrarse transcripcionalmente activa o inactiva. La heterocromatina se define como una cromatina altamente compacta y transcripcionalmente silenciada. Ésta a su vez se subdivide en: heterocromatina constitutiva (cromatina donde rara vez ocurre la transcripción genética) y heterocromatina facultativa (cromatina donde la transcripción se reprime durante una etapa específica del ciclo celular o del desarrollo) (Allis *et al*, 2009).

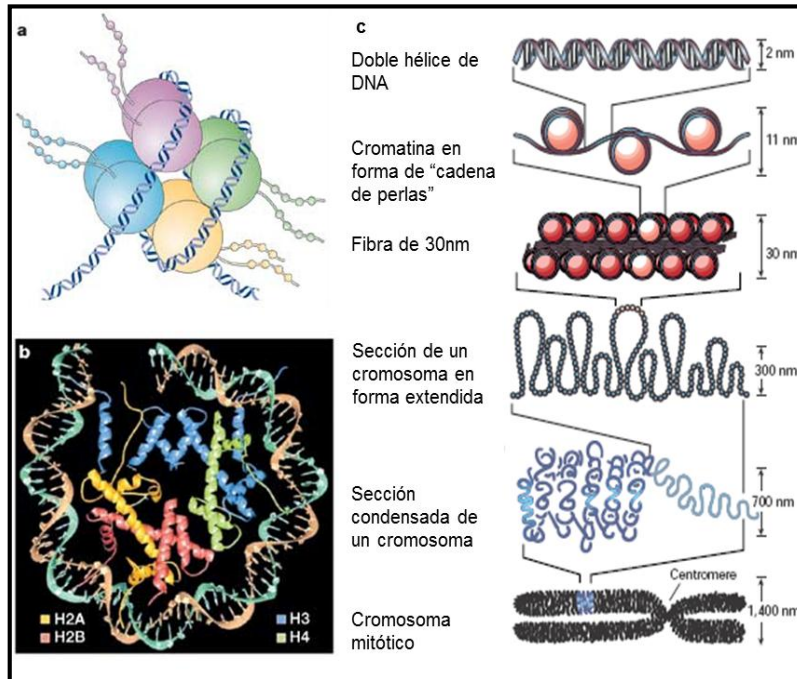


Figura 1. La organización del ADN en el núcleo.

(a) Cada nucleosoma se conforma de un octámero de histonas, el cual se compone de un tetrámero H3-H4 y dos dímeros H2A-H2B. La parte amino terminal de las histonas se proyecta fuera del centro del nucleosoma e interactúa con el ADN. Estas colas pueden ser modificadas postraduccionalmente y funcionar como señalizadoras.

(b) Estructura cristalizada del nucleosoma donde se ve la interacción del ADN con las histonas.

(c) Diferentes niveles de organización del ADN en cromatina.

Imágenes extraídas de (Levenson y Sweatt, 2005) (a y b), Felsenfeld y Groudine, 2003 (c).

El empaquetamiento del genoma eucarionte en cromatina provee la clave para la compactación del genoma entero dentro del núcleo, pero restringe el acceso al ADN de muchas de las proteínas reguladoras esenciales para procesos biológicos como la replicación, transcripción, reparación del ADN y la recombinación. Sin embargo, existen dos mecanismos que pueden neutralizar la naturaleza represiva de la cromatina, permitiendo el acceso al ADN nucleosomal: la modificación de los extremos amino terminal de las histonas y la alteración de la estructura de la cromatina mediante complejos remodeladores y complejos modificadores de nucleosomas (De la Cruz *et al*, 2005).

Estructura de la cromatina y complejos remodeladores

Los complejos remodeladores de la cromatina utilizan la energía del ATP para reestructurar, movilizar y/o expulsar a los nucleosomas a fin de regular el acceso al ADN [Figura 2] (Owen-Hughes, 2003).

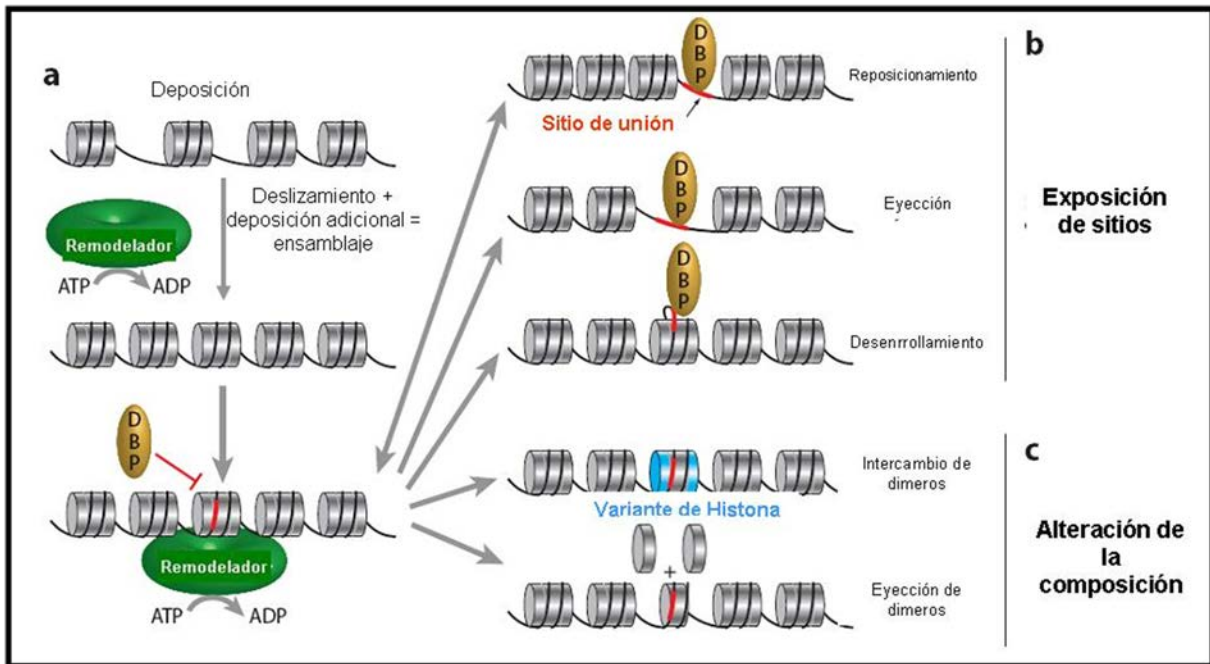


Figura 2. Las diferentes maneras de remodelaje de la cromatina.

- (a) Los remodeladores de la cromatina (en verde) pueden asistir el ensamblaje de la cromatina mediante el movimiento de los octámeros de histonas previamente depositados, generando el espacio pertinente para una deposición adicional.

La acción de los remodeladores sobre el arreglo de nucleosomas resulta en varios productos que pueden ser clasificados en 2 categorías:

- (b) Exposición de sitios: en este caso se expone un sitio (en rojo) que puede ser ocupado por una proteína de unión a ADN (DBP). Inicialmente este sitio se encuentra oculto por un octámero de histonas y se vuelve accesible mediante la reposición del nucleosoma, o la eyección del nucleosoma o el desenrollamiento de una región específica de la cromatina.
- (c) Alteración de la composición: en este caso el contenido del nucleosoma se modifica por el reemplazo del dímero [intercambio del dímero H2A-H2B por un dímero alternativo que contiene una variante de histonas (en azul)] o a través de la eyección del dímero.

Figura modificada de Clappier y Cairns 2009.

La mayoría de los remodeladores de la cromatina forman grandes complejos, los cuales se componen de múltiples subunidades accesorias y una subunidad

central que contiene la actividad catalítica de ATPasa. Las subunidades accesorias comúnmente contienen dominios de interacción que tienen la capacidad de regular la actividad enzimática del complejo, facilitando la unión de factores de transcripción y otras enzimas modificadoras de la cromatina, y de esta manera guiar al complejo hacia el ADN y/o histonas modificadas (Hargreaves y Crabtree, 2011).

Clasificación de los complejos remodeladores de la cromatina.

Debido al extenso número de interacciones genéticas y la dificultad para caracterizarlas bioquímicamente, el “dominio helicasa/ATPasa” de las proteínas de la familia SNF2 se utiliza para clasificar a los complejos remodeladores de la cromatina (Flaus *et al*, 2006). Estas secuencias son portadoras de una región conservada característica de la familia Snf2 llamada región ATPasa, la cual puede ubicarse dentro de cualquier punto del polipéptido [Figura 3A] (Flaus *et al* 2006). Un análisis inicial del dominio helicasa de la familia SNF2, propuso a 8 distintas subfamilias [Figura 4A] (Eisen *et al*, 1995). Posteriormente se realizó una nueva clasificación utilizando a 1300 miembros de la familia, disponibles gracias al reciente progreso en la secuenciación de diferentes genomas (Flaus *et al* 2006). En este nuevo estudio se reportaron 23 subfamilias en los grupos principales [Figura 4B].

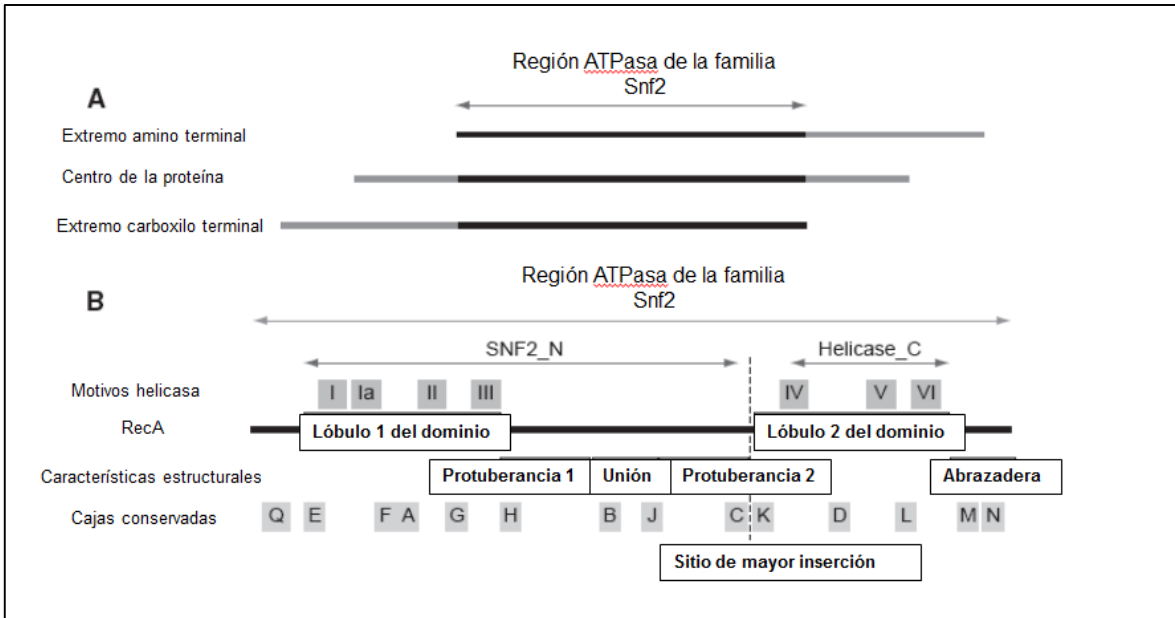


Figura 3. Secuencia y características estructurales de la región ATPasa de la familia Snf2.

(A) La región ATPasa de la familia Snf2 se encuentra embebido en el polipéptido y puede encontrarse tanto en el extremo amino o carboxilo o bien en el centro del polipéptido.

(B) Se esquematizan los motivos Helicasa conservados que componen a la región ATPasa de la familia Snf2, los cuales fueron definidos por Flaus y cols. (2006). Los motivos se muestran en su posición relativa con respecto a RecA. La figura no está en escala.

Figura modificada de Flaus y Owen-Hughes, 2011.

Recientemente, se ha adoptado una clasificación alternativa, la cual coloca a los complejos remodeladores en 4 familias nominales: SWI/SNF, ISWI, CHD y INO80 [Figura 4C] (Hargreaves y Crabtree, 2011). Esta clasificación, se basa en la asignación empírica de un complejo remodelador de la cromatina a una familia en particular, basandose en la organización de dominios de la subunidad catalítica del complejo. Esta simplificación, obscurece la diversidad que existe dentro del grupo de las CHD y hace difícil clasificar a enzimas como Alc1, Lsh y hATRAX (Flaus *et al* 2006). Asimismo, esta clasificación ignora la conexión que tienen todos los remodeladores de la cromatina con las ATPasas de la familia Snf2 (Flaus *et al* 2006). Actualmente, los dominios que enmarcan a la región ATPasa no se

encuentran bien estudiados y las herramientas bioinformáticas son incapaces de clasificarlos (Flaus *et al* 2006).

Casi todos los polipéptidos de la familia SNF2 portan uno o más dominios, además del dominio helicasa/ATPasa. La mayoría de estos dominios están involucrados en el reconocimiento de la cromatina (Hargreaves y Crabtree, 2011). Ejemplos de estos dominios son: los cromodominios, bromodominios, SANT (nombre que toma por que este dominio se encontró por primera vez en Swi3, Ada2, N-Cor y TFIIIB), PHD (por sus siglas en inglés “Plant Homeodomain”), entre otros. Se ha hecho una revisión extensa de estos en: De la Cruz y cols. (2005).

Las mutaciones en genes que codifican para proteínas que contienen dominios PHD y que forman parte de complejos remodeladores de la cromatina, ocasionan desórdenes humanos que van desde síndromes originados por fallas en el desarrollo neuronal, condiciones autoinmunes, leucemia mieloide y otros tipos de cáncer (Baker *et al*, 2008). Uno de estos genes es *ATRX*. Recientemente, *ATRX* ha sido descrita como una proteína involucrada en la regulación transcripcional, así como en la formación y mantenimiento de la arquitectura nuclear. Aunque *ATRX* inicialmente fue descrita como una proteína crítica para la regulación transcripcional de la expresión del gen β -globina, estudios recientes han revelado que *ATRX* además de esto, participa en el control de la estabilidad de los centrómeros y telómeros, la cohesión de los cromosomas y la regulación de diversos genes improntados en el cerebro postnatal del ratón (De La Fuente *et al* 2011).

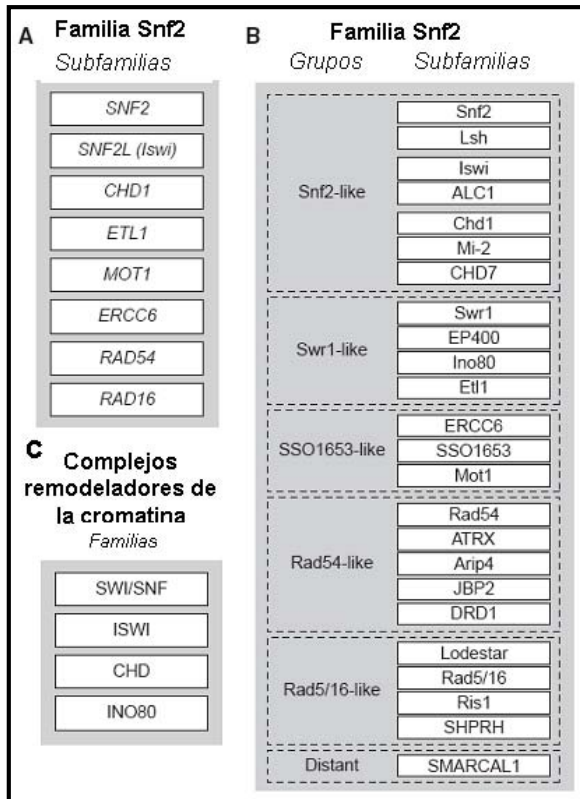


Figura 4. Clasificación de los complejos remodeladores de la cromatina.

(A) Clasificación de los complejos remodeladores de la cromatina como pertenecientes a la familia Snf2. Se muestran las subfamilias definidas mediante la comparación de secuencias de la región ATPasa y las secuencias que la enmarcan.

(B) Esquematización de las subfamilias definida por la expansión de la filogenia mediante la comparación de la región ATPasa de la familia Snf2. Las subfamilias toman el nombre y nomenclatura del primer miembro identificado bioquímicamente.

(C) Clasificación empírica. El criterio de clasificación se basa en la organización de dominios de la subunidad catalítica del complejo.

Figura modificada de Flauss y Owen-Hughes, 2011.

ANTECEDENTES

La ATPasa ATRX

El gen *ATRX* se localiza en el cromosoma X de los mamíferos y es miembro de la superfamilia SNF-2 de los remodeladores de la cromatina. Este gen se encuentra ampliamente conservado en animales (desde invertebrados hasta vertebrados) y plantas [Figura 5]. El gen *Atrx* de ratón comparte un 85% de homología con su gen

ortólogo de humano (Picketts *et al*, 1998). Sin embargo, los marsupiales son los únicos que tienen ortólogos de *ATR*X tanto en el cromosoma X (*ATR*X) como en el cromosoma Y (*ATRY*). El gen *ATR*X de los marsupiales comparte un 72% y un 78% de identidad con sus ortólogos de ratón y humano, respectivamente (Park *et al*, 2004). Ortólogos de *ATR*X se han identificado en *C. elegans* (Bender *et al*, 2004) y *Drosophila melanogaster* (Basset *et al*, 2008).

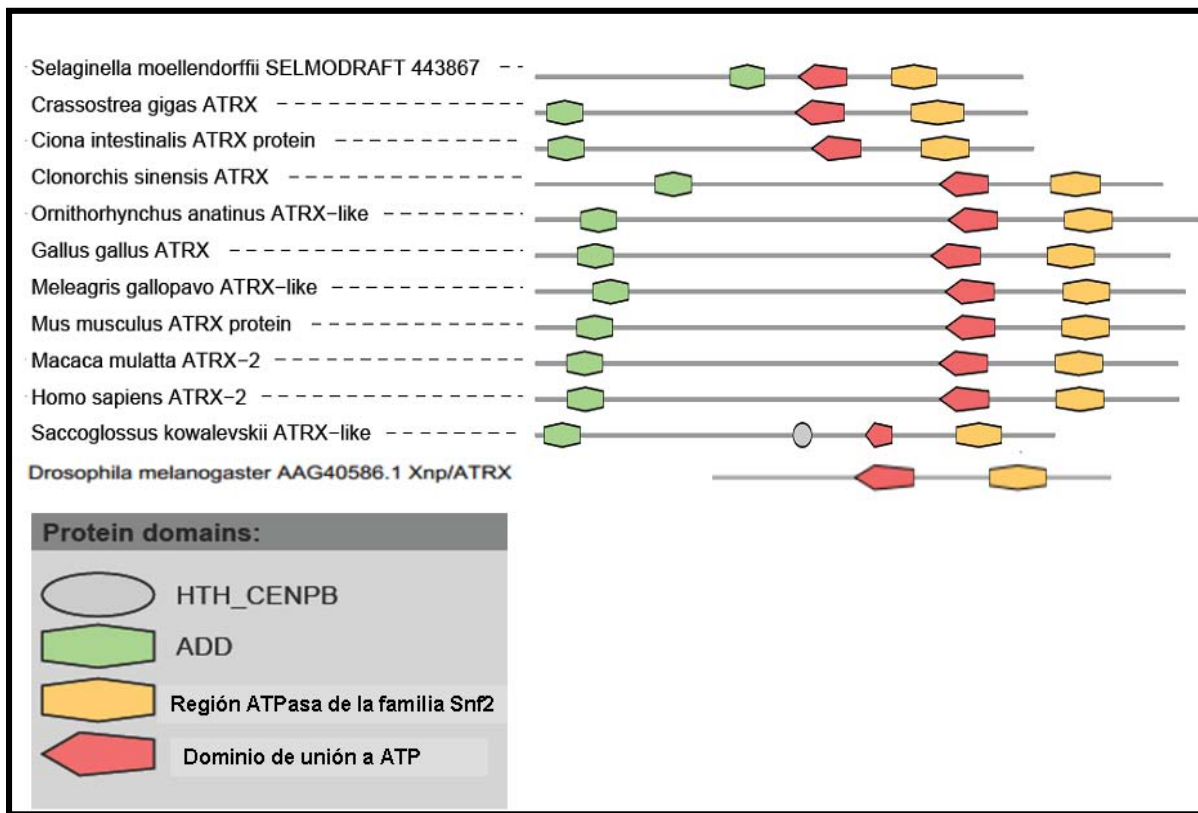


Figura 5 *ATR*X es una proteína evolutivamente conservada.

Se muestra la representación esquemática de las proteínas ortólogas a hATR X de algunos organismos representativos de plantas, parásitos, marsupiales, aves, ratón, mamíferos e insectos.

En verde se representa al dominio ADD, en amarillo la región ATPasa de la familia Snf2 y en rojo el dominio de unión a ATP..

El síndrome de α -talasemia con retraso mental ligado al cromosoma X (Síndrome ATR-X)

En 1992 Gibbons y colaboradores reportaron que al analizar el cromosoma X de 23 niños (pertenecientes a 16 familias diferentes) que presentaban el síndrome ATR-X encontraron que en todos se presentaban mutaciones dentro de la región Xq13.1 a Xq21.1. Estudios posteriores han reportado que dentro de dicha región se encuentra el gen *hATTRX* y que las mutaciones que generan el síndrome ATR-X caen dentro de dicho gen (Gibbons, 2006). Hasta el día de hoy se han identificado en todo el mundo a 182 familias afectadas por este síndrome, y se estima que de cada 1,000,000 nacimientos entre 1 a 9 individuos son afectados por el síndrome ATR-X (Gibbons, 2006; Gibbons *et al*, 2008).

El síndrome de α -talasemia con retraso mental ligado al cromosoma X (Síndrome ATR-X) se manifiesta principalmente en varones. Las mujeres portadoras suelen ser física e intelectualmente normales (Gibbons, 2006). Existe gran variabilidad en el fenotipo de la enfermedad, sin embargo, entre las características principales se pueden mencionar: retraso mental de moderado a severo (96% de los casos), dimorfismo facial (94%), fallas psicomotoras (95%), anomalías esqueléticas (90%), anomalías renales/urinarias (15%), hipotonía neonatal (84%), anomalías genitales (79%), limitaciones en el habla (95%), microcefalia (77%), estatura corta 65%, convulsiones (30%), defectos en la visión (23%) (Gibbons *et al*, 2012), α -talasemia (88%, con distinta severidad) (Gibbons, 2006; Medina *et al*, 2009) y dificultad para deglutir (76%) (Bérubé *et al*,

2005). La α -talasemia se refiere a una disminución en la producción de cadenas α de la hemoglobina, lo que lleva a la formación de agregados inestables de cadenas β (conocidos como inclusiones HbH) (Gibbons, 2006).

Características de hATRX.

La proteína hATRX se encuentra codificada por un gen ubicado en el cromosoma X que abarca cerca de 300kb de ADN genómico (Picketts *et al*, 1996). Hasta el momento, la mayor parte de los estudios realizados sobre hATRX se han concentrado en el análisis de principalmente 2 isoformas de hATRX: hATRX_L y hATRX_t.

La proteína hATRX_L de 280kDa tiene los siguientes dominios conservados [Figura 6] (Picketts *et al*, 1996), que se describen a continuación:

- Dominio ADD.

En el extremo amino terminal de hATRX se encuentra un dominio ADD (ATRX, DNMT3a, DNMT3L). Hasta el momento, este dominio solo se ha encontrado en hATRX y las ADN metil-transferasas: DNMT3a - DNMT3L. La estructura del dominio ADD de hATRX_L se conforma por un dedo de zinc tipo GATA, un dominio PHD y un extremo C Terminal con una α -hélice (Argentaro *et al*, 2007). Estas tres estructuras se empaquetan juntas para plegarse como un dominio único globular. Los dedos de zinc PHD son una característica común de proteínas de unión a cromatina y se

piensa que están involucradas en interacciones proteína – proteína (Argentaro *et al*, 2007).

Zhao y cols. (2009) han demostrado que el dominio ADD de la proteína DNMT3a tiene el papel de reconocer la dimetilación de la Histona 4 en la Arginina 3 (H4R3me2). Sin embargo, no es el caso para la proteína ATRX. Mediante microarreglos peptídicos, ensayos de “pull-down” y ensayos de unión a péptidos, se demostró que el dominio ADD de hATRX interacciona con los extremos amino terminal de la histona H3 trimetilada en la lisina 9 (H3K9me3). La disrupción de esta interacción se realiza en presencia de H3K4me3 y H3K4me2 lo cual indica que el dominio ADD de ATRX tiene la capacidad de reconocer estas dos marcas importantes (ausencia de H3K4me2 y H3K4me3, y presencia de H3K9me3) (Dhayalan *et al*; 2011).

Eustermann y cols. (2011) expresaron hATRX como proteína de fusión a GFP en células L929 a fin de determinar su localización dentro de la cromatina. Mediante estos ensayos determinaron que el dominio ADD es responsable de reclutar a hATRX en la heterocromatina pericentromérica. Esto se demostró debido a que hATRX se deslocaliza cuando es portadora de mutaciones en el dominio ADD, que selectivamente comprometen el reconocimiento de H3K9me3 o bien de H3K4me0, pero que no reducen la estabilidad del dominio ADD.

- Dominio SNF2.

El extremo carboxilo de la proteína hATR_X contiene 7 dominios colineales altamente conservados, que típicamente se encuentran en la familia de proteínas SWI2/SNF2, que le confieren la actividad de ATPasa (Mitson *et al*, 2011).

Finalmente, se sabe que el extremo C-terminal de hATR_X es necesario para la localización de hATR_{XL} en los cuerpos nucleares PML (Bérubé *et al*, 2008). Otras partes de la proteína median interacciones proteína – proteína o dictan su localización subnuclear [Figura 6].

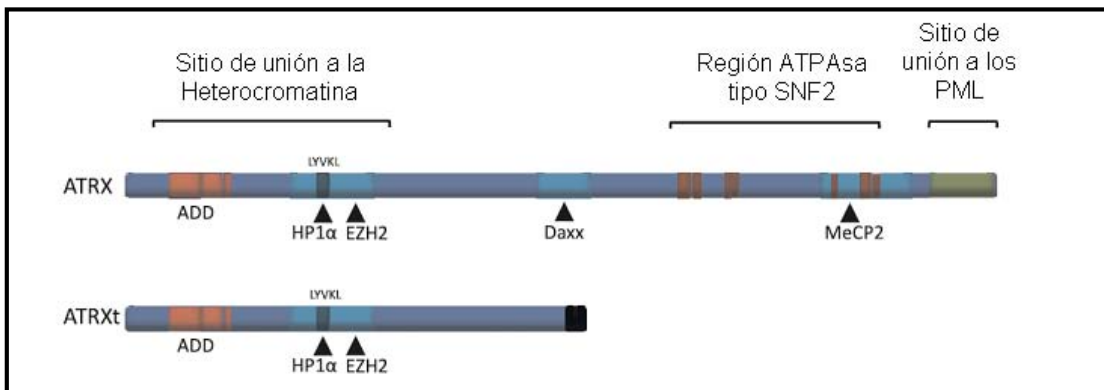


Figura 6. Representación de la posición relativa de los dominios dentro de la proteína ATRX.

Las isoformas proteicas ATR_{XL} y ATR_{Xt} comparten diversos motivos proteicos, incluyendo el dominio ADD y los sitios de interacción con HP1a y EZH2. La isoforma larga contiene dominios que median su interacción con Daxx y MeCP2, así como aquellos dominios que son necesarios para su interacción con los cuerpos nucleares PML. Además el extremo carboxilo de ATR_{XL} codifica 7 dominios altamente conservados de la familia de proteínas helicasas Snf2 (Figura tomada de Bérubé, 2011).

Isoformas de hATR_X

Bérubé y cols. (2000) así como McDowell y cols. (1999) han reportado que al realizar Western blot utilizando anticuerpos que reconocen el extremo amino de hATR_{XL}, adicionalmente a la detección de la proteína de 280kDa (hATR_{XL}) se identifica una

proteína de 180kDa a la cual se le nombró: hATRX_t [Figura 6] (Bérubé *et al*, 2000; McDowell *et al*, 1999). Esta isoforma se ha detectado en células humanas tales como HeLa, células HEK293 (Bérubé *et al*, 2000) y linfocitos B (McDowell *et al*, 1999). Garrick y cols. (2004) han reportado que se encuentra altamente conservada entre ratón y humano, y surge de transcritos en los cuales falla la remoción del intrón 11 del transcrito hATRX o mATRX. Este polipéptido retiene el dominio ADD pero carece del extremo carboxilo de la isoforma larga. ATRX_t colocaliza con ATRX_L en bloques de heterocromatina pericentromérica pero no se encuentra presente en los cuerpos PML (Garrick *et al*, 2004). Análisis inmunocitoquímicos e inmunolocalización indirecta muestran que ambas isoformas son proteínas nucleares que predominantemente se asocian con heterocromatina (en cromosomas en interfase y metafase) (McDowell *et al*, 1999; Garrick *et al*, 2004). Las funciones biológicas de hATRX_t aún no se han definido, pero se sabe que tiene la capacidad de interactuar con hATRX_L, por lo anterior se ha sugerido que hATRX_t puede modular la actividad de hATRX_L en la heterocromatina (Bérubé, 2011).

Relación entre el síndrome ATR-X y la proteína ATRX.

Individuos con el síndrome ATR-X presentan diversas mutaciones en diferentes regiones del gen. Estas mutaciones por lo general generan un cambio en la funcionalidad de la proteína. Un 30% de las mutaciones hasta ahora descritas se han ubicado en el dominio SNF2 tipo ATPasa-helicasa, mientras que un 50% se han localizado en el dominio ADD. Además, se ha propuesto que las mutaciones en

el dominio ADD afectan el plegamiento de dicho dominio y como consecuencia interfieren con el plegamiento total de la proteína y por lo tanto con su función (Argentaro *et al*, 2007).

Se ha propuesto que algunos de los fenotipos observados en pacientes que portan mutaciones en hATRX deben ser causados por que se altera el papel que tiene ésta en la regulación transcripcional (Bérubé *et al*, 2008; Baumann *et al*, 2008). Como resultado, diferentes estudios moleculares se han enfocado en elucidar el papel de hATRX en la transcripción. Un análisis reciente en el que se utilizó inmunoprecipitación de la cromatina y secuenciación masiva (CHIP-sequencing) utilizando eritroblastos de humano y células madre embrionarias de ratón, demostró que ATRX se puede unir a secuencias repetidas en tandem ricas en G con el potencial de formar una estructura de hélice cuádruple (G4) (Law *et al*, 2010). Genes asociados con estas secuencias repetidas en tandem presentan alteraciones en su expresión cuando ATRX se encuentra mutado. El mismo estudio demuestra mediante experimentos *in vitro* que ATRX puede unirse directamente a secuencias ricas en G, las cuales forman estructuras G4 (Law *et al*, 2010). En este mismo estudio se demostró que la expresión de los genes α -globina se altera cuando ATRX presenta mutaciones, y este efecto se encuentra correlacionado directamente con el número de secuencias repetidas ricas en G que se encuentran río arriba de este gen (Law *et al*, 2010). Hasta la fecha no se sabe con certeza cual de los dominios de hATRX es el responsable del reconocimiento de las G4, sin embargo, pudiera ser a través del dominio de helicasa.

Mutaciones de la proteína hATR-X.

Se ha observado que la mayoría de las mutaciones en el gen *hATR-X* que no generan una proteína truncada caen dentro de la región que codifica los 97 residuos conservados del dominio ADD o bien los 733 residuos conservados del dominio Snf2. Hasta el momento, en la mayoría de los individuos portadores del síndrome ATR-X no se han caracterizado mutaciones dentro de la región que codifica los 1662 residuos de ATR-X que se caracterizan por ser regiones pobremente conservadas y estructuralmente desordenadas. Se cree que mutaciones en estas regiones no se observan en individuos con el síndrome ATR-X debido a que actúan como polimorfismos neutrales (Mitson *et al*, 2011). Mitson y cols. (2011) realizaron un estudio con la finalidad de distinguir cuales de las mutaciones, que hasta el momento se han descrito en el dominio Snf2, afectan la estabilidad y la función de hATR-X. En este estudio se analizaron 4 tipos de mutaciones (“splicing”, deleción y mutaciones puntuales: sin sentido y con cambio de sentido) en 27 diferentes individuos con síndrome ATR-X. Para este estudio Mitson y cols. (2011) utilizaron líneas celulares derivadas de estos individuos las cuales fueron transformadas con el virus Epstein-Barr para inmortalizarlas. Posteriormente a cada linaje celular se le midió la expresión del mRNA y niveles de proteína hATR-X. Encontraron que todas las mutaciones generadas por “splicing” introducen codones prematuros de paro. Además los linajes celulares de los individuos que presentan dichas mutaciones tienen niveles reducidos de mRNA y de la proteína hATR-X con respecto a los linfoblastos de individuos que no tienen el síndrome ATR-X. Sin embargo, los datos de Western blot indican que la proteína que se produce en estos individuos no es el

producto truncado resultante del mRNA portador de la mutación, lo cual demuestra que una proporción del mRNA presenta un “splicing” correcto (Mitson *et al*, 2011). En contraste, los individuos portadores de la mutación puntual sin sentido identificada por Mitson y cols. (2011) como 6003G, presentan niveles normales de mRNA. Esta mutación genera un sitio crítico de “splicing” que remueve los nucleótidos 5967-6022, incluyendo a la mutación, y por ello esta mutación actúa como una delección que asegura la producción de la proteína ATRX. Los individuos portadores de las mutaciones por delección y muchas mutaciones puntuales con cambio de sentido presentan niveles normales de mRNA pero niveles reducidos de la proteína (7-27% de los niveles normales); se cree que probablemente estas mutaciones desestabilizan a la proteína (Mitson *et al*, 2011). Por otro lado, los individuos portadores de las mutaciones puntuales con cambio de sentido: V1552F, K1650N y L1746S acumulan mayores cantidades de la proteína ATRX (39-51% de los niveles normales) se cree que estas mutaciones interfieren con la función de hATRX (Mitson *et al*, 2011).

Relación de las mutaciones de *ATR-X* con la penetrancia del Fenotipo de ATR-X

Gibbons y cols. (2008) al analizar el patrón de distribución, a lo largo de la proteína hATRX, de 113 mutaciones diferentes, en 200 individuos que presentan el síndrome ATR-X (individuos pertenecientes a 182 familias) encontraron que el grado de penetrancia de ciertos fenotipos del síndrome ATR-X se correlaciona con la región en donde se presenta la mutación [Figura 7]. En este reporte concluyeron que

mutaciones en el dominio ADD se correlacionan con daño psicomotor severo y mutaciones que afectan el extremo carboxilo de la proteína se asocian con anormalidades genitales severas. Sin embargo, hay que tomar estos datos con reserva ya que individuos que tienen mutaciones en el dominio ADD también tienen anormalidades urogenitales, y pacientes con mutaciones en el dominio helicasa/ATPasa también tienen fallas psicomotoras. Entre los resultados reportados en este estudio se destaca lo siguiente:

- 10 de 15 individuos con retraso mental de moderado a severo presentaron mutaciones en el dominio helicasa/ATPasa.

- 25 de 29 individuos con mutaciones en el dominio ADD no pueden caminar al llegar a la edad de 10 años. Mientras que sólo 8 de 27 individuos con mutaciones en el dominio helicasa/ATPasa presentan esta discapacidad.

- 7 de cada 99 individuos con mutaciones en el dominio ADD presentan anormalidades urogenitales, y 4 de cada 56 individuos con mutaciones en el dominio helicasa presentan estas anormalidades. En ambos casos es cerca del 7% de los individuos afectados.

- 12 de 18 individuos con mutaciones en el extremo carboxilo tienen micropenes o genitales ambiguos.

- Un 15% de los casos no presentan inclusiones de HbH. Estos casos parecen asociarse con mutaciones en el extremo amino y carboxilo (72% y 32% respectivamente).

Como ya se mencionó estos datos deben tomarse con reserva ya que muchas de las mutaciones disminuyen los niveles normales de la proteína y no se llegan a detectar proteínas truncas. Esto es importante ya que para muchas proteínas que

actúan como supresores tumorales la sola disminución de los niveles proteicos podría ser determinante para su función y como veremos más adelante hATRX podría también estar involucrada en modular procesos de supresión tumoral (Gibbons *et al*, 2003; Haas *et al*, 2009; Steensma *et al*, 2009; Elsasser *et al*, 2011; Jiao *et al*, 2011).

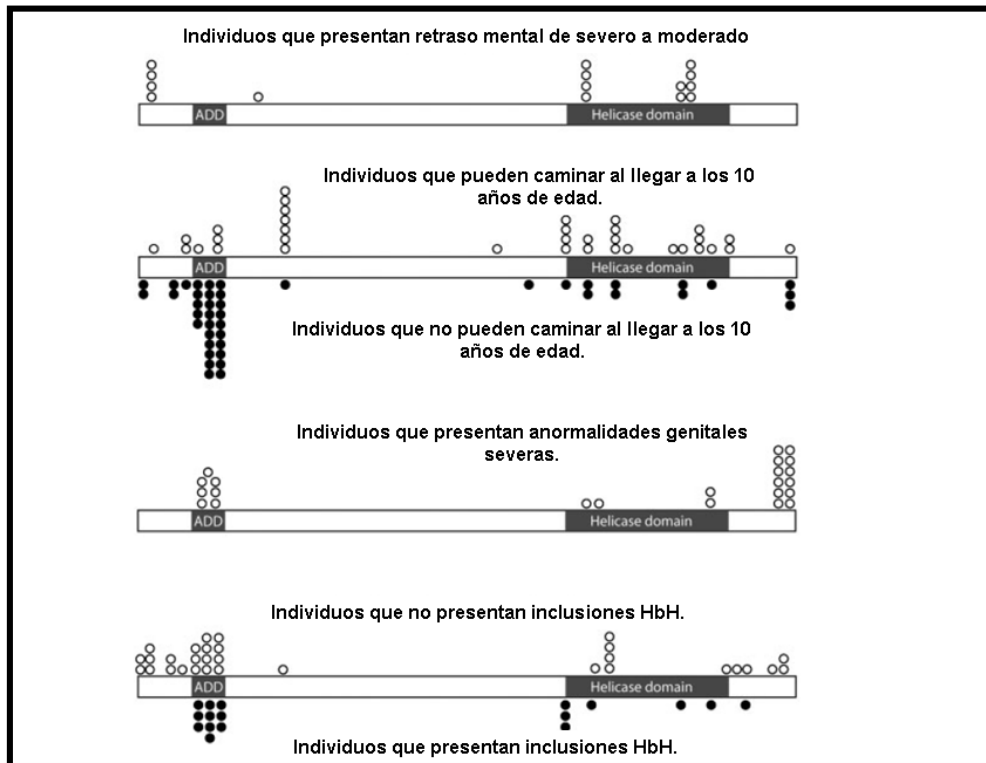


Figura 7. Las mutaciones en ATRX y su relación con la penetrancia del síndrome ATR-X.

Con círculos se muestra la posición de las mutaciones en individuos con un fenotipo particular, el cual se cita debajo o arriba de la figura (Figura modificada de Gibbons *et al* 2008).

Proteínas que interaccionan con ATRX identificadas en humano y ratón.

En la siguiente tabla se enlistan las diferentes proteínas con las que hasta el momento se ha determinado que ATRX_L y ATRX_t interaccionan físicamente.

Tabla 1 Proteínas con las que interacciona hATR_X

Proteínas con las que Interacciona hATR _X .				
Proteína	Isoforma de ATR _X que interacciona	Método a través del cual se identificó la interacción.	Función propuesta	Referencia
HP1a	ATR _X _L , ATR _X _t	Ensayos de doble híbrido, coimmunoprecipitación	Reclutar a hATR _X a heterocromatina.	Bérubé <i>et al</i> , 2000; Eustermann <i>et al</i> , 2011; Le Douarin <i>et al</i> , 1996; Lechner <i>et al</i> , 2005.
EZH2	ATR _X _L , ATR _X _t	Ensayos de doble híbrido	ATR _X participa en regular genes blanco de EZH2	Cardoso <i>et al</i> , 1998
MeCP2	ATR _X _L	Ensayos doble híbrido, ensayos GST-pulldown, coimmunoprecipitación	ATR _X participa en regular genes blanco de MeCP2	Nan <i>et al</i> , 2007
SMC1 y SMC3	ATR _X _L	Coinmunoprecipitación	Cohesión de cromátidas hermanas	Kernohan <i>et al</i> , 2010; Ritchie <i>et al</i> , 2008
DAXX	ATR _X _L	Inmunofluorescencia, coimmunoprecipitación, cristalografía	Deposición de H3.3 de forma independiente a la replicación en los telómeros, heterocromatina pericentromérica y secuencias satélite de ADN altamente repetidas.	Drane <i>et al</i> , 2010; Elsässer <i>et al</i> , 2012; Liu <i>et al</i> , 2012; Wong <i>et al</i> , 2010
Receptor de Andrógenos	ATR _X _L , ATR _X _t	Coinmunoprecipitación	Activan al promotor de <i>Rhox5</i>	Bagheri-Fam <i>et al</i> , 2011

- hATR_X_L puede asociarse con HP1a (Heterochromatin protein 1 a) a través del motivo PxVxL (LYVKL) (Bérubé *et al*; 2000; Le Douarin *et al*, 1996; Lechner *et al*, 2005). Las proteínas HP1 son unidades fundamentales de la heterocromatina, se encuentran además en heterocromatina centromérica y telomérica de casi todos los cromosomas eucariontes (Eustermann *et al*, 2011).

- Mediante ensayos de doble híbrido se determinó que hATR_X interacciona con la proteína del grupo polycomb EZH2 (Cardoso *et al*, 1998) [Figura 6]. La proteína EZH2 pertenece a la familia del grupo Polycomb (PcG). Los miembros de la familia PcG forman complejos proteicos multiméricos que están implicados en el mantenimiento de la represión transcripcional de determinados genes a lo largo de generaciones sucesivas de división celular. La proteína EZH2 actúa como un silenciador de genes, añadiendo grupos metilo al residuo 27 de lisina de la histona

3, una modificación que conduce a la condensación de la cromatina (Fiskus *et al*, 2006).

- Nan y cols. (2007) han reportado que secuencias adyacentes al dominio ATPasa permiten la interacción de hATRX_L con la proteína tipo 2 de unión a CpG metilado (MeCP2 por sus siglas en inglés methyl-CpG-binding protein 2). En este mismo estudio se demostró que ATRX y MeCP2 interacciona *in vitro*. Además, se determinó mediante inmunofluorescencia que ATRX se localiza en la heterocromatina pericentromérica en neuronas maduras de cerebro de ratón. La proteína MeCP2 es capaz de unirse a ADN metilado, se ha relacionado con la inactivación del cromosoma X. Mutaciones en el gen que codifica a MeCP2 en humanos causan el síndrome de Rett, un desorden neurológico progresivo (Amir *et al*, 1999).

- Se ha demostrado que la depleción de ATRX ocasiona la reducción de la cohesión de cromátidas hermanas (Ritchie *et al*, 2008) y la expresión aberrante de genes específicos en el cerebro de ratón (Levy *et al*, 2008), lo cual sugiere que ATRX y las subunidades de las cohesinas tienen modos similares de acción. Por esta razón, Kernohan *et al* (2010) se propusieron determinar si existía una interacción entre ATRX y las cohesinas. Esta interacción fue determinada, en primera instancia, utilizando extractos proteicos de células SH-SY5Y derivadas de un neuroblastoma. En este estudio, dichos extractos se utilizaron para realizar experimentos de coimmunoprecipitación mediante los cuales se demostró que una proporción de la subunidad SMC1 de la cohesinas presente en el núcleo interacciona con ATRX.

Para determinar si esta interacción también ocurre *in vivo*, se realizaron experimentos de inmunoprecipitación en extractos proteicos de cerebro de ratón de 17 días postnatal. En dichos experimentos se determinó que ATRX interacciona con las subunidades SMC1 y SMC3 de las cohesinas. Se verificó la especificidad de la interacción mediante experimentos de inmunoprecipitación utilizando extractos proteicos de la corteza cerebral de ratones que llevan una delección condicional de la isoforma larga de ATRX (pero no de la corta), la delección condicional se realizó mediante el sistema de *CreLoxP* (Bérubé *et al.*, 2005). De esta manera, Kernohan y cols. (2010) demostraron que SMC1 y SMC3 interaccionan con ATRX_L pero no con ATRX_s.

El Papel de la proteína ATRX en vertebrados

- ATRX y su papel en el desarrollo embrionario de vertebrados

Actualmente se sabe muy poco sobre el papel preciso de la proteína durante el desarrollo de los vertebrados. El primer enfoque para dilucidar su función fue la sobreexpresión de la proteína en ratones mediante un transgen. Las líneas de ratones que expresaban ATRX en la mayor parte de los tejidos examinados también eran aquellas que producían camadas mucho más pequeñas, que tenían un alto porcentaje de muerte perinatal, y cuyos embriones presentaban, en distintos estadios del desarrollo, retrasos o anormalidades que incluían reabsorción, morfología anormal de la cabeza y defectos en el tubo neural. Los animales que sobreviven hasta adultos tienen un desorden craneofacial leve que es notorio como

un hocico corto y ancho, además, algunos presentan convulsiones epilépticas y conductas compulsivas como rascarse obsesivamente, a veces hasta el punto en que tienen que ser sacrificados (Bérubé *et al*, 2002).

Por otra parte, en el trabajo de Garrick y cols. (2006) se buscó hacer células embrionarias troncales nulas para *Atrx* a través de recombinación homóloga para después conseguir ratones mutantes; sin embargo, no se logró obtener ninguna clona. Es por esto que siguieron una estrategia de eliminación condicional utilizando el sistema de *CreLoxP*. Las células embrionarias troncales nulas para *Atrx* (*Atrx*⁻) pueden ser mantenidas en cultivo pero su crecimiento es mucho más lento que las células *Atrx*⁺. Comprobaron que esto no se debe a que la célula sufra algún tipo de bloqueo durante alguna etapa del ciclo celular, ni a que hubiese menor proliferación o mayor apoptosis. Aunque no pueden encontrar la causa exacta, subrayan el hecho de que aparentemente las células *Atrx*⁻ tienen un ciclo celular más lento que las células *Atrx*⁺ por lo cual concluyen que *Atrx* es importante para el crecimiento normal de este tipo de células y/o su expansión.

Para investigar el papel de *Atrx* durante el desarrollo de ratón también siguieron la misma estrategia de eliminación condicional, donde la recombinasa Cre ya está activa en la etapa de 16 células (mórula). Sin embargo, la abolición de *Atrx* en el desarrollo embrionario de ratón resulta letal, pues no es posible recuperar ratones con este genotipo en el nacimiento. Los embriones mueren entre los 7.5 y 9.5 dpc (días post-coito) debido a un defecto en la formación del trofoblasto que es aparente desde los 7.5 dpc (Garrick *et al*, 2006).

Hasta el momento no se conocen mutaciones en el síndrome que sean completamente nulas para *Atrx*. Algunas mutaciones producen codones de paro prematuros que se pensaba que eran nulas; sin embargo, ahora se conoce que sí producen proteína completa (aunque en menor cantidad) (Garrick *et al*, 2006; Gibbons *et al*, 2008; Bérubé *et al*, 2005).

Además del conocimiento de que las mutaciones de *Atrx* son hipomorfos funcionales, se sabe muy poco acerca de cómo estas mutaciones causan los síntomas asociados a la enfermedad. La expresión de *Atrx* durante el desarrollo embrionario es muy extendida. Intentos por entender su función en el desarrollo del embrión o solamente del cerebro sugieren un papel importante para *Atrx* en la supervivencia de células troncales y también de células diferenciadas; sin embargo, los estudios funcionales se han dificultado debido a la letalidad asociada con la ablación ubicua o restringida de este gen (Medina *et al*, 2009).

- Papel de ATRX en el desarrollo del cerebro.

Se sabe que el 95% de los pacientes con el síndrome ATR-X tienen retraso mental. Al observar el patrón de expresión normal de *Atrx* en el cerebro posterior de ratón es notable que ésta es mucho mayor en las neuronas completamente diferenciadas que en los progenitores. Tratando de esquivar el problema de letalidad debido a defectos en tejidos extraembrionarios, se eliminó la expresión de *Atrx* en ratones únicamente en el cerebro posterior. Los ratones machos mutantes son más

pequeños y no succionan bien, muriendo entre las primeras 24 a 48 horas después de nacer. La pérdida de *Atrx* ocasiona que el el cerebro posterior tenga un tamaño mas pequeño, además de que se observa hipocelularidad en el neo córtex y el hipocampo. La hipocelularidad, en esta región del cerebro, se debe a que durante la corticogénesis se incrementa la apoptosis lo que ocasiona un incremento en la tasa de muerte neuronal. En conclusión, *Atrx* es importante para la sobrevivencia durante la diferenciación neuronal (Bérubé *et al*, 2005).

- Papel de ATRX en el desarrollo del ojo

Otra característica del síndrome de ATR-X es que algunos pacientes presentan anomalías en la visión. Los problemas más comunes son estrabismo, miopía y atrofia del nervio óptico, ésta última implica a los componentes neuronales del ojo (Medina *et al*, 2009; Gibbons, 2006). Durante el desarrollo embrionario de ratón *Atrx* se expresa en todos los tipos celulares de la retina periférica, exceptuando los conos. La inactivación de *Atrx* en esta región conlleva a la pérdida de dos tipos de neuronas: las células amacrinas y las células horizontales. Esta pérdida no se debe a un desorden en la especificación de los subtipos de neuronas, sino a un defecto en la supervivencia de estas interneuronas durante el periodo posnatal una vez que están diferenciadas. Estos ratones también presentan defectos en la función de la retina, lo que fue probado a través de electroretinografías (Medina *et al*, 2009).

- Papel de ATRX en el desarrollo del testículo

Bagheri-Fam y cols. (2011) investigaron el papel de ATRX en el desarrollo y función del testículo. En este estudio mediante inmunohistoquímica se determinó que la proteína ATRX se expresa en todos los tipos de células del testículo de ratón hasta la etapa 14.5 (E14.5), sin embargo se destaca que su expresión es más prominente en las células de Sertoli. Para la E17.5, la proteína ATRX disminuye su expresión en las células germinales, pero aún se expresa en el linaje de las células de Sertoli del testículo de ratón. Además se determinó que las células de Sertoli de animales jóvenes y adultos expresan *Atrx*. Las células de Sertoli tienen importantes funciones en la gónada fetal para la formación del testículo y la elongación de los conductos testiculares y en el testículo adulto proveen soporte estructural y nutricional para las células germinales durante la espermatogénesis (Griswold, 1998; Sharpe *et al*, 2003; Wilhelm *et al*, 2007). Mediante inactivación condicional de *Atrx* específicamente en las células de Sertoli en ratones de E13.5 utilizando el sistema de *CreLoxP*, se demostró que *Atrx* juega un papel importante en la proliferación fetal de las células de Sertoli y como consecuencia también en la elongación de los conductos testiculares y la espermatogénesis. Además, Bagheri-Fam y cols. (2011) mediante ensayos de coimmunoprecipitación determinaron que ATRX y el receptor de andrógenos interactúan físicamente en el testículo y en el linaje celular TM4. ATRX y el receptor andrógenos activan al promotor de *Rhox5*, este gen es un blanco importante del receptor de andrógenos (AR) (Bagheri-Fam *et al*, 2011). *Rhox5* es el único blanco directo de AR, hasta ahora caracterizado, en las células de Sertoli y juega un papel importante durante la espermatogénesis (Macleay *et al*, 2005).

RHOX5 es un factor de transcripción que se expresa exclusivamente en las células de Sertoli donde regula la expresión de genes que codifican a proteínas que regulan el ciclo celular, apoptosis, metabolismo e interacciones celulares (Hu *et al*, 2010). La delección de *Rhox5* en el ratón causa apoptosis de células germinales y reduce la producción espermática, así como la movilidad espermática y la fertilidad (Macleán *et al*, 2005).

- Las funciones moleculares propuestas para ATRX en el mantenimiento de la estructura de la cromatina.

La presencia del dominio ADD y SNF2 en la proteína ATRX sugiere que ATRX puede participar en la remodelación de la cromatina, sin embargo hasta el momento se desconoce su papel en la regulación de la expresión génica.

Evidencia experimental muestra que ATRX actúa como ATPasa dependiente de ADN y como ADN translocasa, lo cual le confiere una modesta actividad de remodelador de la cromatina *in vitro* (Xue *et al*, 2003).

Se ha propuesto que hATRX participa en la formación de la heterocromatina debido a que mediante ensayos de inmunolocalización, la forma larga de la proteína interacciona físicamente y colocaliza con la proteína "HP1a la cual se asocia a regiones heterocromáticas y es una proteína represora de la transcripción

(McDowell *et al*, 1999). hATRX también interacciona con MeCP2 y el miembro de la familia Polycomb EZH2 (Cardoso *et al*, 1998).

- ATRX y la deposición de variantes de histonas.

El reemplazo de las histonas canónicas con sus variantes contribuye a la naturaleza dinámica de la cromatina. Debido a sus diferencias entre aminoácidos y debido a sus modificaciones postraduccionales, las variantes de histonas pueden alterar la estructura de los nucleosomas, su estabilidad y su unión a proteínas efectoras. Las variantes de histonas tienen patrones únicos de localización genómica, y papeles especializados en la regulación de la expresión genética o en la segregación de los cromosomas durante la división celular (Banaszynski *et al*, 2010). Por tales razones, ha crecido el interés en la determinación de los factores que regulan su incorporación en la cromatina. Diversas evidencias señalan que ATRX juega un papel importante en la incorporación de la H3.3 y a su vez regula negativamente la asociación de la macroH2A en sitios específicos de la cromatina como se verá más adelante (Golberg *et al*, 2010; Ratnakumar *et al*, 2012).

- ATRX y su interacción con la histona H3.3

Las células de mamíferos expresan tres tipos principales de variantes (no centroméricas) de la histona H3: H3.1, H3.2 y H3.3 (Hake y Allis, 2006; Hake *et al*, 2006). Aunque la histona H3.3 difiere de la H3.2 y H3.1 en solamente 4 o 5 aminoácidos, H3.3 se enriquece específicamente en genes activos

transcripcionalmente y en elementos reguladores de las células no pluripotenciales (Ahmad y Henikoff, 2002; Jin *et al*, 2009; Mito *et al*, 2005).

La histona H3.3 se incorpora en la cromatina de manera independiente a la replicación. (Ahmad y Henikoff, 2002). Hira es una chaperona de histonas que se ha encontrado formando complejos con H3.3 y se ha visto que media su incorporación de manera independiente a la replicación (Ray-Gallet *et al*, 2002; Tagami *et al*, 2004).

Golberg y cols. (2010) han reportado los patrones de localización de las variantes de H3 en el genoma de células ES de mamífero y de células precursoras neuronales (NPC), y han establecido la dependencia e independencia de estos patrones con Hira. En dicho estudio se reportó que Hira se requiere para el enriquecimiento de H3.3 en genes activos y reprimidos en las células ES. Sorprendentemente, el enriquecimiento de H3.3 en muchos sitios de unión a factores de transcripción (TFBS) y telómeros es independiente de Hira. Para identificar los factores que median la localización de H3.3 independiente a Hira, se utilizó inmunoprecipitación y espectrometría de masas. Mediante dichos análisis se identificó a ATRX y DAXX como proteínas que específicamente se asocian con H3.3 tanto en células pluripotentes como no pluripotentes, ambas en presencia y en ausencia de Hira. En este estudio se demostró que ATRX no se requiere para la localización de H3.3 en los genes o en TFBS. Sin embargo, ATRX se requiere específicamente para el enriquecimiento de H3.3 en los telómeros de las células ES, y para la represión de la transcripción de ADN telomérico. Aquí cabe aclarar

que los repetidos teloméricos se transcriben a pesar de formar heterocromatina constitutiva (Schoeftner y Blasco, 2008).

En un estudio realizado por Wong y cols. (2010) se describió la colocalización de ATRX y H3.3 en los telómeros de células madre embrionarias (ES por sus siglas en inglés embryonic stem cells) de ratón. Además en este estudio señalan que la presencia de ATRX en los telómeros después de 12 días de inducir la diferenciación de estas células indica que ATRX no se disocia de los telómeros inmediatamente después de la pérdida de la pluripotencia celular, lo cual sugiere que esta proteína juega un papel importante en las etapas tempranas de la diferenciación celular. En este mismo estudio se demostró que la unión de ATRX en los telómeros de las ES ocurre durante la fase S/G2 del ciclo celular, está acoplada con la incorporación de H3.3 y la replicación del telómero durante la fase S del ciclo celular. Mediante ensayos de inmunofluorescencia e inmunoprecipitación en células ES, Wong y cols. (2010) han demostrado que ATRX y H3.3 interaccionan físicamente. Además, en este estudio se demostró que se reduce la colocalización de estas dos proteínas después de la mutación de la K4 de H3.3, lo cual indica que en estos sitios la deposición de H3.3 es dependiente de ATRX y DAXX (Drané *et al*, 2010; Lewis *et al*, 2010).

Como ya se ha mencionado, existen diversos reportes de que ATRX y DAXX forman un complejo (Goldberg *et al*, 2010; Xue *et al*, 2003; Tang *et al*; 2004). Drané y cols. (2010) reportan la deposición de H3.3 dependiente de ATRX y DAXX en heterocromatina pericentromérica. Se ha descrito tanto a ATRX como DAXX

enriquecidos en secuencias satélite de ADN altamente repetidas y se ha sugerido que la deposición de H3.3 en estas regiones probablemente no tiene el papel de facilitar la formación de la heterocromatina, sino que dirige la transcripción de las secuencias repetidas pericentroméricas (Drané *et al*, 2010). Evidencia reciente señala a DAXX como una chaperona directa de H3.3 (Drané *et al*, 2010; Lewis *et al*, 2010). De hecho, estudios estructurales han reportado que la glicina 90 de la H3.3 es esencial para la unión de DAXX (Elsässer *et al*, 2012; Liu *et al*, 2012).

En el caso de los telómeros, ATRX asiste a DAXX en la deposición de H3.3 potencialmente facilitando el acceso a la cromatina (Drané *et al*, 2010; Lewis *et al*, 2010). Conforme las células se diferencian, ATRX deja de localizarse en los telómeros permitiendo la formación de heterocromatina (Wong *et al*, 2009; Wong *et al*, 2010). En consonancia con estos hechos, la deposición de H3.3 dependiente de ATRX/DAXX en las regiones pericentroméricas, aparentemente favorece un ambiente dentro de la cromatina que facilita la transcripción de secuencias repetidas pericentroméricas (Drané *et al*, 2010). Sin embargo, Golberg y cols. (2010) han reportado que en ausencia de ATRX se incrementa la transcripción del ARN de secuencia repetidas de los telómeros (TERRA). Lo cual sugiere que ATRX también está involucrado en la represión transcripcional en los telómeros.

- ATRX y su asociación con la macroH2A

MacroH2A1 es una variante de la histona H2A llamada así por su largo dominio (30kDa) “macro” del extremo carboxilo terminal (Pehrson y Fried 1992). La Macro

H2A1 se encuentra enriquecida en el cromosoma X inactivo (*Xi*) de los mamíferos, y se ha postulado que juega un papel importante, pero aún desconocido, en la represión de genes en asociación con la inactivación del cromosoma X (Ladurner, 2003). Sin embargo, estudios recientes han sugerido que la macroH2A1 tiene un papel importante en la regulación de genes autosomales (Zhang *et al*, 2005).

Ratnakumar y cols. (2012) realizaron un estudio en el que buscaron factores que se encuentran involucrados en la regulación de la asociación de la macroH2A a la cromatina. En este estudio aislaron la fracción citoplásmica de extractos celulares (extractos libres de cromatina), mediante inmunoblot se comprobó la presencia de macroH2A en dichos extractos, posteriormente se inmunoprecipitó a macroH2A y se identificaron mediante espectroscopía de masas las proteínas asociadas a macroH2A. De este modo determinaron que ATRX interacciona con macroH2A. Sin embargo, no se detectó inmunoprecipitación de H3 lo cual sugiere que la interacción macroH2A-ATRX es independiente a la unión de H3. Así mismo, en este estudio se determinó que la unión con macroH2A se realiza a través de los aminoácidos 1-841 de ATRX.

Dado que previamente se ha reportado que ATRX deposita a H3.3 en los telómeros a través de su interacción con DAXX (Drane *et al*, 2010; Goldberg *et al*, 2010; Lewis *et al*, 2010). Ratnakumar y cols. (2012) mediante inmunoblot determinaron que no existe interacción entre macroH2A y DAXX, así mismo los péptidos de DAXX no fueron detectados en el análisis de espectroscopía de masas. Sin embargo, se confirmó que H3.3 interacciona con DAXX en los extractos libres

de cromatina (citoplásmicos). Por lo tanto, dichos resultados sugieren que H3.3 y macroH2A se encuentran en distintos complejos interaccionando con ATRX. Así mismo, se propone la hipótesis de que mientras que DAXX-ATRX deposita a H3.3 en la cromatina, ATRX inhibe la incorporación de la macroH2A.

Ratnakumar y cols. (2012) determinaron que la asociación de la macroH2A1 en la cromatina aumenta en células que no expresan ATRX, además mediante ensayos de ChIP (por sus siglas en inglés Chromatin immunoprecipitation) seguido de Southern blot demostraron que se incrementa la asociación de macroH2A en los telómeros de líneas celulares HEK293 y la línea de eritroleucemia K562, ambas líneas presentan niveles bajos de ATRX. Además, se determinó que la línea K562 aumenta la asociación de macroH2A en el cluster de α -globina y esto se correlaciona con la baja expresión α -globina. Estos estudios sugieren que ATRX regula negativamente la asociación de la macroH2A, y apoyan la idea de que ATRX actúa como un coactivador transcripcional de ciertos genes.

Características y función de XNP/dAtrx en *Drosophila sp.*

- Isoformas de XNP/dAtrx.

En *Drosophila* el gen *xnp/datrx*, se identificó como posible homólogo al gen hATRX. *xnp/datrx* codifica para 2 isoformas proteicas de distinto peso molecular. Una isoforma larga XNP_L/dAtrx_L de 148 kDa y una corta XNP_S/dAtrx_S de 110 kDa (Basset *et al*, 2008). La secuencia del extremo carboxilo de ambas isoformas es

homólogo (36% de identidad) a los dominios que clasifican a hATRX como parte de la superfamilia SWI/SNF. XNP/dAtrx carece de las secuencias que corresponden al extremo amino de hATRX las cuales incluyen el dominio ADD. Por otra parte, Bassett *et al* (2008) reportaron que la isoforma XNP_s/dAtrx_s comienza a traducirse a partir de un segundo codón que corresponde a la metionina ubicada en el amino ácido 266 de la proteína larga.

Emelyanov y cols. (2010) aislaron la forma nativa XNP_L/dAtrx_L y XNP_s/dAtrx_s de *Drosophila melanogaster* a partir de extractos nucleares de embriones de 0-12hrs. En este estudio determinaron que XNP_L/dAtrx_L copurifica con un complejo de 500kDa, mientras que XNP_s/dAtrx_s copurifica con un complejo de aproximadamente 200kDa.

- Proteínas con las que interacciona XNP/dAtrx.

En la siguiente tablas se enlistan las proteínas con las que hasta el momento se ha reportado que interacciona XNP/dAtrx físicamente.

Tabla 2 Proteínas con las que interacciona dAtrx.

Proteínas con las que interacciona dAtrx.				
Proteína	Isoforma de ATRX que interacciona	Método a través del cual se identificó la interacción.	Función propuesta	Referencia
HP1a	dAtr _L	GST-pulldown, Coimmunoprecipitación	Reclutar a dATR _L a heterocromatina.	Bassett <i>et al</i> , 2008
DREF	dAtr _L	Ensayos de doble híbrido, GST-pulldown, Coimmunoprecipitación, Ensayos genéticos	Esta interacción está involucrada en la expresión del gen <i>pannier (pnr)</i>	Valadez-Graham <i>et al</i> , 2012
RNA Polimerasa II	dAtr _L y dAtr _s	Inmunofluorescencia.	Regulación de la transcripción genética.	Nan <i>et al</i> , 2007

Bassett y cols. (2008) a través de pull-down y co-inmunoprecipitación reportan que la isoforma larga de XNP/dAtrx (dAtr_L) interacciona con HP1a, a través del motivo CxVxL. Adicionalmente reportan que XNP_L/dAtr_L colocaliza con HP1a en regiones de heterocromatina, incluyendo el cromocentro de cromosomas politénicos. Por otro lado, se ha reportado que la isoforma XNP_s/dAtr_s se distribuye en diferentes regiones de los brazos de los cromosomas politénicos, pero principalmente en interbandas las cuales son regiones donde hay cromatina menos densa (Bassett *et al* 2008).

Por otra parte Schneiderman y cols. (2009) mediante inmunotinciones, observaron colocalización entre XNP/dAtrx y la ARN Polimerasa II lo que implica que la proteína también está presente en zonas de eucromatina. Además, existen reportes que indican que en *Drosophila* XNP/dAtrx también colocaliza con H3.3 en sitios de intercambio de nucleosomas y en cromosomas politénicos en regiones teloméricas (Schneiderman *et al*, 2009). Si bien se observa su presencia en ambos

procesos, tanto transcripción como represión, se sugiere que está más involucrado en el silenciamiento de genes que en su activación. A pesar de todos estos avances en el conocimiento de XNP/dAtrx, se desconoce el papel exacto que juega en la regulación de la transcripción génica. Así mismo, en *Drosophila*, se conoce muy poco sobre los genes que son regulados por XNP/dAtrx y cómo esta proteína es reclutada a sus sitios blancos.

Valadez-Graham y cols. (2012) han reportado que XNP_L/Atrx_L también interacciona tanto física como genéticamente con DREF, un activador transcripcional que reconoce la secuencia consenso 5'-TATCGATA-3' y está implicado en diversos procesos, entre ellos proliferación celular. Esta interacción está involucrada en la expresión del gen *pannier* (*pnr*), el cual codifica para un factor transcripcional del tipo GATA. Esto establece una conexión entre un factor remodelador de la cromatina y un activador transcripcional en la regulación de la expresión de un gen (Valadez-Graham *et al*, 2012).

- Actividad ATPasa de XNP/dAtrx.

Emelyanov y cols. (2010) analizaron la actividad ATPasa de XNP_L/dAtrx_L. Se determinó que XNP/dAtrx tiene una actividad ATPasa basal sumamente fuerte. En ausencia de ADN o nucleosomas, la tasa de hidrólisis de ATRX es de 10 órdenes de magnitud mayor a la de la ATPasa ISWI. Esta tasa es fuertemente estimulada por la adición de HP1a. Es importante señalar que mientras que la actividad ATPasa de ISWI es altamente estimulada por la adición tanto de ADN como de

nucleosomas, la actividad ATPasa de ATRX es estimulada por ADN pero no por la adición de nucleosomas. De hecho, en ausencia de HP1a, la actividad de XNP/dAtrx es ligeramente inhibida en presencia de nucleosomas. Lo que es más, cuando se realizó el ensayo REA para determinar si XNP/dAtrx tiene la capacidad de remodelar nucleosomas *in vitro*. Se encontró que en ausencia de HP1a, XNP/dAtrx no tiene la capacidad de remodelar eficientemente templados de nucleosomas.

- Papel molecular de XNP/dAtrx en la variegación.

Una de las ventajas de utilizar a *Drosophila melanogaster* como modelo de estudio es la gran variedad de herramientas genéticas con las que se cuenta, una de éstas es el PEV (PEV por sus siglas en inglés *Position-Effect Variegation*). A continuación se relata como utilizando el PEV se ha demostrado que sobre-expresando y deletando la expresión de XNP/dAtrx se suprime el efecto PEV en el ojo de la mosca, lo cual demuestra que XNP/dAtrx es un factor esencial para el silenciamiento de genes mediante la formación de la heterocromatina (Schneiderman *et al*, 2009; Emelyanov *et al*, 2010).

La variegación por efecto de la posición (PEV) fue descubierta en 1930 en un estudio donde se indujo rearrreglos cromosomales por rayos X. Los rearrreglos que ocurren en genes originalmente localizados en la euromatina y adyacentes a regiones de heterocromatina centromérica dan como resultado una gran variedad de fenotipos ocasionados por la propagación de la heterocromatina sobre dichos genes (Girton y Johansen, 2008). El PEV también se ocasiona por inserciones del

elemento P, en este caso se inserta a los genes eucromáticos dentro de regiones de heterocromatina. Otra forma de generar PEV es mediante propiciar rearrreglos que posicionan a regiones cromosomales eucromáticas en compartimentos de heterocromatina nuclear. Más de 75 años de estudios utilizando el PEV han revelado que el PEV es un fenómeno que es consecuencia de diferencias fundamentales en la estructura y función de la heterocromatina y la eucromatina con respecto a la expresión genética (Girton y Johansen, 2008). El análisis molecular del PEV comienza con el descubrimiento de que los fenotipos de PEV son alterados por mutaciones que suprimen o aumentan la expresión de genes cuyos productos son: componentes estructurales de la heterocromatina, enzimas que modifican proteínas de la heterocromatina o bien son componentes estructurales del núcleo (Girton y Johansen, 2008).

Schneiderman y cols. (2009) para determinar *in vivo* la relación entre el remodelaje de la cromatina y el silenciamiento de genes, probaron si la sobreexpresión en el ojo de ciertos remodeladores puede alterar el silenciamiento causado por la inserción en la heterocromatina de *brownDominant (bwD)* (Henikoff S y Dreesen, 1989). Esta pieza de heterocromatina silencia al alelo *bw+* en el cromosoma homólogo y es sensible a la dosis de proteínas de heterocromatina (Sass y Henikoff, 1998). Schneiderman *et al* (2009) utilizaron el reportero *bwD* porque silencia a *bw+* en un 95% de las células de pigmento en todo el organismo y no es afectado por el marcador *mini-white* del transgen. En este estudio se dirigió la sobreexpresión de 11 remodeladores de la cromatina tipo SNF2 utilizando el sistema GAL4. De esta manera se determinó que la sobreexpresión de Ino80 y

Chd1 aumenta el silenciamiento genético, mientras que *kismet*, *Etl1* y *xnp/datrx* eliminan la represión al alelo *bwD*.

Además, Schneiderman y cols. (2009) generaron alelos portadores de deleciones para el gen *xnp/datrx* y encontraron que 4 de las mutantes nulas para *xnp/datrx* son viables y fértiles. En este estudio solo utilizaron los alelos *xnp403* y *xnp406*, estos alelos son des-represores del silenciamiento mediado por *bwD*, los organismos son completamente deficientes de XNP/dAtrx. Además, parece ser que XNP/dAtrx son modificadores generales del silenciamiento de la heterocromatina, porque los alelos *xnp403* y *xnp406* también suprimen el silenciamiento del rearreglo *In(1)wm4* (Bassett *et al*, 2008). Estos experimentos demuestran que XNP/dAtrx es requerido para el eficiente silenciamiento de la heterocromatina.

Emelyanov y cols. (2010) generaron alelos de *xnp/datrx* mediante la escisión imprecisa de un elemento P insertado en el extremo 5' de *xnp/datrx*. Todos los organismos que expresan estos alelos de forma homóciga son viables, fértiles y expresan versiones truncas de XNP/dAtrx. El alelo *xnp5* expresa la proteína con el dominio ATPasa no funcional. El alelo *xnp6* solo expresa la isoforma XNP_s/dAtrx_s con el dominio ATPasa no funcional.

Emelyanov y cols. (2010) cruzaron organismos portadores del alelo *w[m4h]*, el cual se caracteriza por que el gen *white* se localiza cerca de la heterocromatina pericentromérica debido a rearreglos del cromosoma X, con organismos portadores de los alelos de *xnp/datrx* generados por Emelyanov y cols. (2010). En este estudio

se reporta que todos los alelos son supresores de la variegación de *white*. En este estudio se propone que XNP/dAtrx debe tener in papel general en la represión transcripcional mediante la formación de la heterocromatina. Consistente con dicha hipótesis, Emelyanov *et al* (2010) encontraron que XNP/dAtrx también se requiere para el silenciamiento eficiente de inserciones teloméricas y arreglos en tándem de transgenes. Por otro lado, mutaciones de *xnp/datrx* no suprimen la variegación de los transgenes *white* o *yellow* insertados en regiones de cromatina pericentromérica del 2do o 3er cromosoma.

- Papel molecular de XNP/dAtrx en la formación de heterocromatina y eucromatina.

Emelyanov y cols. (2010) estudiaron mediante inmunofluorescencia el patrón de localización de XNP/dAtrx en los cromosomas politénicos de la glándula salival de *Drosophila melanogaster*. Mediante este estudio, reportaron que los anticuerpos contra XNP/dAtrx dan señal en aproximadamente 200 *loci* específicos ubicados en regiones de eucromatina de los brazos de los cromosomas politénicos. Sin embargo, en este estudio se reporta que la mayoría de las señales de inmunofluorescencia se concentran cerca de la heterocromatina pericentromérica.

Una mayor resolución de la tinción con anti-XNP/dAtrx de los cromosomas politénicos revela que la señal de inmunofluorescencia más prominente ubicada en el pericentro de los cromosomas se puede mapear exclusivamente en la región 20B-

F cercana a la heterocromatina pericentromérica del cromosoma X. Esta región citogénica representa una porción distal de la heterocromatina beta y colocaliza con HP1a. Tanto la señal de XNP/dAtrx como la de HP1a no se encuentran presentes en esta región en cromosomas politénicos de larvas homócigas para el alelo *xnp6* que solo expresa a XNP_s/dAtrx_s. Estos resultados indican que XNP_L/dAtrx_L, pero no XNP_s/dAtrx_s se localizan en la región 20B-F cercana a la heterocromatina pericentromérica del cromosoma X y además que XNP_L/dAtrx_L es necesaria para la incorporación de HP1a en esta región (Emelyanov *et al*, 2010).

Schneiderman y cols. (2009) mediante inmunofluorescencia encontraron que la mayor parte de XNP/dAtrx de *Drosophila* en células diploides del disco de ala se localiza en un solo foco dentro del núcleo, siempre adyacente a la heterocromatina. Así mismo, encontraron a XNP/dAtrx en eucromatina del disco de ala. Para examinar la localización XNP/dAtrx con mayor resolución, examinaron a los cromosomas politénicos de las glándulas salivales y también encontraron a XNP/dAtrx concentrado en un punto cerca del cromocentro de heterocromatina. De igual forma, encontraron a gran parte de XNP/dAtrx en las regiones de eucromatina de los brazos de los cromosomas politénicos.

Schneiderman y cols. (2009) cotiñeron a XNP/dAtrx y a la Polimerasa II de ARN (Pol II) y observaron que ambas señales colocalizan considerablemente entre las dos proteínas en la eucromatina. Sin embargo, aunque todos los sitios de Pol II colocalizan con los sitios de XNP/dAtrx, un número limitado de sitios marcados por XNP/dAtrx no colocalizan con la Polimerasa II. Éste es el caso del foco cercano al

cromocentro. Schneiderman y cols. (2009) caracterizaron este foco y encontraron que coincide con bloques de secuencias satélite de 50kb formadas por la secuencia TAGA, este bloque se localiza cerca de la heterocromatina del cromosoma X. Aunque las secuencias de este bloque son repeticiones simples, no se encuentran enriquecidas de HP1. Lo que es más, estos bloques se tiñen pobremente con DAPI pero se encuentran enriquecidas en la acetilación de la K9 H3. Schneiderman y cols. (2009) probaron mediante ensayos genéticos que el foco de XNP/dAtrx es un elemento genético funcional que puede contribuir al silenciamiento de genes en el núcleo.

ATRX y cáncer

Estudios recientes han mostrado que la expresión de *ATRX* y su función se encuentra regulada anormalmente en diversos tipos de cánceres (Gibbons *et al*, 2003; Haas *et al*, 2009; Steensma *et al*, 2009; Elsasser *et al*, 2011; Jiao *et al*, 2011). Las mutaciones en el dominio PHD de esta proteína exacerbaban el fenotipo de hematopoyesis en pacientes que tienen el síndrome mielodisplásico (Gibbons *et al*, 2003). Adicionalmente, recientemente se ha reportado que pacientes que tienen leucemia mieloide aguda presentan patrones anormales de expresión del gen *ATRX* (Serrano *et al*; 2006). Lo que es más, pacientes con leucemia mieloide que presentan niveles reducidos de hATRX también tienen anormalidades cariotípicas (Serrano *et al*; 2006). Un análisis de mutaciones somáticas mediante secuenciación masiva en tumores humanos reveló la presencia de mutaciones puntuales en proteínas remodeladoras de la cromatina, incluyendo *ATRX*, en tumores

neuroendócrinos pancreáticos (Elsasser *et al*, 2011; Jiao *et al*, 2011). Esto ocasiona que DAXX y ATRX pierdan su función en un 43% de los cánceres analizados, los cuales se caracterizan por presentar una alta inestabilidad cromosómica (Jiao *et al*, 2011).

En ausencia de la actividad de la telomerasa, los telómeros se acortan durante cada división celular, ocasionando senescencia. Sin embargo, el desarrollo del cáncer humano se asocia con la activación del sistema de formación de telómeros en el que la telomerasa tiene un papel principal. Aunque en la mayoría de los cánceres la reactivación de la telomerasa es el mecanismo más común para la adición de secuencias repetidas en los telómeros, una cantidad significativa de tumores humanos emplea la vía de mantenimiento de telómeros independiente a la telomerasa, el cual se conoce como ALT (ALT por sus siglas en inglés Alternative Lengthening of Telomeres Pathway). Se cree que aproximadamente entre un 10 a un 15% de los cánceres humanos usan la vía ALT. Lovejoy y cols. (2012) realizaron un estudio que tenía como objetivo caracterizar las alteraciones genéticas y sus fenotipos asociados de 22 líneas celulares; 19 de estas líneas se derivan de experimentos *in vitro* de inmortalización y las otras 4 provienen de tumores humanos (3 osteosarcomas y 1 de un adenocarcinoma de pulmón). En dicho estudio se comprobó la ausencia de actividad telomerasa mediante un ensayo de TRAP. En este estudio se confirmó mediante Western blot e inmunofluorescencia la pérdida de ATRX y/o DAXX en un 90% de las líneas ALT inmortalizadas, lo cual sugiere que la inactivación de ATRX es un paso fundamental para la generación del fenotipo ALT. Además, reportan que estas líneas celulares se caracterizan por una

inestabilidad genómica, formación de micronúcleos, un punto de control aberrante entre la fase G2 y M de la mitosis, y una cinética anormal en la reparación de DSB (por sus siglas en inglés *double-strand break*).

Drosophila melanogaster como modelo de estudio del cáncer.

Dado que como ya se ha señalado muchas de las funciones que tiene ATRX en vertebrados se conservan en organismos como *Drosophila melanogaster*, en este trabajo se propone utilizar a este organismo como modelo de estudio para dilucidar la relación que guarda ATRX y el cáncer. Esta propuesta surge por que más adelante expondremos resultados que demuestran que bajo ciertas condiciones alterar los niveles de expresión de *xnp/datrX* en *Drosophila* ocasiona que el organismo desarrolle masas melanóticas. Cabe señalar que organismos que tienen una vida corta como *Drosophila melanogaster* no desarrollan cáncer de manera natural, debido a que el número de divisiones celulares que ocurren durante su vida es significativamente menor al que el ser humano necesita para mantener sus tejidos durante largos periodos de tiempo (Tipping y Perrimon, 2014). Sin embargo, diversos estudios han demostrado que las células de *Drosophila* pueden exhibir características clásicas de cáncer, cuando genes relacionados con el cáncer son perturbados, tales como: evadir la apoptosis, proliferar de forma sostenida, metástasis, sobrevivir de manera prolongada, presentar inestabilidad del genoma y sufrir reprogramación metabólica (Hanahan y Weinberg, 2000, 2011; Luo *et al*, 2009).

Durante los últimos años, *Drosophila* se ha perfilado como un organismo que sirve de modelo para la identificación de genes relacionados con el cáncer (revisado en Tipping y Perrimon, 2014). Gracias al uso de estos organismos se han descubierto muchos de los mecanismos moleculares utilizados por las proteínas relacionadas con el cáncer, esto se ha logrado gracias a que al utilizar este organismo como modelo se dispone de una amplia variedad de herramientas genéticas que permiten identificar a cada uno de los miembros de las diversas las vías de señalización (Tipping y Perrimon, 2014).

Algunos de los estudios en los que se utiliza a *Drosophila* como modelo de estudio del cáncer, se observa que el organismo desarrolla masas melanóticas. Desde hace medio siglo, las masas melanóticas en larvas y adultos de *Drosophila* se ha visto como el equivalente de los tumores cancerígenos que aparecen en humanos (Minakhina y Steward, 2010). Como se detallará mas adelante la formación de masas melanóticas es un sistema de defensa que naturalmente utiliza *Drosophila* para hacer frente a la presencia de parásitos; sin embargo varios estudios realizados en los últimos años han comprobado que cuando en *Drosophila* se muta genes relacionados con ciertos tipos de cáncer de humano se ocasiona la formación de masas melanóticas en *Drosophila* (revisado en Tipping y Perrimon, 2014).

- Hematopoyesis en *Drosophila*

La generación de masas melanóticas involucra problemas en la diferenciación de células hematopoyéticas en las moscas. *Drosophila* tiene un sistema circulatorio abierto donde la hemolinfa fluye en la cavidad corporal (llamada hemocele). En *Drosophila*, como en otros invertebrados, la hematopoyesis ocurre en dos fases. En la primera fase, la fase primitiva, durante la etapa embrionaria los prohemocitos son producidos en el mesodermo y a partir de ellos se diferencian las células circulantes sanguíneas. Durante la segunda fase, la fase definitiva, los prohemocitos son producidos en un pequeño órgano: la glándula linfática. La glándula crece durante el desarrollo de la larva como un órgano multilobulado a lo largo del tubo del corazón. El lóbulo anterior, el lóbulo primario, es el más largo. Éste consiste de al menos tres compartimentos: la zona medular (MZ), la zona cortical (CZ) y el centro posterior de señalización (PSC) (Crozatier y Meister, 2007; Jung *et al.*, 2005; Meister, 2004; Minakhina y Steward, 2010).

Durante el desarrollo, prohemocitos se diferencian en plasmocitos, células cristal, y lamelocitos. Los plasmocitos son el tipo predominante de hemocitos, tienen funciones fagocíticas y secretan componentes de la matriz extracelular, así como péptidos similares a los de las células blancas humanas del torrente sanguíneo. Los lamelocitos son raros en condiciones normales, pero bajo un reto inmunológico incrementan su número y funcionan en la encapsulación de cuerpos foráneos o parásitos. Las células cristal son hemocitos no adhesivos responsables de la melanización durante la encapsulación de parásitos. Durante el inicio de la

metamorfosis o como parte de una reacción inmune la glándula linfática revienta y los hemocitos diferenciados son liberados en la hemolinfa (Markus *et al.*, 2009).

- Respuesta inmune en *Drosophila* ante una invasión parasitaria

Como ya se mencionó en un organismo sano, no hay lamelocitos (Lanot *et al.*, 2001; Honti *et al.*, 2014). Sin embargo, *Drosophila* es naturalmente infectada por avispas de la especie *Leptopilina boulardi*, las cuales dejan sus huevos en las larvas de las moscas. Una infección parasitaria es reconocida por los plasmocitos circulantes, los cuales se unen a la superficie del huevo del parásito. Estos plasmocitos pueden diferenciarse en lamelocitos, y de esta manera inician la reacción de encapsulación (Stofanko *et al.*, 2010; Honti *et al.*, 2010). Estos parecen comunicarse con la glándula linfática. Parece ser que el ligando Spitz del receptor EGFR está involucrado en la señalización de la glándula linfática con los hemocitos sésiles y circulantes para la diferenciación a lamelocitos (Krzemień *et al.*, 2007; Lanot *et al.*, 2001; Sinenko *et al.*, 2011; Markus *et al.*, 2009). Los lamelocitos maduros son células largas, aplanadas que atacan a los parásitos a fin de encapsularlos (Sorrentino *et al.*, 2009). Una vez formada la cápsula la célula es melanizada por las células cristal, lo cual induce una cascada de fenoxidación llevando a la síntesis de melanina y especies reactivas de oxígeno (Honti *et al.*, 2014). La encapsulación del huevo de avispa evita su eclosión y permite la supervivencia de la mosca.

- La hematopoyesis en *Drosophila* y las vías de señalización que la controlan.

Un diverso número de genes y vías regulan la hematopoyesis en *Drosophila*. Por ejemplo, mutaciones en proteínas tales como los factores GATA, el factor Bcell (EBF)/Collier, Ras, NF- κ B, Notch, JAK/STAT, y Wingless pueden resultar en la sobre-proliferación de hemocitos o la pérdida de la diferenciación de tipos celulares específicos (Agaisse y Perrimon, 2004; Gao *et al.*, 2009; Krzemien *et al.*, 2007; Lebestky *et al.*, 2003; Sinenko *et al.*, 2004).

Actualmente se sabe que diversas vías de señalización controlan la proliferación y diferenciación de los prohemocitos. Por ejemplo, una mutación de ganancia de función del gen *hopscotch* (*hop*) perteneciente a la familia de las proteínas JAK causa proliferación de las células sanguíneas lo que ocasiona la formación de tumores melanóticos en la glándula linfática (Hanratty y Dearolf, 1993; Harrison *et al.*, 1995). Estos fueron los primeros estudios en demostrar que la desregulación de la vía de señalización JAK/STAT puede resultar en tumorigénesis, y fue uno de los precedentes que llevaron a descubrir que la proteína humana JAK se encuentra sobreexpresada en los pacientes que tiene leucemia (Lacronique *et al.*, 1997). A partir de este hallazgo inicial se ha encontrado que las vías de señalización Hh (“Hedgehog”), Wg (por las siglas en inglés “Wingless”) y JNK (quinasas c-Jun N-terminal) funcionan como reguladores de la diferenciación de los prohemocitos (Mandal *et al.*, 2007; Owusu-Ansah y Banerjee, 2009; Sinenko *et al.*, 2009). Se ha

demostrado que la vía de señalización Wg promueve la proliferación de los prohemocitos y evita su diferenciación (Sinenko *et al*, 2009). Se llegó a esta conclusión mediante estudios que demostraron que la inhibición de la señalización de Wg ocasiona la presencia de menor cantidad de prohemocitos en los PSC que los que se observan en organismos control, así mismo el incremento de la activación de la señalización de Wg produce un incremento en la cantidad de prohemocitos en los PSC (Sinenko *et al*, 2009). Se ha observado que la vía Hh tiene un papel similar al de la vía Wg (Mandal *et al*, 2007). La pérdida de señalización de la vía Hh ocasiona la diferenciación de los precursores de los hemocitos y por lo tanto una pérdida de los PSC (Mandal *et al*, 2007). Owusu-Ansah y Banerjee (2009) encontraron que las especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés reactive oxygen species) juegan un papel importante en la inducción de la diferenciación de los prohemocitos, y median este efecto a través de la vía de señalización de JNK.

A partir de estos hallazgos se puede concluir que *Drosophila* está emergiendo como un modelo prometedor para estudiar la relación entre el cáncer y el sistema inmune (Bangji, 2013). A continuación nos centraremos en describir la vía JAK/STAT y su participación en el sistema inmune de *Drosophila*, así mismo se citarán los trabajos que describen como la alteración de los niveles de expresión de genes que participan en esta vía ocasiona tumorigénesis en el organismo. Este tema es de interés para este trabajo debido a que el gen *pannier* (*pnr*) es uno de los componentes principales de esta vía, estudios realizados por Valadez-Graham y cols. (2012) han demostrado que XNP/dAtrx participa en regular la expresión de este gen.

- La vía JAK/STAT en *Drosophila*.

La vía JAK/STAT de *Drosophila* tiene esencialmente los mismos componentes que en los mamíferos, pero con menos redundancia. En *Drosophila*, los ligandos hasta ahora conocidos de la vía JAK/STAT solamente son tres proteínas que comparten cierto parecido con las citoquinas llamadas “unpaired” (Upd) (Harrison *et al*, 1998), Upd2 (Gilbert *et al*, 2005; Hombría *et al*, 2005) y Upd3 (Agaisse *et al*, 2003; Wright *et al*, 2011). Los genes que codifican las moléculas Upd están agrupados en el genoma de *Drosophila* en el cromosoma X y no tienen homólogos obvios fuera de las especies de *Drosophila*, pero comparten algunas similitudes con las leptinas de los vertebrados (Harrison *et al*, 1998; Hombría *et al*, 2005). Upd se asocia a la matriz extracelular (Harrison *et al*, 1998), mientras que Upd2 es soluble y capaz de difundir libremente. Las tres moléculas Upd se inducen localmente en respuesta al daño del tejido, la expresión de Upd3 se induce en los hemocitos adultos después de la infección bacteriana, mientras que tanto Upd2 y Upd3 son inducidos en respuesta a infecciones virales, lo cual sugiere que múltiples mecanismos de regulación controlan la expresión genética de estos genes (Agaisse *et al*, 2003; Wright *et al*, 2011; Pastor-Pareja *et al*, 2008; Kemp *et al*, 2013).

Las tres moléculas Upd se acoplan a la vía a través de un solo receptor: Domeless (Dome), el cual comparte similaridad funcional y de secuencia con los receptores de citoquina clase I, tales como el receptor IL-6, ambos tienen dominios extracelulares tipo III de fibronectina y un módulo de unión a citoquina (CBM) (Brown *et al*, 2001; Chen *et al*, 2002). Lo que es más, *Drosophila* tiene solamente una

molécula tipo JAK: hopscotch (Hop) (Perrimon *et al*, 1986; Binari *et al*, 1994), y solamente un factor de transcripción tipo STAT: Stat92E (Hou *et al*, 1996; Yan *et al*, 1996). Hopscotch comparte similitud de secuencia con JAK2 y Stat92E comparte similitud de secuencia con STAT5, las cuales son requeridas para mediar la respuesta de IL-3, IL-5 y IFN- γ , diversos factores de crecimiento hematopoyéticos, tales como el factor estimulador de colonia de granulocitos-macrofagos (GM-CSF) y eritropoietina (EPO), así como la hormona de crecimiento (GH) y prolactina (Parganas *et al*, 1998; Kiu *et al*, 2012).

Se piensa que la activación de la vía JAK/STAT de *Drosophila* sigue un modelo similar al que se ha descrito en mamíferos [Figura 8]. De acuerdo al modelo, la unión de una citoquina al receptor induce la dimerización del receptor y la activación de JAKs que están constitutivamente asociadas con el extremo citoplásmico del receptor. Las JACKs activadas se fosforilan una a otra en sitios específicos de residuos de tirosina en la parte citoplásmica del receptor, la cual actúa como sitio de acoplamiento para los dominios SH2 (por sus siglās en inglés Src homology 2) de las moléculas STAT. Los residuos tirosina de las moléculas STAT también son fosforilados por JAKs, lo cual les permite formar dímeros y ser translocados al núcleo, donde se unen a los promotores de los genes blanco (Kiu *et al*, 2012). En *Drosophila*, Stat92E es fosforilada en Tyr-704, y la secuencia consenso de unión es TTCCCGGAA (Chen *et al*, 2002; Yan *et al*, 1996; Brown *et al*, 2003).

Dado que la vía JAK/STAT está involucrada en múltiples procesos biológicos, la señalización necesita estar estrictamente controlada a diferentes niveles de la cascada tanto en *Drosophila* como en mamíferos. Tal como en los componentes de la vía, muchos de los reguladores muestran alta conservación en la evolución (Agaisse, 2004). Adicionalmente a la identificación de los reguladores de la vía de *Drosophila* JAK/STAT basada en la homología, se ha hecho una investigación intensa realizando tamizajes genéticos que ha llevado al descubrimiento de nuevos reguladores (Baeg *et al*, 2005; Bach *et al*, 2003; Müller *et al*, 2005; Kallio *et al*, 2010; Grönholm *et al*, 2012).

En mamíferos, la vía de señalización JAK/STAT es regulada por la proteína gp130 a nivel del receptor del transductor de señal de membrana, la cual es utilizada por miembros de la familia de receptores IL-6. gp130 media la señalización al formar complejos con los receptores de citoquina que se han unido a sus ligandos, mientras que su dominio citoplásmico se une a proteínas que forman parte de la vía JAK. Por otro lado, la forma soluble de gp130 es capaz de secuestrar los ligandos y por ello inhibir la señalización (Narazaki *et al*, 1993). En *Drosophila*, una proteína que se parece a gp130 y al receptor Dome de la vía JAK/STAT, regula la actividad de señalización de esta vía. ET (por sus siglas en inglés: “Eye transformer”, también llamado latran) está localizado cerca de Dome en el genoma de *Drosophila* y las dos moléculas comparten similitud en estructura, pero ET tiene un extremo citoplásmico que carece del sitio de unión a Stat92E que se encuentra en la parte citoplásmica de Dome. ET se asocia con el complejo del receptor, interactuando tanto con Dome y Hop, y parece ser plausible que ET inhibe la señalización

intracelular (Kallio *et al*, 2010; Makki *et al* 2010). Sin embargo, aún se desconoce la función de los módulos de unión a citoquina que se encuentran en la región extracelular de ET.

El bucle de retroalimentación negativa es un mecanismo clásico de regulación de señales. En la vía de señalización JAK/STAT de mamíferos esta tarea la efectúan las proteínas supresoras de señalización de citoquinas (SOCS), para las cuales los humanos tienen 8 genes (SOCS1-7 y CIS) (Starr *et al*, 1997; Inagaki–Ohara *et al*, 2014). Este mecanismo también se encuentra en *Drosophila*, cuyo genoma codifica tres miembros de la familia, Socs16D, Socs36E y Socs44A. Socs16D no tiene un papel conocido en la regulación de la vía JAK/STAT; mientras que Socs44 parece regular la señalización de la vía JAK/STAT de alguna forma aunque no es un blanco transcripcional de Stat92E (Rawlings *et al*, 2004; Stec y Zeidler, 2011). El principal bucle de retroalimentación negativa de esta vía en *Drosophila* es Socs36E, el cual está más relacionado con SOCS5 de mamíferos y está fuertemente inducido por la vía de señalización JAK/STAT (Callus *et al*, 2002; Karsten *et al*, 2002). Como en las proteínas SOCs de mamíferos, Socs36E tiene un dominio SH2 central el cual en mamíferos se une a residuos de tirosina fosforilados y también tiene una caja SOCS del dominio C terminal que interactúa con las enzimas de la maquinaria de ubiquitinación (Inagaki–Ohara *et al*, 2013). Recientemente, el mecanismo molecular de inhibición de Socs36E fue caracterizado detalladamente, demostrando que Socs36E utiliza ambas formas de acción para regular negativamente la vía de señalización JAK/STAT. Primeramente, Socs36E funciona a través de la caja SOCS mediante un mecanismo que involucra

el complejo ubiquitina ligasa E3 (ECS, por sus siglas en inglés Elongin-Cullin-SOCS).

Las proteínas ESC de *Drosophila*: Elongina B, Elongina C y Cullin-5 actúan para regular el tráfico endocítico y la degradación lisosomal de Dome, por ello afectan los niveles del receptor (Stec *et al*, 2013; Vidal *et al*, 2010). Adicionalmente, Socs36E es capaz de regular negativamente tanto la actividad basal e inducida de ligandos de la vía JAK/STAT. Esta regulación negativa tiene lugar a través de un mecanismo independiente que requiere del dominio SH2 y el extremo N terminal de Socs36E y la interacción con Dome, y de esta manera inhibe la fosforilación del receptor mediante Hop (Stec *et al*, 2013). Otro regulador negativo que funciona a nivel cinasa es la proteína tirosina fosfatasa Ptp61F, la cual fue identificada en dos tamizajes separados de ARNi. Ptp61F es un blanco transcripcional de la vía JAK/STAT, y por lo tanto también funciona a través de un bucle de retroalimentación negativa, presumiblemente mediante activar Hop (y posiblemente también a Stat92E (Baeg *et al*, 2005; Müller *et al*, 2005).

La actividad, localización y habilidad de unión a ADN de Stat92 también está sujeto a regulación. Los homólogos de *Drosophila* de RanBP3 (por sus siglas en inglés “Ran binding protein 3”) y RanBP10 regulan negativamente la señalización de JAK/STAT mediante controlar la señal dependiente del transporte nuclear de Stat92E (Baeg *et al*, 2005). La unión de Stat92E a ADN es positiva y negativamente regulada por diversas moléculas. La CNOT4 (CCR4-NOT transcription regulation complex subunit) de humanos parece regular la respuesta de genes mediada por

STAT, y también el homólogo de *Drosophila*, llamado Not4 es necesario para la unión apropiada de Stat92E al ADN (Grönholm *et al*, 2012). En mamíferos, se ha demostrado que las PIAS (por sus siglas en inglés Protein Inhibitors of Activated STATs) se unen a dímeros de STAT fosforilados en tirosina (pero no se une a STAT monoméricos no fosforilados) y por ello bloquean su unión a ADN (Chung *et al*, 1997).

Drosophila tiene solamente un gen *pias*, cuya importancia en la regulación negativa de la vía JAK/STAT ha sido estudiada *in vivo*, se ha demostrado que es crucial para mantener la proporción correcta de dPias/Stat92E para el desarrollo del ojo. Se ha demostrado que dPias interactúa con Stat92E activada, sugiriendo que tiene una función molecular similar a la de sus homólogos en mamíferos (Betz *et al*, 2001). Se ha demostrado que las proteínas PIAS de mamíferos actúan como ligasas tipo E3 de moléculas SUMO (por sus siglas en inglés Small ubiquitin-like modifier) en varios blancos proteicos, incluyendo STAT1, estos estudios muestran que la actividad STAT es inhibida por sumoilación (Ungureanu *et al*, 2003). Lo que es más, se ha demostrado que la actividad de Stat92E de *Drosophila* es regulada negativamente por sumoilación en la Lys187 (Grönholm *et al*, 2010).

Ken & Barbie (Ken) es un ortólogo de BCL6 (por sus siglas en inglés proto-oncogene B-Cell Lymphoma 6) en mamíferos, con un dominio BTB/POZ en el extremo amino y tres dedos de zinc C2H2 en el extremo carboxilo. En células en cultivo BCL6 puede actuar como represor de los genes cuya expresión depende de STAT6 (Harris *et al*, 2005). En *Drosophila*, un subgrupo de promotores de genes

blanco de Stat92E contiene sitios de unión a Ken el cual coincide con los sitios de Stat92E, sujetando estos genes a la regulación negativa de Ken, mientras que la expresión de los otros genes blanco de Stat92E permanecen sin ser afectados (Baeg *et al*, 2005; Arbouzova *et al*, 2006). Se ha encontrado que el homólogo de *Drosophila* de la proteína BRWD3, que contiene el bromo-dominio, regula la señalización positiva de JAK/STAT *in vivo*, pero el mecanismo molecular permanece sin ser decifrado (Müller *et al*, 2005). El mismo estudio también identifica un gen llamado *diedel* como un potencial regulador negativo de la vía JAK/STAT (Müller *et al*, 2005; Coste *et al*, 2012).

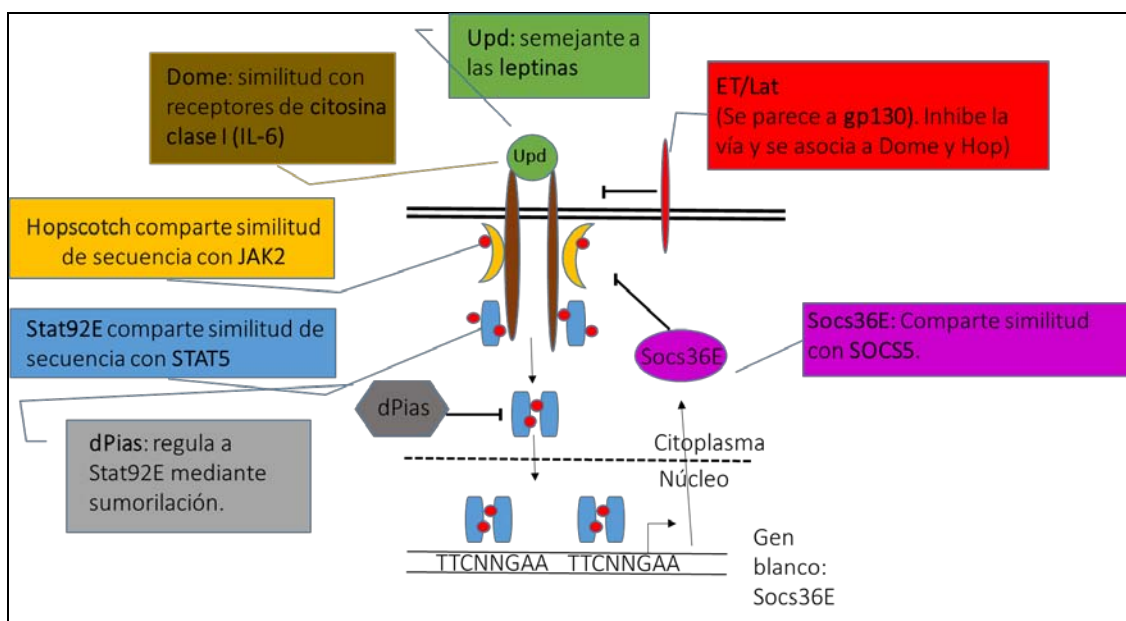


Figura 8 Vía JAK/STAT en *Drosophila sp.*

- El proceso de diferenciación de lamelocitos, la vía JAK/STAT y su relación con la formación de masas melanóticas.

Los eventos exactos de señalización y los mecanismos que se necesitan para inducción de la diferenciación de los lamelocitos en la glándula linfática aún no se entienden del todo. Sin embargo, se ha demostrado que la vía de señalización JAK/STAT juega un papel importante en el proceso. Generalmente, la pérdida de función de los componentes de la vía JAK/STAT resulta en una pérdida de capacidad de la encapsulación y se reduce la capacidad de respuesta de la glándula linfática (Sorrentino *et al*, 2004). Por otra parte, la activación aberrante de la vía JAK/STAT (o Toll) en ausencia de infección parasitaria induce diferenciación prematura de lamelocitos. Esto lleva a la acumulación y la formación subsecuente de tumores melanóticos debido a que el material del hospedero se encápsula por estas células (Luo *et al*, 1995; Sorrentino *et al*, 2004; Wertheim *et al*, 2005). Ejemplos genéticos de dicha situación incluye alelos hiperactivos de *hop* de *Drosophila*, por ejemplo el alelo sensible a la temperatura *Tumorous-lethal* (*hopTum-1*). El mismo fenotipo se observa con otros alelos hiperactivos de la vía JAK/STAT, así como la sobre-expresión de *hop* en la glándula linfática (Luo *et al*, 1995; Harrison *et al*, 1995; Ekas *et al*, 2010). El equivalente mamífero es una mutación de ganancia de función de JAK2 en humanos que causa desórdenes mieloproliferativos (Casanova *et al*, 2012). Sin embargo, en la glándula linfática, Upd3 es secretado para mantener a PSC en un nivel basal de la señalización de JAK/STAT en prohemocitos en la zona medular para mantenerlos en un estado de

indiferenciación. A fin de inducir la diferenciación de lamelocitos en respuesta a la infección parasitaria, la señalización JAK/STAT en las PSC es regulada negativamente por la baja de expresión de *dome* y *upd3* (Makki *et al*, 2010; Krzemień *et al*, 2007). La actividad residual de la vía de señalización JAK/STAT en los prohemocitos es apagado por ET, cuya expresión es regulada positivamente en respuesta a la infección parasitaria por avispas (Makki *et al*, 2010; Wertheim *et al*, 2005). Por ello, mantener la homeostasis entre la proliferación de hemocitos y la diferenciación parece ser algo complejo y requiere un nivel cuidadosamente controlado de señalización de JAK/STAT (Honti *et al*, 2014).

Un estudio realizado por Minakhina y cols. (2011) probó que Stat92E controla la maduración de plasmocitos en la CZ. Se llega a esta conclusión debido a que la reducción de la expresión de *Stat9e* utilizando ARNi en la zona cortical ocasiona mayor diferenciación de plasmocitos y células cristal. Lo cual no sucede si se altera la expresión de *Stat9e* mediante la expresión de ARNi en la MZ. Por otro lado, la sobre-expresión de *Stat9e* induce la activación del programa de formación de lamelocitos.

Además, en el estudio de Minakhina y cols. (2011) se sugiere que Stat9 regula la expresión de *pnr* quien a su vez controla la diferenciación de plasmocitos. Se llega a dicha conclusión debido a que cuando se expresa *pnr* ARNi en la CZ disminuye drásticamente la diferenciación de plasmocitos y células cristal. Por otra parte, la sobre-expresión de *pnr* afecta la proliferación de hemocitos y bloquea la diferenciación de plasmocitos en CZ. Además, en este estudio señalan que el *locus*

de *pnr* tiene varios sitios de unión de STAT. Finalmente, el análisis de *pnr*-LACZ demostró que la expresión de *Stat9e*-ARNi bloquea la expresión de *pnr* en las células de la glándula linfática de larvas del 3^{er} *instar*.

Estos resultados son de nuestro interés debido a que Valadez-Graham y cols. (2012) han reportado que dAtr_L interacciona tanto física como genéticamente con DREF, un activador transcripcional que reconoce la secuencia consenso 5'-TATCGATA-3', ya que esta interacción está involucrada en la expresión del gen del factor tipo GATA *pannier* (*pnr*) (Valadez-Graham *et al*, 2012). En vertebrados se ha demostrado que *pnr* es un regulador importante de la hematopoyesis y el desarrollo del corazón (Qian y Bodmer, 2009).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Como ya se ha mencionado, la proteína ATRX se encuentra altamente conservada a lo largo de la evolución, está presente desde *Caenorhabditis elegans* hasta humanos, pero en invertebrados únicamente conserva el dominio SNF2 (Sun *et al*, 2006). La importancia de la proteína ATRX se ve reflejada en el hecho de que tanto en mamíferos como en invertebrados se expresa durante todo el desarrollo embrionario y está implicada en la diferenciación de diversas estructuras del embrión como: el cerebro posterior, la retina y el testículo (Bérubé *et al*, 2005; Medina *et al*, 2009; Bagheri-Fam *et al*, 2011). Tanto en mamíferos como en invertebrados se le ha implicado tanto en la transcripción como en la represión de genes (Schneiderman *et al*, 2009). Y en diversas ocasiones se ha propuesto que una de las maneras mediante las que actúan como represor transcripcional es a través de favorecer la formación y mantenimiento de heterocromatina, evidencias que apoyan esta hipótesis es que en *D. melanogaster* cuando se elimina la expresión de *datrx* se suprime el efecto de PEV (Schneiderman *et al*, 2009). Otra evidencia que apoya esta idea es que en mamíferos se ha demostrado que interacciona con EZH2 y MeCP2 (Cardoso *et al*, 1998; Nan *et al* 2007), mientras que tanto en mamíferos como en invertebrados se ha demostrado que ATRX interacciona físicamente con HP1a (Eustermann *et al*, 2011; Bassett *et al*, 2008). Eustermann y cols. (2011) han propuesto un modelo en el que ATRX y HP1a cooperan activamente para mantener la heterocromatina, según esté modelo: el dominio ADD de la proteína hATRX, reforzado por la interacción con HP1a, reconoce a la heterocromatina pericentromérica. Una vez que hATRX es reclutado

su dominio helicasa/ATPasa dirige la deposición de la variante de histonas H3.3. Cabe destacar que en este modelo el dominio ADD de ATRX juega un papel fundamental en la función que esta proteína tiene en el mantenimiento de la cromatina, debido a que experimentos *in vivo* realizados por Eusternmann y cols. (2011) demuestran que mutaciones en el dominio ADD (que evitan que dicho dominio reconozca H3K4me0K9me3) ocasionan que hATRX no se localice en la heterocromatina pericentromérica y por lo tanto no puede participar en el mantenimiento de la misma. Dada la importancia de la participación del dominio ADD en la localización de ATRX en la heterocromatina y como consecuencia en la función de hATRX en dichas regiones, hemos planteado la siguiente hipótesis:

En los invertebrados la ausencia del dominio ADD en los homólogos de hATRX sugiere que estas proteínas participan en el control de la expresión genética a través de interacciones proteína – proteína con otras moléculas que si tienen dominios de unión a ADN o cromatina.

Para probar esta hipótesis se realizó una búsqueda bioinformática en el banco de datos del genoma de *Drosophila*, a fin de determinar si existen otras proteínas en la mosca que contengan el dominio ADD que complementen la ausencia de este motivo en dAtrx. En el laboratorio se identificó que el Gen CG8290 (el cual recientemente ha sido llamado *dadd1* (Alekeseyenko *et al*, 2014)) de *Drosophila melanogaster*, codifica isoformas proteicas generadas por “splicing” alternativo que tienen el dominio ADD. Al menos dos evidencias generadas en el laboratorio nos indicaban que las proteínas dAdd1 podrían estar interaccionando con dAtrx:

- a) Mediante el método de homología, se realizó la predicción de la estructura tridimensional del dominio ADD de las proteínas dAdd1. Este análisis confirma que el dominio ADD de dAdd1 tiene mayor semejanza estructural con el dominio ADD de hATR_X que con respecto al dominio ADD de las DNMTs (Figura 3) (Meyer, tesis de maestría, 2012).
- b) Por medio de inmunotinciones de cromosomas politénicos de glándulas salivales de larvas del 3^{er} instar se determinó la colocalización de dAdd1 con dAtr_{XL} en ciertas regiones de la cromatina (Neumann-Mondlak, tesis de licenciatura, 2010).

OBJETIVO GENERAL

Durante alguna(s) etapa(s) del desarrollo de *Drosophila melanogaster* en la cuál se exprese tanto *dadd1* como *xnp/datrx*, determinar si las proteínas dAdd1 interaccionan física y/o genéticamente con XNP/dAtrx participando en los mismos procesos. Así mismo, determinar si esta interacción es necesaria para la función de ésta última.

Objetivos particulares.

1° Analizar el patrón de expresión de las isoformas de dAdd1 durante el desarrollo de *Drosophila melanogaster*.

2° Determinar si las proteínas dAdd1 interaccionan físicamente con XNP/dAtrx (*in vivo* e *in vitro*).

2° Determinar que dominios proteicos son esenciales para que dAdd1 interaccione con XNP/dAtrx.

4° Determinar la posible interacción genética entre *dadd1* y *xnp/datrx*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Ilustración de la organización de los dominios en las proteínas

La esquematización de la organización de los dominios de las isoformas dAdd1 [Figura 10C] y la representación de los fragmentos ensayados por pull-down [Figura 12C] se realizaron utilizando el programa “DOG 1.0 Illustrator of Protein Domain Structures” (Ren *et al*, 2009). Para la representación del gen en la Figura 11A se utilizó el programa “FancyGene” (Rambaldi y Ciccarelli, 2009).


Alineamiento múltiple

Los alineamientos múltiples se realizaron utilizando CLUSTALX2 2.1 (Larkin *et al*, 2007) y tomando en cuenta los parámetros de inferencia filogenética estimados mediante el programa “ProtTest 2.4” (Abascal *et al*, 2005) para la selección de modelos de evolución de proteínas. El porcentaje máximo de probabilidad del análisis filogenético fue calculado mediante PhyML 3.0 (Guindon y Gascuel, 2003) con los parámetros del modelo de sustitución WAG (ADD) & LG (Helicasa/ATPasa) (Le y Gascuel, 2001); Bootstrap: 1000; proporción de sitios invariables: 0.11 (ambos); tamaño de parámetros gama: 1.94 (ADD) & 0.81 (Helicasa/ATPasa). El árbol fue editado utilizando el programa “Interactive Tree Of Life (iTOL) v2” (Letunic y Bork, 2011) con la información de la arquitectura de dominio de proteínas predichas mediante “ScanProsite” (De Castro *et al*, 2006).

Modelo de homología del dominio ADD de las proteínas dAdd1

Con el propósito de generar el modelo de homología del dominio de ADD (101 a.a) de la proteína dAdd1, se generó mediante SWISS-MODEL (Arnold *et al*, 2006), un modelo tridimensional de la estructura de la proteína blanco, basándose en la identidad de secuencia relacionada con as estructuras depositadas en el “banco de datos de proteínas” (PDB por sus siglas en inglés *Protein Data Bank*). Básicamente los pasos utilizados en el modelaje de homología son los siguientes: identificación de templados, alineamiento de secuencias de amino ácidos, construcción del modelo y verificación del modelo (calidad del modelo) (Biasini *et al*, 2014). La estructura cristalográfica del regulador transcripcional ATRX de *Homo sapiens* (Iwase *et al*, 2011) identificada en el PDB con la entrada 3qla cadena A, fue utilizado como templado para el modelo de homología. La identidad entre estas dos proteínas fue de un 37 % y la similaridad estructural fue de un 0.42. Es importante mencionar que los procedimientos implementados en el SWISS-MODEL permiten modelar secuencias que comparten al menos 35% de identidad con una estructura tridimensional conocida.

Target VHCTIVCKLHLGTAPAAESNIKMHFILRVTHCVKCHDFYNSGEFSKGEDGSELYCRWCGQGGEVYCCSTCPYVFCRSCIVK 80
 3qla.1.A VYCTIACGK...MRFQ--KQSLIYHPQLQV...L...CRNCFKYYMSDDIS...DSDGMDEQCRWCAEGGNL...CCDFCHNAFCRKCILR 86
 Target NLSKGVIVDI-EQENWNCFSC 101
 3qla.1.A NLSRRRELS...IDPENN...QW...C...IC 108

SMTL ID	3qla.1.A
Title	Transcriptional regulator ATRX
Coverage	
Identity	37.37
Similarity	0.42
Ligands	3 x ZN1 x K
Method	X-ray 1.60Å
Oligo State	hetero-oligomer
Found_by	BLAST

Aunque los modelos resultantes no representan la estructura 3D real, son una aproximación lo suficientemente precisa para realizar inferencias acerca de la topología general y una posible disposición de residuos de la secuencia del dominio ADD de la proteína dAdd1.

Características de las líneas de *Drosophila melanogaster*

La línea de *D. melanogaster* silvestre utilizada en este estudio fue Oregon R (OreR) o w^{1118} , los stocks se mantuvieron a 25°C con comida estándar. Los stocks que portan los alelos *xnp/datr*x se obtuvieron de Bloomington, Indiana stock center. Los stocks que portan los alelos *dadd1* y *Su(var)2-5* se obtuvieron del “*Drosophila* Genetic Resource Center” (DGRC), del Instituto de Tecnología de Kyoto. Los alelos *xnp/datr*x fueron descritos por Bassett y cols. (2008) (Los llamaremos alelos de *atr*x para simplificar). Los alelos *dadd1*: *dadd1NP0793* ($w^{[*]}$; $P\{GawB\}NP0793 / CyO$) y *dadd1NP1240* ($y^{[*]}$ $w^{[*]}$; $P\{GawB\}NP1240 / CyO$, $P\{UAS-lacZ.UW14\}UW14$), son

portadores de una inserción de un elemento P a -225 o -223 bp con respecto al sitio donde se ubica el codón de inicio de la traducción dentro del gen *dadd1*, respectivamente [Figura 14]. El alelo *Su(var)2-5²* es una mutación sin sentido que ha sido caracterizada molecularmente por Eissenberg y cols. (1990), esta mutación se ubica en el marco abierto de lectura del gen: es una sustitución de una G por una A dentro del codón 26, lo cual resulta en una sustitución de una metionina por una valina que afecta el cromodominio. El alelo *Su(var)2-5⁵* es una mutación inducida por rayos X, que ocasiona que solamente los primeros 10 a.a de HP1a se traduzcan (Eissenberg *et al*, 1992). La línea *BL1* porta un alelo reportero de PEV, este alelo resulta de la inversión del gen reportero transgénico: *hsp70-lacZ*. Esta inversión ocasiona que el gen reportero transgénico se posicione en una ubicación adyacente a la heterocromatina pericentromérica del 3L (Lu *et al*, 1996).

Cruzas genéticas

Todos los stocks se cruzaron primero con las moscas *w1118;Sp/CyO;TM6B,Tb/MKRS* durante cinco generaciones. Los cromosomas con los alelos de interés se siguieron por segregación con cromosomas balanceadores específicos. Para asegurarse de la presencia de los alelos *atrx* en estas líneas, las hembras portadoras de los alelos *atrx¹*, *atrx²* y *atrx³* fueron cruzadas con los machos portadores del alelo paterno *atrx¹*, se determinó su viabilidad y se comparó con los datos de viabilidad reportados previamente por Bassett y cols. (2008). Los stocks que portan los alelos *atrx* se establecieron y balancearon con los *balancers* para el cromosoma 3: *TM6B, Tb*. Los stocks que portan los alelos *dadd1* se establecieron

y balancearon con el balancer para el cromosoma 2: *CyO*. Las cruzas se efectuaron de acuerdo a los procedimientos estándares, se efectuaron al menos 3 replicados biológicos. Al menos se examinaron 100 moscas para cada genótipo.

Para la inmunotinción de cromosomas politénicos, se cruzó: *XNP Scer\UAS.T: Ivir\ HA1* (Bassett *et al*, 2008), con la línea driver *Sgs3-GAL4 (w[1118]; P{w[+mC]=Sgs3-GAL4.PD}TP1)* ambas líneas se obtuvieron del Bloomington *Drosophila* Stock Center. Todas las cruzas y los stocks se mantuvieron a 25°C.

Anticuerpos.

El anticuerpo de *dAtr_L* fue descrito previamente por Valadez-Graham y cols. (2012), para su generación se utilizó el péptido P3 (MGKKNPNARHTDAATPLTTD) o P4 (CVVRLKRVSLPKTKPAQ). Todos los anticuerpos fueron generados por “New England Peptide” (NEP). El anticuerpo: pan-*dAdd1* se generó utilizando el péptido: QGGEVYCCSTCPYVFCKSC el cual reconoce a *dAdd1a,b,c*. Para generar el anticuerpo que reconoce a la isoforma *dAdd1a* se utilizó el péptido: CDLIKALGSPSVLP y para generar el anticuerpo que reconoce a la isoforma *dAdd1b* se utilizó el péptido: CDKQFCQQLVLAM [Figura 9]. La especificidad de estos anticuerpos fue ensayada mediante su capacidad de reconocer *dAdd-1a* o *dAdd1-b* fusionado a GST (ver la sección de pull-down y ensayos de especificidad para mayores detalles) mediante Western blot [Figura S1]. El anticuerpo HP1a (C1A9) se obtuvo del “Developmental Studies Hybridoma Bank” ubicado en la Universidad de Iowa. El anticuerpo que reconoce la etiqueta HA es de Roche

(Referencia:11867423001). El anticuerpo que reconoce a la etiqueta V5 es de Abcam (ab27671). Se utilizó además IgG purificada de gene script (A01007).

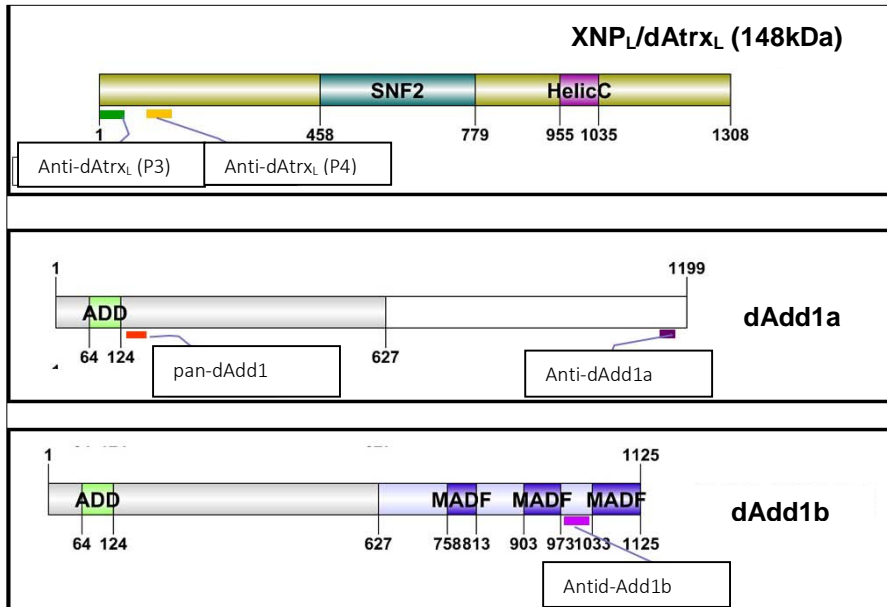


Figura 9 Ubicación de los epitopos de anticuerpos contra dAtrx y dAdd1.

Inmunotinción de cromosomas politénicos

Las inmunotinciones de cromosomas politénicos se realizó con pequeñas modificaciones, a partir del protocolo descrito por Valadez-Graham y cols. (2012). Las glándulas de larvas del tercer instar se fijaron en solución I (PBS, para-formaldehído al 3.7% y 1% Triton X-100) y después se pasaron a la solución II (3.7% de para-formaldehído, 50% de ácido acético). Los cromosomas se esparcieron en porta objetos recubiertos con poly-L-Lysina. El anticuerpo contra HP1a se utilizó a una dilución de 1:300, el anticuerpo contra dAtrx_L se utilizó a una dilución 1:100, pan-dAdd1 se utilizó a 1:50 y el anticuerpo contra HA (Roche) se utilizó 1:50. Como

anticuerpos secundarios se utilizaron: Alexa fluor 488, 568 o 594 (Invitrogen) a una dilución 1:500 y 1:100 respectivamente. Las imágenes se tomaron en el microscopio confocal: Olympus FV1000.

Ensayo de Pull-down con los fragmentos dAtrx y dAdd1.

- Clonación de fragmentos de XNP/dAtrx_L y de las proteínas dAdd1.

Se generaron proteínas de fusión de diversos fragmentos de of XNP/dAtrx_L y de las proteínas dAdd1 [ver Figura 13C]. Todas las clonas utilizadas en este trabajo fueron secuenciadas. Se utilizaron los cADNs de *Drosophila*: LD28477, LD24316 y LD37351 de la BDGP (Gold collection of *Drosophila* Genomics Resource Center). A partir de estos cADNs se amplificaron diversos fragmentos mediante PCR y se clonaron utilizando los sitios *EcoRI*, *Not I*, *Sma I*, *Xho I* o *Sal I* en el vector pGEX-4T-1 (pGEX-4T-3) y pGBKT7 [Tabla 3].

- Condiciones de PCR

Las condiciones de PCR para todos los oligonucleótidos señalados en la Tabla 3 fueron las siguientes: una temperatura inicial de 94°C por 2min, 30 ciclos de: 1min a 94°C, 1min a 59°C y 4min a 68°C y un ciclo final de 7min a 68°C. Se utilizó un volumen de reacción de 50µl (5µl de 10X Taq PCR Buffer, 5µl de MgSO₄ 25mM, 1µL de deoxinucleósidos trifosfato 10mM, 1.2µl de cada oligonucleótido (stock 20picomoles/µl), 0.14µl de “FastStart Taq DNA Polymerase” (10U) (Roche) y 100ng

de cADN. Los productos amplificados se visualizaron en un gel de agarosa al 1% a 100Volts, se corrió en buffer TAE.

- Purificación de productos de PCR.

Los productos de PCR que se utilizaron para clonación, se purificaron utilizando el paquete: "Montage PCR centrifugal filter Devices" (Millipore) siguiendo las instrucciones del proveedor.

- Digestión enzimática de productos de PCR y vectores.

Los vectores e insertos se digirieron con las enzimas correspondientes [ver tabla 3] en un volumen de 25 μ l. La reacción consistió en 2.5 μ l de buffer 10X (según la enzima), 1 μ l de cada enzima (10U), 1 μ g de ADN y se incubo durante 4hr a 37°C. El ADN digerido se corrió en un gel de agarosa de bajo punto de fusión (Cambrex) al 1% en TAE a 80 Volts y se cortaron las bandas de agarosa con el fragmento de ADN de interés.

- Purificación de ADN a partir de agarosa de bajo punto de fusión.

Para la obtención de ADN a partir de agarosa de bajo punto de fusión, se siguió el protocolo de Sambrook y Russell (2001) con las modificaciones descritas a continuación. Se fundió la agarosa a 65°C durante 10min (en termoblot, se agitó en

vortex cada 3min). Se agregó 1 vol de Buffer de elusión (20 mM Tris-HCl Ph 8.0, 1 mM EDTA), se incubó a 65°C otros 10min (se agitó en vortex cada 5 min). Se agregó 1 volumen de Fenol (se agitó en vortex 30seg). Se centrifugó 15 min a 10,000 rpm a temperatura ambiente. Se recuperó la fase acuosa. Se agregó un volumen de fenol y 1 volumen de cloroformo (se agitó en vortex 30seg). Se centrifugó 15 min a 10,000 rpm a temperatura ambiente. Se recuperó fase acuosa. Se agregó 1 volumen de cloroformo (se agitó en vortex 30 seg). Se centrifugó 15 min a 10,000 rpm a temperatura ambiente. Se agregó 1/10 del volumen final de acetato de sodio 3 M ph 5.2. Se agitó en vortex 15 seg. Se agregó 1µl de Glicogeno. Se agregó 2 volúmenes de etanol al 100%. Se dejó toda la noche a -20°C. Se Centrifugó 30 min a 5,000 rpm a temperature ambiente. Se lavó la fracción que precipitó (que corresponde al ADN) 2 veces con 1ml de etanol al 70%. Se resuspendió el ADN en agua.

- Ligación y lavados con butanol.

La reacción de ligación se realizó en un volumen final de 40 µl y consistió en 4 µl de buffer de ligasa 10X, 30fmoles de vector digerido, 90fmoles de inserto (guardando una relación 1:3) y 1µl de ADN ligasa T4 (5U) (Invitrogen). La reacción se incubó toda la noche a 18°C. El ADN ligado se precipitó con lavados sucesivos de 1volumen de 1- butanol (también se puede utilizar 2-butanol) hasta que el ADN se observó en el fondo del tubo. El ADN se secó y se resuspendió en 20µl de agua destilada. Para calcular la cantidad de fmoles se utilizó la siguiente formula:

$$\frac{(\text{fmol DNA})}{\mu\text{l}} = \frac{\mu\text{g DNA}}{\left(\frac{1\text{mg}}{3,000\text{fmol}}\right) \times \left(\frac{\text{Tamaño de DNA (pb)}}{1,000\text{pb}}\right)}$$

- Preparación de células electrocompetentes.

Para preparar las células electrocompetentes, se hizo un preinóculo de 5ml de medio YENM (0.75% extracto de levadura, 0.8% Bacto nutrient broth) de *Esterichia coli* DH5a, se incubó a 37°C toda la noche en agitación. Este pre-inóculo se agregó a 1 Lt de medio YENB y se dejó en agitación de 3-6 hrs hasta que se alcanzó una densidad óptica de DO600 entre 5.9 a 9.0. Las células se enfriaron en hielo durante 15 min y se centrifugaron a 4,000 gs durante 10min para remover el sobrenadante. Las células se lavaron dos veces con 200 ml de agua estéril fría. Se centrifugaron a 4,000 gs durante 10min. Las células se resuspendieron en un total de 50 ml de glicerol al 10% (filtrado) frío. Las células se centrifugaron 4,000 gs durante 10 min, se resuspendieron en 3 ml de glicerol al 10% y se alicotaron en tubos de 40 μl . Las alicotas se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C.

- Electroporación.

Para la electroporación, se usaron 10 μl de la reacción de ligación con 40 μl de las células electrocompetentes de *E. coli* DH5 α a 1.8 mV. Las células electroporadas se recuperaron en 1 ml de medio SOC (cuando se preparó 1Lt de SOC se hizo una

mezcla de: 20gr bacto-triptona, 5gr de extracto de levadura, 0.5 gr de NaCl, pH7.0, se esterilizó en autoclave, una vez llegado el momento en que se iba a utilizar se agregó 5 ml de 5 M de MgCl₂ y 20 ml de 1M glucosa) durante 20-30 min en agitación a 37°C. Las células se plaquearon en cajas Petri con medio LB (Luria Broth) suplementado con el antibiótico utilizado para selección (100µg/ml de ampicilina, 10µg/ml de cloranfenicol o 30µg/ml de canamicina) y se incubaron a 37°C por 24hrs.

- Expresión de proteínas fusionadas a GST

Los fragmentos de dAtr_L se expresaron como proteínas de fusión a GST en un sistema bacteriano. Para la sobre-expresión de las proteínas de fusión a GST, se sembró un pre-inóculo en 5ml de medio LB de las bacterias *E. coli* (BL21) portadoras de pGEX-4T-3-Atr_L⁽¹⁻²²¹⁾ o pGEX-4T-1-Atr_L⁽³⁶⁸⁻¹¹⁰³⁾ o pGEX-4T-1-Atr_L⁽¹¹⁴⁷⁻¹³⁰⁸⁾ y se crecieron toda la noche. Este cultivo se diluyó 1:100 en 250 ml de LB, se dejó crecer 2hrs a 37°C hasta que alcanzó un OD₆₀₀ 0.4 – 0.6 y fueron inducidos a una concentración 0.4 mM de IPTG (Sigma) a 37°C durante 3 hrs con agitación vigorosa. Posteriormente, el cultivo se centrifugó a 2,000rpm a 4°C durante 10 min para obtener el botón celular. El botón celular se congeló a -20°C hasta su procesamiento para la purificación de proteínas de fusión utilizando el protocolo de Smith y Corcoran (2001) al que se le hizo pequeñas modificaciones. El botón celular de un volumen correspondiente a 250 ml de cultivo se resuspendió en 10 ml de buffer de solubilización STE [1 mM EDTA, 5 mM DTT, 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, con inhibidores de proteasas (número de catálogo: 11697498001 Roche) y 2 mM

PMSF], se agregó lisozima a una concentración final de 1 mg/ml y esta mezcla se incubó en rotación durante 20 min a 4°C. Se agregó sarcosil (N-lauryl sarcosina de sodio) a una concentración final de 1%. Las muestras se sometieron a 4 ciclos de sonicación (20 seg de sonicación, 40 seg en hielo) o hasta que la mezcla tuvo fluidez, utilizando 35% de amplitud. La sonicación se realizó utilizando el “Sonics VCX500 Ultrasonic Processor 500 watts”. Además se utilizó la punta de 250µl – 10ml (No. De Catalogo: 630-0559). Posteriormente, se agregó tritón X-100 a una concentración final al 1% y se centrifugó a 13,000rpm durante 10min a 4°C. Las proteínas recombinantes se purificaron agregando entre 200 a 300 µl perlas de GST-sefarosa (Amersham) a 10 ml de sobrenadante que contiene la proteína de fusión. Las perlas se incubaron durante 2 hrs en el sobrenadante. Posteriormente, se lavaron 5 veces con Buffer STE con 0.5% de tritón, centrifugando a 1,600rpm a 4°C por 10min. Para monitorear la purificación de la proteína de fusión GST se cargaron 20 µl de perlas en un SDS-PAGE y posteriormente se tiñó el gel con coomassie.

- Transcripción y traducción *in vitro*.

Los fragmentos de dAdd1 se expresaron y marcaron utilizando metionina marcada con S³⁵ en un sistema de transcripción/traducción *in vitro* (TNT). La reacción de transcripción/traducción *in vitro* se realizó utilizando el paquete: “TNT® Quick coupled Transcription/Translation System” (Promega) siguiendo las instrucciones del proveedor. Brevemente, la mezcla de la reacción TNT consistió en lo siguiente: 40 µl de reticulocito, 2 µl de metionina marcada radiactivamente con S³⁵ (Perkin

Elmer), 1 μ g de ADN plasmídico, agua bidestilada para llevar la mezcla de reacción a un volumen de 50 μ l. La mezcla se incubó 90 min a 30°C, posteriormente se tomó 5 μ l de la reacción TNT y se corrió en un gel de acrilamida SDS-PAGE, el cual se secó y se reveló por autorradiografía. El resto de la reacción se congeló a -20°C hasta que se utilizó para el ensayo de "Pull-down".

- Ensayo de "Pull-down".

Un volumen de perlas de sefarosa portadoras de una cantidad equivalente a 1 μ g de proteínas de fusión a GST, se lavaron 2 veces con 1 ml de buffer de interacción [20 mM Hepes pH 7.9, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 4 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.15% nonidet P-40 (NP-40), 10% glicerol] durante 5 min para equilibrar las perlas. Las perlas equilibradas se bloquearon con 1% BSA en buffer de interacción en un volumen final de 300 μ l durante 30 min a 4°C en agitación constante. Las perlas se centrifugaron 5 min a 1,600 rpm a 4°C. Las perlas se lavaron 2 veces con 500 μ l de buffer de interacción. Finalmente, las perlas se llevaron a un volumen final de 300 μ l con buffer de interacción y se agregó un volumen de reacción TNT (aproximadamente 1 μ g de proteína). La mezcla se incubó 4hrs a 4°C en rotación constante. Después del tiempo de incubación, se realizaron 6 lavados con 1 ml de buffer de interacción cada lavado consistió de: una vez agregado el buffer de interacción se realizarón 30 inversiones del tubo eppendorf seguidas de una centrifugación de 1,000 rpm durante 10 min, se retiró el sobrenadante y se realizó

otro lavado. Las perlas se corrieron en un gel de acrilamida SDS-PAGE, el cual se secó y se reveló por autorradiografía.

Cultivo celular de células S2R⁺, transfección y co-inmunoprecipitación.

- Clonación de *dadd1-a* en pAc5.1/V5

Para los ensayos de transfecciones transitorias se usó el vector pAc5.1/V5 His A (Invitrogen), el cual utiliza el promotor de actina-5C para expresar la proteína de interés de manera constitutiva con las etiquetas V5-6XHis en el extremo carboxilo terminal. Dado que en este vector se requiere incluir una secuencia Kozak para permitir la unión del ARN mensajero al ribosoma, se utilizó la siguiente secuencia de Kozak: AAC GCC ATG GTA. Esta secuencia se incluyó en el ologonucleótido “forward” seguido de la secuencia del ADN codificante de *dadd1-a*. El oligo reverso no incluyó un codón de paro ya que después del sitio de clonación múltiple se encuentra la secuencia codificante para la etiqueta V5-6XHis. El cADN de *dadd1-a* se clonó en los sitios *EcoR* *V/Not* *I* del vector pAc5.1/V5-HisA [Tabla 3]. Esta construcción fue secuenciada.

- Mantenimiento de la línea celular.

La línea celular S2R⁺ se deriva de un cultivo primario de embriones de *Drosophila melanogaster* de etapa tardía (20 - 24 horas) (Schneider, 1972). Muchas

características de la línea celular S2R⁺ sugiere que esta línea celular proviene de un linaje de células del sistema inmunológico de *D. melanogaster*.

Las células de S2R⁺ de *Drosophila* S2R⁺ se crecieron a 26°C y sin CO₂ se mantuvieron en medio Schneider complementado con 10% de suero bovino fetal inactivado por calor (Hyclone SH30396.03) y 100 µg/ml de estreptomicina y 0.25µg/ml de anfotericina B (solución antibiótico-antimicótico; Sigma-Aldrich A5955); siguiendo las sugerencias del manual: "*Drosophila Expression System*" (Invitrogen).

Tabla 3 Datos sobre clonación de fragmentos de dAtrx y dAdd1.

Fragment clonado (a.a)	Oligo "Forward"	Oligo "Reverse"	Sitios utilizados para la clonación	Templado	Vector donde se clono el fragmento
dAtrx _L (1-221)	Fragmento obtenido por digestión en los sitios 471 y 1132pb		<i>EcoR I / NotI</i>	LD28477	PGEX4T1
dAtrx _L (368-1103)	CCGGAATTTCGATGACAGAAGGAAG	GCGCGTCGACAGAATAGGCATCTC	<i>EcoR I / Sal I</i>	LD28477	PGEX4T1
dAtrx _L (1147-1308)	Fragmento obtenido por digestión en los sitios 3912 y 4404pb		<i>EcoRI / Xho I</i>	LD28477	PGEX4T1
dAdd1 (1-225)	Fragmento obtenido por Digestión		<i>EcoR II BamH I</i>	PGBKT7-dAdd1-a (1 -625)	PGBKT7
dAdd1-a (1-625)	AACAGAATTCATGAGTAACAGTGCTCCGGGT	ATAAGCGGCCGCAGCAGCTAGTTGACCATTCTCCAG	<i>EcoR II NotI</i>	LD24316	PGBKT7
dAdd1-a (620-1199)	CTAGAATTCGATAAACAAGCTAGTGATGACGA	ATCAGCGGCCG CTAGCCAACAATCTCAGCCGTGGC	<i>EcoR III Not I</i>	LD37351	PGBKT7
dAdd1-a (355-1199)	Fragmento obtenido por Digestión		<i>EcoR II / Sal I</i>	LD37351	PGBKT17
dAdd1-b (538-1125)	CAACGTCGACCTGCCGTGGATTATGTGTGTTA	GAATGCGGCCGCTAAATGTTGAGGAAGCGCATCTC	<i>Sal I / Not I</i>	LD24316	PGBKT7
dAdd1-a (1 - 1199)	Fragmento obtenido por Digestión		<i>EcoR II / KpnI</i>	PGBKT7-dAdd1-a (1 -625)	PGBKT7 - dAdd1 (355 - 1199)
dAdd1-a (1 - 1199)	Fragmento obtenido por Digestión		<i>EcoR III Not I</i>	PGBKT7-dAdd1-a (1 -625)	pAc5.1/V5

- Transfecciones transitorias y extractos totales de proteínas de células S2R⁺.

Las células S2R⁺ fueron cotransfectadas transitoriamente con 10 µg de ADN plasmídico de la construcción pAc5.1-*dadd1a*-V5-His A [Ver tabla 3], mediante el método de calcio según las instrucciones del proveedor (Invitrogen). Después de transfectar, las células se dejaron crecer 48 hrs y posteriormente se colectaron para la extracción de proteínas totales solubles mediante el protocolo modificado de Sacristán y cols. (2004). Las células se centrifugaron a 3,000rpm durante 5 min y el botón celular se resuspendió en buffer WCE [25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM KCl, 5 mM NaF, 1 mM pirofosfato de sodio, 1% nonidet P-40, 0.1% Tritón X-100, 2 mM PMSF e inhibidores de proteasas Complete (Roche)]. Se dejó en rotación durante 30min y posteriormente se clarificó a 1,100 rpm. El extracto se utilizó de inmediato para los ensayos de Coinmunoprecipitación (CoIP).

- Ensayos de Coinmunoprecipitación.

Primeramente, las perlas de proteína A y G acopladas a agarosa (Invitrogen) fueron bloqueadas con 0.1% de BSA toda la noche a 4°C y se lavaron al siguiente día 5 veces con 1 ml de PBS durante 10 min en rotación a 4°C y una vez con 1 ml de WCE, finalmente se resuspendieron en un volumen de WCE.

Por otro lado, para el ensayo de coimmunoprecipitación (CoIP) se siguió el protocolo de Sacristán y cols. (2004) al cuál se le hicieron algunas modificaciones. Para cada reacción de inmunoprecipitación se utilizó como mínimo 1 mg de proteína total de células transfectadas, o bien 6 mg proteína total de células no transfectadas. En ambos casos, la proteína se llevó a un volumen final de 800 μ l con buffer WCE. En ambos casos, al extracto proteico se le hicieron 2 pre-limpiados (PC por las siglas en inglés “pre-clearing”). Para realizar el primer pre-limpado a los 800 μ l del extracto proteico total se agregaron 50 μ l de proteína A y G acoplada a agarosa bloqueada, se incubó 1 hr a 4°C en rotación y posteriormente se centrifugó 10min a 4°C a 1,000rpm y se recupera tanto el sobrenadante como las perlas, éstas últimas se marcaron como PC1 y se guardaron a 4°C en 1 ml de WCE. Para el 2° pre-limpado se repitió el paso anterior. Al finalizar los pre-limpiados, se recuperó el extracto proteico y se agregó el anticuerpo que se utilizó para la inmunoprecipitación. Para inmunoprecipitar dAdd1a-V5 en extractos proteicos de células transformadas se agregó 1 μ g de anticuerpo contra V5 (como control negativo o mock se utilizó 1 μ g de IgG purificada de abcam). Para inmunoprecipitar dAdd1 o dAtr_L en extractos de proteína total de células no transformadas, se utilizó 3 μ g del anticuerpo correspondiente: pan-dAdd1 o anti-dAtr_L P4 (como mock se utilizó 3 μ g de Anti-HA). Se dejó que el anticuerpo y el extracto proteico interaccionara toda la noche a 4°C en rotación constante. Al siguiente día se centrifugó 30min a 10,000 g a 4°C, se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo y se agregó 100 μ l de perlas A y G bloqueadas. Se incubó durante 4 hrs. Se centrifugó 10 min a 4°C a 1,000 rpm. Se recuperó el sobrenadante y se marca como no unido (UB por sus siglas en inglés

“unbound”), mientras que las perlas se resuspendieron en 1 ml de buffer WCE y se marcan como unido (IP o Mock) Las perlas de los Pre-limpiados (PC1 y PC2), IP y Mock se lavaron 5 veces con 1ml de WCE para lo cual en cada lavado una vez agregado el WCE se incubaron 15 min a 4°C en rotación y se centrifugaron 10min a 4°C, se retiró el sobrenadante y se realizó el siguiente lavado. Finalmente las perlas se resuspendieron en 1 volumen de buffer Laemmli 2X, se cargaron en un gel SDS y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa a 250 mA durante 3 hrs. Una vez transferidas se tiñeron con Ponceau.

- Obtención de extractos nucleares de células S2R⁺.

Para la extracción de proteínas nucleares de S2R⁺ se realizaron pequeñas modificaciones al protocolo de Schreiber y cols. (1989). Se partió de un cultivo de S2R⁺ de 5 ml al 80% de confluencia. El cultivo celular se centrifugó 5 min a 2,000 rpm. Se lavó 2 veces el “pellet” celular con 1 ml de PBS y se centrifugó 5min a 2,000rpm. El “pellet” se resuspendió en 200 µl de Buffer A (10 mM Hepes pH 7.6, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 0.75 mM Espermidina, 0.15 mM Espermina) complementado con inhibidores (no. de catálogo: 11697498001 Roche) y 2 mM de PMSF. Se incubó 15 min en hielo. Se agregó 25 µl de Igepal al 10% (NP40) para llegar a una concentración final del 1.25%, la solución se mezcló gentilmente con la pipeta. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 40seg. Se recuperó el sobrenadante (fracción de proteínas del citosol). Se agregó 100 µl de Buffer de Lisis NLB (20 mM Hepes pH 7.6, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA y 1 mM EGTA) complementado con inhibidores de proteasas (no. de catálogo: 11697498001

Roche) y 2mM de PMSF. Se incubó en rotación 15 min a 4°C. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min. Se recuperó el sobrenadante que contiene la fracción de proteínas nucleares.

Ensayos de co-inmunoprecipitación de extractos nucleares de embriones de 0-12hrs.

- Preparación de extractos nucleares.

La obtención del extracto nuclear a partir de embriones de *D. melanogaster* se basó en un método del laboratorio de Kadonaga J.T modificado por Pazin M. J (Sullivan *et al*, 2000), el cual permite la extracción de los núcleos en condiciones de baja salinidad. Los embriones colectados (0-12hrs de desarrollo) se decorionaron sumergiéndolos por 1 min en una solución de cloro al 50%. Luego de varios lavados con abundante agua destilada, se secaron en una malla de nylon sobre toallas de papel para quitar el exceso de agua y se pesaron. A partir de este momento se comenzó a trabajar a 4°C en el cuarto frío. Por cada gramo de embriones se añadieron 3 ml de buffer I (15 mM Hepes pH 7.6, 10 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA y 350 mM sacarosa) con inhibidores de proteasas (no. de catálogo: 11697498001 Roche) y 0.2 mM PMSF, y se desbarataron pasándolos tres veces en un homogenizador a 1,000rpm. La muestra homogenizada se filtró a través de una malla de Nitex, los restos de tejido se lavaron en buffer I (2 ml/gr de embriones) y se centrifugó a 10,000gs a 4°C por 15 min para obtener la pastilla de núcleos. Se guardó el sobrenadante, que es la fracción de proteínas solubles de

citoplasma, mientras que la pastilla se resuspendió en buffer I (3 ml/gr de embriones) y se volvió a centrifugar a 10,000gs a 4°C por 15 min. Luego se resuspendió en buffer AB (15 mM HEPES pH 7.6, 110 mM KCl, 5 mM MgCl₂ y 0.1 mM EDTA) con inhibidores de proteasas (no. de catálogo: 11697498001 Roche) y 0.2 mM de PMSF, utilizando 1 ml por cada gramo de embriones. La suspensión se transfirió a un tubo previamente pesado y se centrifugó a 10,000gs a 4°C por 10min. Después de centrifugar, el sobrenadante se decantó y el tubo con la nueva pastilla se pesó para calcular la masa de núcleos obtenidos, restando a esta cantidad el peso del tubo vacío. Por cada gramo de núcleos obtenido, se añadieron 0.5 ml de buffer HEMG20 (25 mM HEPES pH 7.6, 12.5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 20% (V/V) glicerol) conteniendo 0.1 M de KCl, inhibidores de proteasas (no. de catálogo: 11697498001 Roche) y 0.2 mM PMSF. La pastilla se resuspendió y la suspensión se incubó en hielo por 1hr. Posteriormente, se hizo una ultracentrifugación a 100,000 gs a 4°C por 1 hr para obtener cuatro fracciones (de arriba – abajo): delgada capa de lípidos, capa líquida de color amarillo y transparente que comprende alrededor de 50% del volumen total y representa la fracción nuclear soluble (SNF), capa líquida grisácea de material insoluble y capa sólida de material nuclear.

- Ensayos de coimmunoprecipitación.

El ensayo de CoIP se realizó con pequeñas modificaciones al protocolo descrito por Leclerc y cols. (1996). Para cada reacción de inmunoprecipitación se utilizó como mínimo 1 mg de proteína SNF, la proteína se lleva a un volumen final de 800 µl con

buffer PD [Heppes pH 7.9, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 4 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.1% NP40 (Igepal), 10% glicerol y 0.2 mM PMSF]. Al extracto proteico SNF se le hicieron 2 pre-limpiados (PC por las siglas en inglés “pre-clearing”). Para realizar el pre-limpado 1 a los 800µl del extracto SNF se agregaron 50 µl de proteína A y G acoplada a agarosa bloqueada, se incubó 1hr a 4°C en rotación y posteriormente se centrifugó 10min a 4°C a 1,000rpm y se recuperó tanto el sobrenadante como las perlas, éstas últimas se marcan como PC1 y se guardaron a 4°C en 1ml de buffer PD. Para el 2° pre-limpado se repitió el paso anterior. Al finalizar los pre-limpiados, se recuperó el extracto proteico SNF y se agregó el anticuerpo que se utilizó para la inmunoprecipitación. Para inmunoprecipitar dAdd1 o dAtr_L en extractos de proteína total de células no transformadas, se utilizó 3 µg del anticuerpo correspondiente: pan-dAdd1 o anti-dAtr_L P4 (como “mock” se utilizó 3µg de Anti-HA). Se dejó que el anticuerpo y el extracto proteico interaccionara toda la noche a 4°C en rotación constante. Al siguiente día se centrifugó 30 min a 10,000 g a 4°C, se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo y se agregó 100 µl de perlas A y G bloqueadas. Se incubó durante 4hrs. Se centrifugó 10 min a 4°C a 1,000 rpm. Se recuperó el sobrenadante y se marco como no unido (UB por sus siglas en inglés “unbound”), mientras que las perlas se resuspendieron en 1 ml de buffer PD y se marcaron como unido (IP o Mock) Las perlas de los pre-limpiados (PC1 y PC2), IP y Mock se lavaron 5 veces con 1ml de PD; durante cada lavado: una vez agregado el buffer las perlas se incubaron 15 min a 4°C en rotación y se centrifugaron 10min a 4°C a no más de 1,000rpm, se retiró el sobrenadante y se inicia un nuevo lavado. Finalmente las perlas se resuspendieron en 1 volumen de buffer Laemmli 2X, se

cargaron en un gel SDS y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa a 250 mA durante 3hrs. Para verificar la calidad de la transferencia la membrana de nitrocelulosa se tiñó con Ponceau.

Ensayos tipo Western blot.

Las proteínas solubles de todos los extractos obtenidos se separaron en geles de acrilamida al 8 o 18% mediante electroforesis en una dimensión bajo condiciones desnaturalizantes (SDS PAGE). Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (0.20 μ m, Amersham) durante 3hrs a 250 mA a 4°C.

- Condiciones de anticuerpos contra dAdd1 y dAtrx (hechos en rata).

Las membranas se bloquearon toda la noche a 4°C, con una solución de 5% de leche en polvo (Nestle CARNATION Instant nonfat milk) en 1X PBS con 0.2% Tween-20 (PBT). Los anticuerpos primarios se incubaron en 2.5% leche PBT durante 1 hr a temperatura ambiente, se utilizaron: anti-dAtrx_L P4 (1:2000), anti-dAdd1 (1: 2,000), anti-dAdd1a (1:150) y anti-dAdd1b (1:200). Posteriormente, se hicieron 5 lavados de 10 min cada uno a temperatura ambiente con PBT. Los anticuerpos secundarios acoplados a HRP (Rockland) se utilizaron 1:12,000 en 2.5% de leche en PBT y se incubaron durante 1hr a temperatura ambiente. Se hicieron 5 lavados de 10 min cada uno a temperatura ambiente con PBT. La detección de la señal se llevó a cabo con el sistema ECL plus (GE Healthcare).

- Condiciones de anticuerpos comerciales.

Las membranas se bloquearon 1 hr a temperatura ambiente, con una solución de 10% de leche en polvo (Nestle Svelty Instant nonfat milk) en 1X PBS con 0.1% Tween-20 (PBT). Los anticuerpos primarios se incubaron en 5% leche PBT durante 1 hr a temperatura ambiente, se utilizaron: anti-V5 (1:20,000), anti-HP1a (1:3,000), anti-tubulina (1:2,000) o anti-TBP (1:1000). Posteriormente, se hicieron 5 lavados de 10 min cada uno a temperatura ambiente con PBT. Los anticuerpos secundarios acoplados a HRP (Rockland) se utilizaron 1:12,000 en 5% de leche en PBT y se incubaron durante 1hr a temperatura ambiente. Se hicieron 5 lavados de 10 min cada uno a temperatura ambiente con PBT. La detección de la señal se llevó a cabo con el sistema SuperSignal West Pico (Thermo Scientific).

- Ensayos para demostrar la especificidad de los anticuerpos.

Para probar la especificidad del anticuerpo pan-dAdd1, se efectuó al mismo tiempo dos Western blot (WB) (siguiendo las condiciones descritas en la sección de Condiciones de anticuerpos contra dAdd1 y dAtrx de material y métodos) en ambos casos se utilizó 100µg de extractos proteicos de células S2R+. Ambos WB se realizaron con las mismas condiciones siendo la única variante que en el primer WB se utilizó como primer anticuerpo pan-dAdd1 no competido y para el segundo WB se utilizó pan-dAdd1 competido [Figura S1A]. La competencia se realizó incubando el anticuerpo pan-dAdd1 en PBS, Tween 0.01%, 5% leche (Nestle CARNATION

Instant nonfat milk) durante 2hrs en presencia de la proteína de fusión dAdd1-GST fijada a una membrana de nitocelulosa, después del periodo de incubación, se recupera el sobrenadante (pan-dAdd1 competido). La proteína GST-dAdd1 de fusión contiene el péptido: QGGEVYCCSTCPYVFCKSC (aa 122-137) de dAdd1 el cual fue utilizado para elaborar el anticuerpo pan-dAdd1.

Para probar la especificidad de los anticuerpos dAdd1-a y dAdd1-b, las proteínas de fusión GST-dAdd1a o b fueron expresadas en bacterias, fijadas en la membrana de nitrocelulosa y finalmente se realizó un WB a estas membranas utilizando anti-dAdd1-a [Figura S1B] o anti-dAdd1-b [Figura S1C]. Los resultados demuestran que los diferentes anticuerpos reconocen específicamente a su sustrato.

Ensayo de RT–PCR

El ARN se obtuvo utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen®) de embriones (0–3 y 3–21 hour), larvas de las tapas 1a, 2a y 3ra (L1, L2 y L3), pupas (P), faratos (Ph) y adultos tanto hembras y machos Oregon (F y M). 10 µg de ARN total se convirtió a cADN utilizando la enzima transcriptasa reversa (Invitrogen) y el oligo dT y los *random primers* (Stratagene®). RP49 fue utilizado como control de RT-PCR. Para determinar la presencia de los transcritos se utilizaron los siguientes oligonucleótidos en la reacción de PCR (esté procedimiento se encuentra detallado en la tesis de maestría de Meyer, 2012):

- *dadd1af* (5'-CATCTTACGGGCAAAGTGGT-3'),
- *dadd1ar* (5'-CAGGCTGGCCAATATCGTGG-3'),
- *dadd1bf* (5'-GCTTGTCATCGGGCATATCT-3'),
- *dadd1br* (5'-GCTCATAAGCAGCCAGCAGT-3'),
- *dadd1cf* (5'-ACAGCGGCAGCAACGGAAGC-3'),
- *dadd1cr* (5'-GCGGAAGTCCTTGCAGCGGT-3')
- *rp49* forward (5'-TCAAGATGACCATCCGCCCA-3');
- *rp49* reverse (5'-GTTCTCTTGAGAACGCAGGC-3').

Inmunoprecipitación de la cromatina

Las células S2R⁺ o las glándulas salivales de las larvas de la etapa 3 se fijaron en formaldehído al 1%. La reacción de fijación fue detenida agregando glicina (125 mM). Las células o las glándulas salivales se lavaron y resuspendieron en buffer de lisis, y la sonicación se realizó hasta que la cromatina alcanzó entre 200 y 800 bp utilizando el sonicador Bioruptor® Standard (Diagenode). Los pre-limpiados, las incubaciones de anticuerpos, la inmunoprecipitación y las extracciones fenol - cloroformo se realizaron tal como se detalla en Valadez-Graham y cols. (2004). Para la condición de mock, se utilizó el suero pre-inmune o el anti cuerpo GFP. Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

- rover forward (5'-CAACCAAGACCAACCTACCC-3')
- rover reverse (5'-GCTCATTTTAGTCTGTCCGC-3')
- TAS3L_ChIP1 (5'-TGA CTGCCTCTCATTCTGTC-3') (Antão *et al*, 2012)

- TAS3L_ChIP2 (5'-TATCATCTCGTTCATCCGCC-3') (Antão *et al*, 2012)

Las qPCRs se efectuaron utilizando el kit: *LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I* (no. de catálogo de Roche: 03003230001) y cada corrida se efectuó en el equipo *LyghtCycler 1.5* (Roche), la cuantificación relativa se realizó de la siguiente manera:

- El porcentaje de INPUT fue calculado utilizando la fórmula:

$$\%Input = 2^{(-\Delta C_t [\text{normalized Ch IP}])} \Delta C_t [\text{normalized ChIP}]$$

$$= (C_t [\text{ChIP}] - (C_t [\text{Input}] - \text{Log}_2 (\text{input dilution factor})),$$

Donde:

- *Input dilution factor* = (fraction of the input chromatin saved)⁻¹

Todos los ensayos se realizaron al menos 3 veces

Ensayo de cuantificación de β-galactosidasa.

La detección de β-galactosidasa en moscas adultas se efectuó con algunas modificaciones del protocolo descrito por Gu y Elgin (2013). Para la los ensayos de cuantificación de β galactosidasa, las moscas se homogenizaron en 300μl de buffer de ensayo (50 mM de fosfato de potasio, 1 mM MgCl₂, pH 7.5), posteriormente el extracto proteico se centrifugó 5 min a 4°C a 12,000 rpm. Se recuperó el sobrenadante y se cuantifico proteína a OD 280nm. Se tomó una alicota de 100 μg

de proteína y se transfirió a 150 μ l de una solución de CPRG (1 mM rojo de clorofenol β -D-galactopiranosida en buffer de ensayo) y se midió la OD a 574nm a intervalos de tiempo de 0, 1 hr y 2 hr, durante estas 2 hrs la mezcla se incubó a 37°C. La actividad de β -galactosidasa fue calculada en función del cambio en OD. Para todos los ensayos, se utilizaron extractos proteicos obtenidos de 5 machos adultos de cada genotipo analizado obtenidos de forma azarosa en la población.

RESULTADOS

El dominio ADD de dAtrx está altamente conservado en *Drosophila* y otros invertebrados.

Se realizó una búsqueda bioinformática de genes que pudieran codificar a proteínas que contengan el dominio ADD en el genoma de *Drosophila* utilizando la región (aa 169-268) de la proteína hATRX. Se utilizó dicha región por que es el segmento de la proteína hATRX donde se encontrará el dominio ADD. La búsqueda se efectuó utilizando el BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) del NCBI (*National Center of Biotechnology Information*). Utilizando esta aproximación, se identificó el gen anotado como CG8290, el cual codifica a tres proteínas que tienen un dominio ADD muy conservado en el extremo amino terminal que es en un 52% homólogo y un 36% idéntico al dominio ADD de hATRX [Figura 10A, B.]. El alineamiento de proteínas [Figura 10A] demostró que existe una gran conservación de la posición de las cisteínas que coordinan los átomos de zinc en el GATA-like y los dedos PHD de zinc. Sin embargo, esta conservación no es tan alta cuando se realiza la alineación con DNMT3L, una metiltransferasa que tiene también el dominio ADD [Figura S6]. El dominio ADD de las proteínas codificadas por el gen CG8290 de *Drosophila* es más similar al de hATRX que al de las DNMT3L. Mientras este trabajo estaba en preparación para su publicación Alekseyenko y cols., (2014) nombraron *dadd1* (debido a que en *Drosophila* es el primer gen que hasta el momento se ha identificado que codifica para proteínas que contienen el dominio ADD) al gen CG8290 (Alekseyenko *et al*, 2014). En la proteína hATRX, existen algunos

aminoácidos en un “pocket” hidrofóbico que median la interacción entre la combinación H3K9me3 y la H3K4 no metilada (H3K4me0) del extremo amino terminal de la H3 (Li y Li, 2012). En general, es importante hacer notar que el sitio de unión al “pocket” hidrofóbico se encuentra conservado entre el ADD de *Drosophila* y el de hATRAX (aa 110-126 en dAdd1). Asimismo, existen muchos aminoácidos conservados que no son parte del bolsillo hidrofóbico, tales como la histidina 189 y la prolina 190 de hATRAX (las cuales corresponden a la aa 96 y 97 en dAdd1) las cuales se han encontrado que sufren mutaciones en el síndrome ATR-X (Iwase *et al*, 2011). Se construyó un modelo tridimensional del dominio ADD que se encuentra en las proteínas dAdd1 (aa 64 al 164) y se comparó con el dominio ADD de hATRAX [Figura 10B]. Los dominios ADD de hATRAX y dAtrx sobrelapan principalmente en el dedo tipo GATA y el dedo PHD de zinc en las hélices 1, 2 y 3 (h1, h2 y h3, respectivamente), y también se encuentra conservado el “pocket” que es importante para el reconocimiento de H3K9me3 y H3K4me0 [Figura 10C]. En el trabajo recientemente publicado por Alekseyenko y cols. (2014), se demostró *in vitro* que el dominio ADD de dAdd1 se une preferentemente al péptido H3K9me3.

Asimismo, se comparó la estructura nativa del dominio ADD de dAdd1 con el dominio ADD de las DNMT3L [Figura S6] y se encontró un empalme mínimo cuando se sobreponen las estructuras. Esto permite proponer que durante la evolución, la proteína ATRX sufrió un evento de fisión. Para obtener una idea de la historia evolutiva de ATRX, se decidió realizar un árbol filogenético utilizando las secuencias de ADD y los dominios helicasa/ATPasa de los eucariontes superiores. Se encontró

que los ancestros de los eucariontes superiores poseen una proteína que tiene tanto los dominios ADD como helicasa/ATPasa, pero en los insectos se efectuó un evento de fisión mediante el cual los dos dominios fueron separados, generándose dos genes diferentes [Figura 11, Figura S2] (posiblemente involucrando una duplicación de genes con una subsecuente degeneración parcial, como se ha propuesto para las proteínas *cmi* (*c*ara *m*itad, también conocido como *Lpt*) y *TRR* (*T*rithor*a*x-*r*elated protein) de la familia de genes *monkey King* (*mkg*) en *Drosophila*) [Wang *et al*, 2004; Chauhan *et al*, 2012).

Otro factor de interés, es que en *Drosophila*, las proteínas ADD adquieren otros dominios tales como MADF (*myb/Sant-like*, los cuales se representan como hexágonos azules [Figura 11], lo cual sugiere que estas proteínas pudieron haber adquirido nuevas funciones. Los dominios MADF pueden reconocer secuencias repetitivas en el ADN, se sabe que en las proteínas *Adf1* (*A*dh transcription *f*actor *1*) y *Dip3* (*D*orsal *i*nteracting *p*rotein *3*) los dominios MADF dirigen la unión de estos factores transcripcionales a secuencias promotoras específicas (Bhaskar y Courey, 2002). Todos estos datos llevan a proponer que las proteínas codificadas por el gen *dadd1* pudieran ser ortólogas del extremo amino terminal de la proteína hATRX.

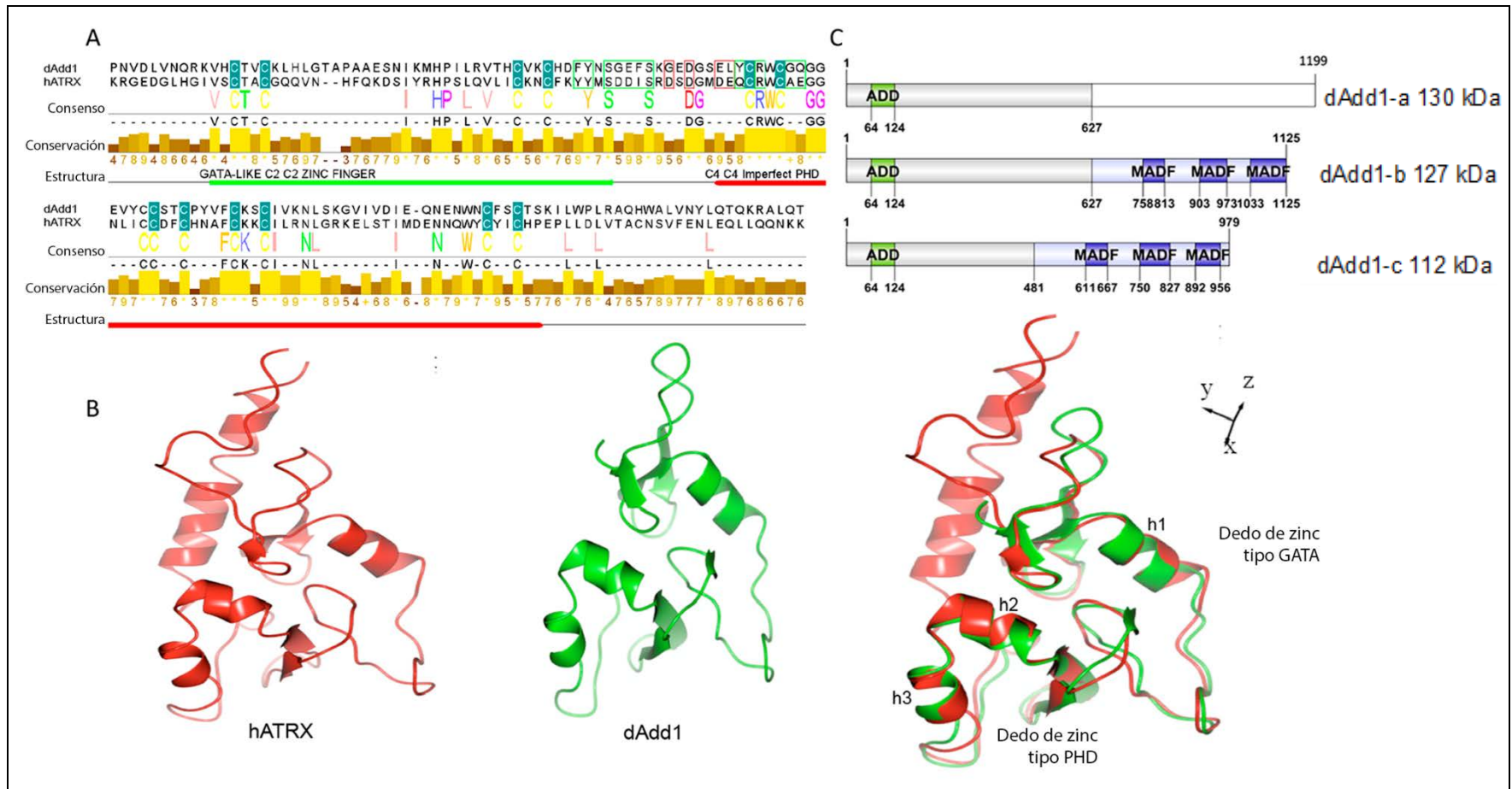


Figura 10 El dominio ADD de las proteínas hATR se encuentra conservado en las proteínas dAdd1 de *Drosophila*

A. En la figura se observó la predicción del dominio ADD en el alineamiento de secuencias proteicas de hATR y dAdd1. Las cisteínas conservadas se resaltan con letras amarillas y se enmarcan con cajas azules. Los aminoácidos involucrados en el reconocimiento de H3K9me3 se señalan con barras verdes y H3K4me0 se señalá con barras y rojas, respectivamente. Los aminoácidos que conforman el dedo de zinc tipo GATA se subrayan con barras verdes y los que conforman el PHD imperfecto C4-C4 se subrayan con barras rojas. **B.** Representación de "Ribbon" del dominio ADD de hATR en rojo (izquierda) y dAdd1 en verde (centro), se utilizó el servidor CPH models-3.0 para crear el modelo del dominio ADD de dAdd1. A mano izquierda se muestra el empalme estructural de los dominios ADD de hATR y dAdd1. **C.** Organización de los dominios en las isoformas dAdd1 (a-c). Todas ellas tienen un dominio ADD en el extremo amino. Las isoformas dAdd1-b y dAdd1-c presentan dos copias del dominio MADF en el extremo carboxilo de la proteína.

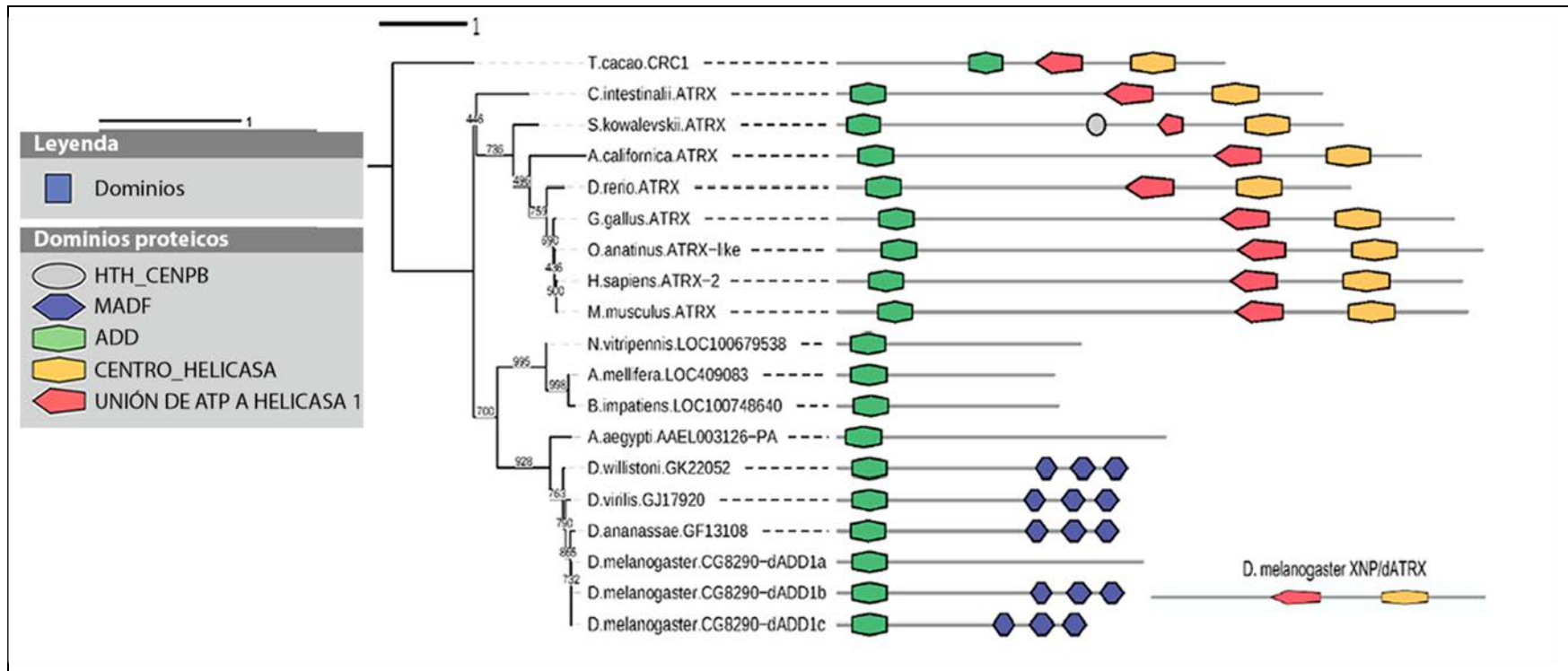


Figura 11 El dominio ADD de ATRX se encuentra conservado tanto en vertebrados como invertebrados.

En la figura se observa el árbol filogenético que se obtuvo utilizando las secuencias del dominio ADD de ATRX. Además frente al árbol se dibujó la arquitectura de dominios de cada proteína que fue utilizada para el estudio. El estudio se efectuó con PhyML (Guindon y Gascuel, 2003). ScanProsite (De Castro *et al*, 2006) se utilizó para determinar la arquitectura de dominios de cada proteína. Los números que se muestran en cada rama del árbol representan valores de "bootstrap". En el árbol se observa que la proteína ancestral portadora del dominio ADD sufrió un evento de fisión durante la evolución de los insectos. También se puede observar que las proteínas homólogas a ATRX dentro del género *Drosophila* han adquirido dominios MADF en tándem durante su divergencia a partir de otros insectos. Este dominio parece ser funcional dada su conservación dentro del género. Para ver los parámetros utilizados remitirse a Material y Métodos.

Las proteínas dAdd1 se expresan a lo largo de todo el desarrollo de *Drosophila melanogaster* y son proteínas nucleares que preferencialmente pueden unirse a diferentes regiones de la cromatina.

A través de análisis de RT-PCR de los cADNs obtenidos a partir de diferentes etapas del desarrollo [ver material y métodos y la Figura 12A], se encontraron tres transcritos *dadd1-a*, *dadd1-b* y *dadd1-c* [Figura 12A, y 12B panel superior]. Los transcritos (*dadd1-a*, *dadd1-b*, *dadd1-c*) son productos de “splicing” alternativo del gen CG8290 descrito en FlyBase (St. Pierre *et al*, 2014). Todos estos transcritos se depositan maternalmente en el embrión y posteriormente se expresan durante todas las etapas del desarrollo [Figura 12B, líneas 0-3] (para mayor información ver la tesis de maestría de Meyer, 2012).

Cuando se amplifica el transcrito *dadd1-b*, aparece otra banda de mayor peso molecular [Figura 12B panel superior]. Se secuenció este fragmento y se encontró que corresponde a un nuevo transcrito que retiene el intrón cinco. La presencia de este transcrito varía durante todo el desarrollo siendo más abundante en las etapas larvarias. Análisis bioinformáticos indican que la retención del quinto “intrón” en este transcrito genera un codón de paro el cual resulta en la traducción de una proteína que conserva solamente un dominio MADF (tesis de maestría de Meyer, 2012). Se requieren mayores análisis para probar la presencia de esta proteína en *D. melanogaster*.

Hasta el momento solo se ha podido identificar tres proteínas derivadas de los transcritos del gen *dadd1* que tienen peso molecular que se encuentra en el rango de los 112kDa a los 130kDa [Figura 10C]. Las proteínas dAdd1-b y dAdd1-c tienen diversos dominios MADF en su extremo carboxilo terminal. Se diseñó un anticuerpo que reconoce al mismo tiempo a las tres isoformas dAdd1 (el cual hemos llamado pan-dAdd1, ver material y métodos), el anticuerpo fue probado a través de Western blot y para demostrar si eficiencia fue competido con las proteínas de fusión GST-dAdd1 [Figura S1A y material y métodos]. En los inmunoblots se observan principalmente dos bandas (112 y 130kDa). Basándose en los pesos moleculares predichos para estas proteínas, las señales de estas bandas de alto peso molecular probablemente representa a estas tres proteínas pero no se pueden visualizar por los métodos estándar de electroforesis SDS-PAGE.

Mediante Western blot se demostró que las proteínas dAdd1 se encuentran enriquecidas en la fracción nuclear de las células S2R⁺ [Figura 12C]. Dado que las proteínas son nucleares y tienen sitios de probable unión a la cromatina y al ADN, se analizó su localización en la cromatina. Para lo cual se efectuaron preparaciones de cromosomas politénicos de larvas de la tercera etapa de desarrollo, y se inmunotñeron con el anticuerpo pan-dAdd1. Estos estudios demuestran que las proteínas dAdd1 se localizan en diversas bandas e interbandas de los brazos de los cromosomas politénicos [Figura S3]. La señal también está presente en las regiones heterocromáticas tales como el cromocentro y el cromosoma cuatro, colocaliza con la señal dAtrx en esta región y en otras regiones heterocromáticas [Figura 12D y Figura S3] (tesis de maestría de Meyer, 2012).

Adicionalmente, para confirmar si dAdd1 colocaliza con dAtrx, se expresó una proteína dAtrx_L fusionada a HA (dAtrx_L-HA) en glándulas salivales de larva (Bassett *et al*, 2008). Esta proteína de fusión dAtrx_L-HA se localiza en los mismos sitios que dAtrx_L silvestre (Valadez-Graham *et al*, 2012) y no altera la distribución de dAdd1 [comparar la Figura 12D y Figura S3]. Se encontró que dAdd1 colocaliza con dAtrx_L-HA en el cromocentro y en otras regiones heterocromáticas [Figura 12D].

Estos resultados abren la posibilidad de que las proteínas dAdd1 que contienen el dominio ADD pueden interactuar con dAtrx (que no tiene el dominio ADD), y es muy posible que ambas proteínas realicen funciones complementarias en algunas actividades celulares.

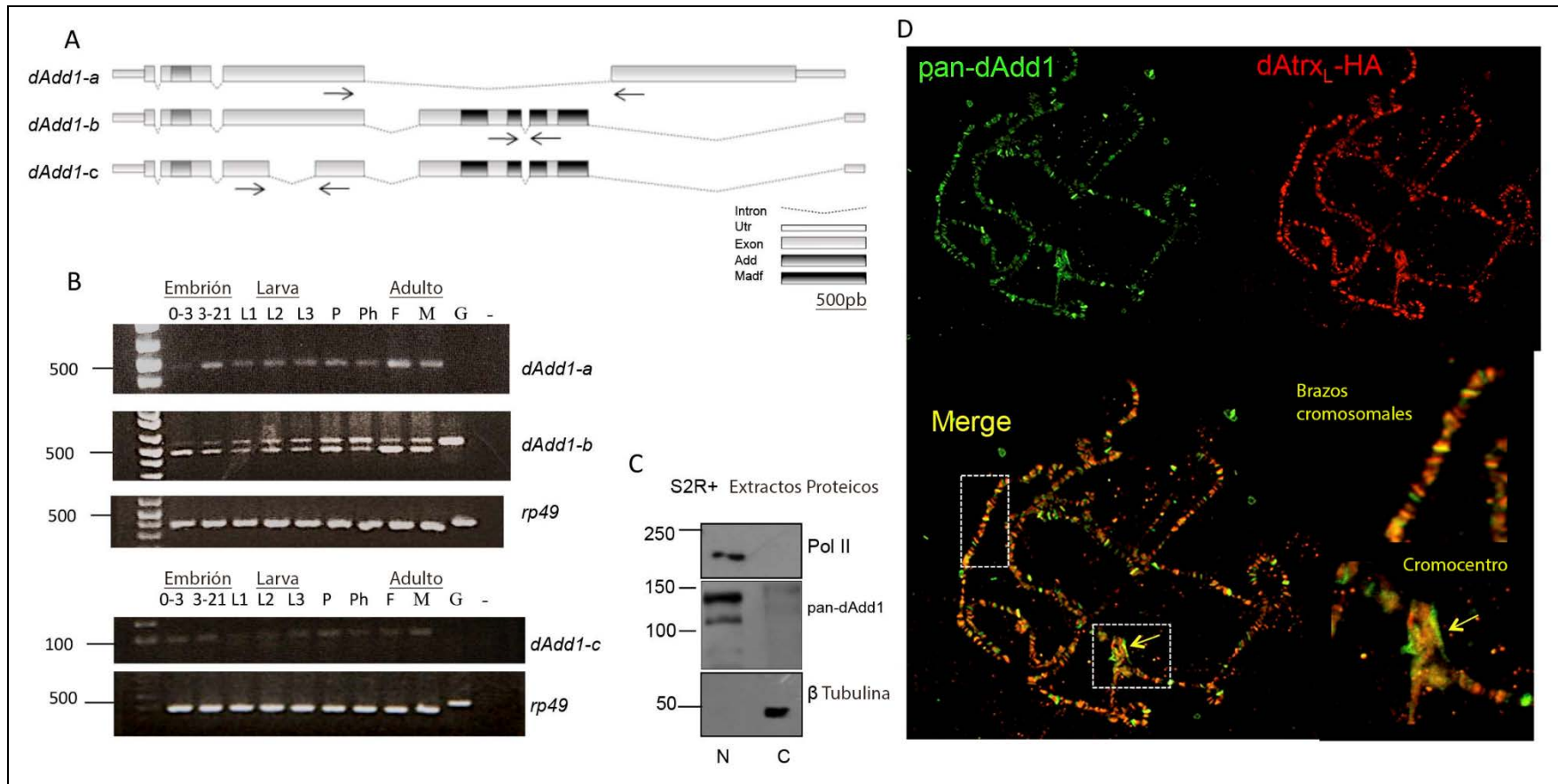


Figura 12 Las proteínas *dAdd1* se expresan a través del desarrollo.

A. Esquema de los mARNs de *dadd1* generados por "splicing" alternativo. La secuencia de nucleótidos de los dominios ADD y MADF se representan como cajas grises. Los oligos utilizados para amplificar los cADNs que representan a los mARNs que codifican a las isoformas de Add1 se indican mediante flechas horizontales. **B.** Los transcritos de *dadd1* fueron detectados a lo largo de todas las etapas de desarrollo de *Drosophila*, a partir del ARN aislado de embriones (0-3 y 3-21hrs), larvas de las etapas 1^a, 2^a y 3^{ra} (L1, L2 y L3), pupa (P), Farato (Ph por sus siglas en inglés: "pharate") y hembra adulta (F por sus siglas en inglés: "female") y macho adulto (M). *rp49* fue utilizado como control del RT-PCR. La secuencia de los oligos específicos utilizados para detectar y secuenciar los exones de cada uno de los diferentes mARN de *dadd1* se describen en la sección de Material y métodos. Los marcadores de peso molecular se encuentran representados a la derecha de los paneles como barras. **C.** Las isoformas proteicas de dAdd1 (a-c) son principalmente nucleares. Se detectaron las proteínas dAdd1 (a-c) por Western blot utilizando el anticuerpo pan-dAdd1 en las fracciones solubles nucleares (N) y citoplásmicas (C) aisladas a partir de células S2R⁺. La subunidad larga de la ARN Polimerasa II y la β tubulina fueron utilizadas como controles de las fracciones nuclear y citoplásmica, respectivamente. Los marcadores de peso molecular se colocaron a la izquierda de los paneles y están dados en kDa. **D.** Las proteínas dAdd1 colocalizan con la proteína dAtr en los cromosomas politénicos de larvas de la tercer etapa de desarrollo.

dAtr_L-HA y dAdd1 fueron detectados con los anticuerpos anti-HA (Rojo, panel superior derecho) y pan-dAdd1 (verde, panel superior izquierdo), respectivamente. Las proteínas dAdd1 y dAtr_L-HA colocalizan en algunas bandas e interbandas (panel izquierdo inferior). Además, colocalizan en regiones heterocromáticas como el cromocentro (ver el recuadro insertado en el panel inferior derecho). Observar que no todas las bandas colocalizan.

Las proteínas dAdd1 interactúan directamente con la proteína dAtr_L.

Para probar la hipótesis de interacción, se efectuaron experimentos de co-inmunoprecipitación utilizando diferentes anticuerpos generados contra las proteínas dAdd1 y dAtr (ver materiales y métodos).

Como una primera aproximación se coimmunoprecipitó dAdd1 con el anticuerpo pan-dAdd1 y se probó si dentro de las proteínas inmunoprecipitadas se detectaba a dAtr_L. Como se observa en la figura 13A (panel superior línea IP) se detectó en el inmunoprecipitado (IP) tanto dAdd1 como dAtr_L (en la IP las bandas que corresponden tanto a dAdd1 como a dAtr_L se señalan con flechas). Asimismo, se efectuó la inmunoprecipitación recíproca con el anticuerpo dAtr_L, y se demostró que al menos una de las proteínas dAdd1 (de aproximadamente 130kDa) coimmunoprecipitan con dAtr_L [Figura 13A panel inferior, línea IP (las bandas que corresponden tanto a dAdd1 como a dAtr_L se señalan con flechas)]. La señal en ambos casos es específica debido a que no puede ser detectada cuando utilizamos un anticuerpo irrelevante para realizar el ensayo de inmunoprecipitación (línea “mock” en todos los blots). Para caracterizar cual de las proteínas dAdd1 se observan en la banda de la inmunoprecipitación detectada con pan-dAdd1, se realizó un ensayo de coimmunoprecipitación utilizando extractos totales de células S2R⁺ con anticuerpos generados contra dAdd1-a o dAdd1-b. En estos ensayos se

encontró que tanto dAdd1-a como dAdd1-b coinmunoprecipitan con dAtr_L [Figura 13B, panel superior e inferior, las flechas indican las bandas específicas que corresponden a las proteínas inmunoprecipitadas]. En el blot de dAdd1-a [Figura 13B] existe una banda de alto peso molecular, de aproximadamente 250kDa, esta banda es inespecífica porque también aparece en la inmunoprecipitación efectuada con la IgG purificada de conejo [Figura 13B, línea “mock”]. El hecho de que tanto las proteínas dAdd1-a y dAdd1-b, pueden inmunoprecipitar con dAtr_L indica que el dominio de interacción está conservado en ambas proteínas o que existe una tercera proteína que está mediando la interacción.

Para determinar si existe dentro de las proteínas dAdd1 algún dominio que les permita entablar una interacción proteína – proteína con XNP/dAtr_x se realizaron ensayos de “Pull-down”. En estos ensayos se probaron los fragmentos dAdd1-a⁽³⁵⁵⁻¹¹⁹⁹⁾ y dAdd1-a⁽⁶²⁰⁻¹¹⁹⁹⁾. El fragmento dAdd1-a⁽³⁵⁵⁻¹¹⁹⁹⁾ que contiene los amino ácidos 355-625 se une a los fragmentos dAtr_L⁽¹⁻²²¹⁾ (extremo amino terminal) y dAtr_L⁽³⁶⁸⁻¹¹⁰³⁾ (fragmento SNF2). El fragmento dAdd1-a⁽⁶²⁰⁻¹¹⁹⁹⁾, carece de los amino ácidos 355-625, no interaccionan con ninguno de los fragmentos de dAtr_L que se probaron [comparar el segundo y tercer panel de arriba hacia abajo a la derecha de la Figura 13D]. En estos análisis, también se encontró que los fragmentos que incluyen a los dominios MADF (dAdd1-b⁽⁵³⁸⁻¹¹²⁵⁾) interacciona con los fragmentos que contienen el extremo amino terminal y SNF2 de la proteína dAtr_L [Figura 13D cuarto panel de arriba hacia abajo a la derecha de la figura] pero este fragmento también se une al control negativo (GST).

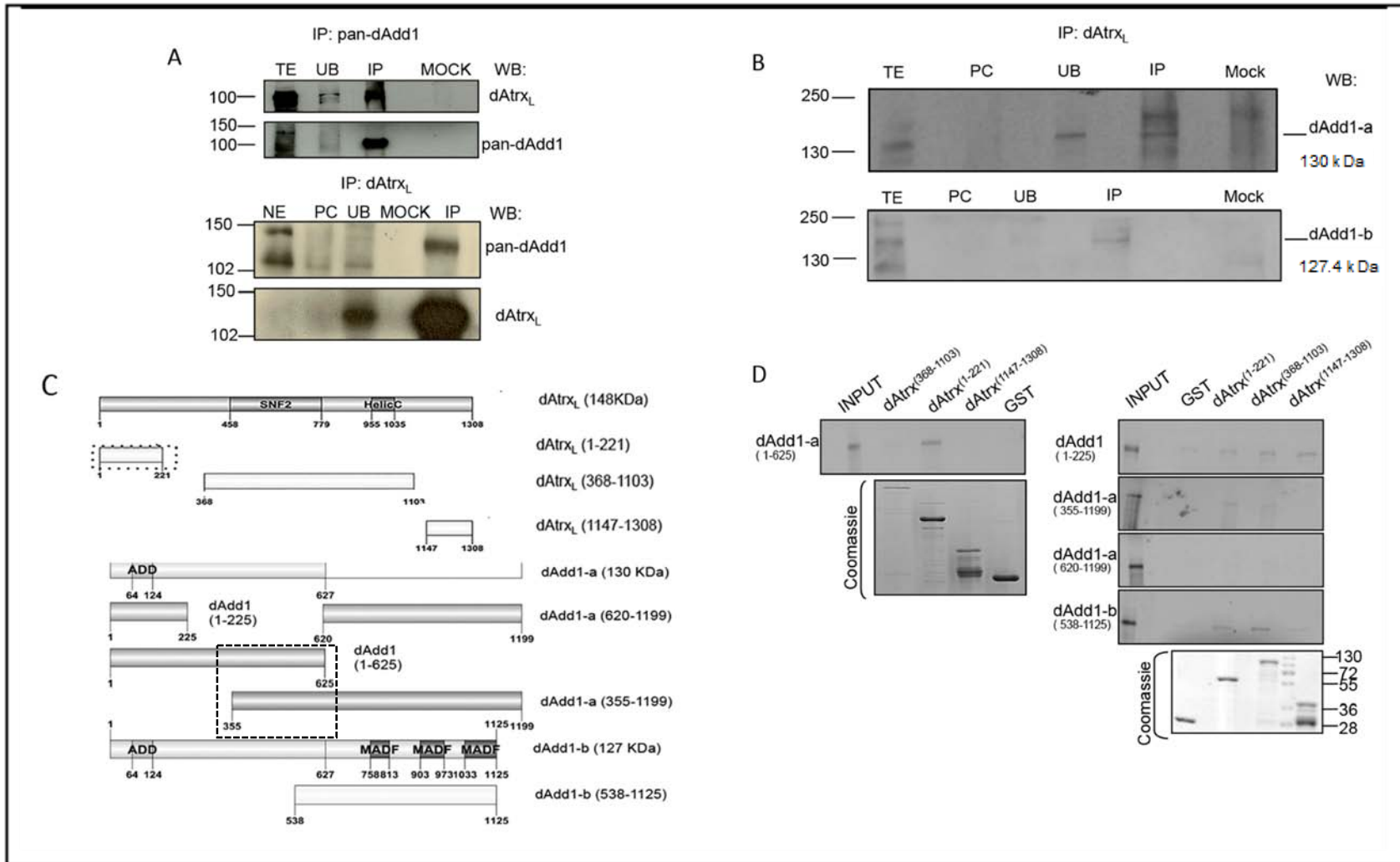


Figura 13 Las proteínas dAtrx y dAdd1 interactúan físicamente.

A. Ensayos de Coimmunoprecipitación de dAdd1 y dAtrx_L, la IP se realizó con el anticuerpo pan-dAdd1 (paneles superiores) y los ensayos recíprocos de CoIP se efectuaron con el anticuerpo de dAtrx_L (paneles inferiores). Los extractos nucleares embrionarios (NE), extractos totales de células S2R⁺ (TE), pre-limpiado (PC); fracción proteica no unida (UB); "Mock"

es la IP que se efectuó con un anticuerpo no relacionado. La presencia de dAdd1 y dAtr_L en las proteínas precipitadas fue determinada mediante Western blot utilizando el anticuerpo específico. Se cargó para el "INPUT" el 20% del extracto nuclear (lo que corresponde a aproximadamente 150µg de proteína) que se utilizó para la IP. Los marcadores de peso molecular en la izquierda de los paneles representan kDa. **B.** Los ensayos de CoIP de dAdd1-a y dAdd1-b con dAtr_L. Extracto total de células S2R⁺ (TE); pre-limpiado (PC); fracción proteica no unida (UB); La IP se realizó con anti-dAtr_L. El "Mock" es la IP que se efectuó con un anticuerpo no relacionado. La presencia de dAdd1-a y dAdd1-b en las proteínas que precipitaron se determinó utilizando anticuerpos específicos. 20% del extracto total (lo que corresponde a 150 µg de proteína) fue cargado como "INPUT". La banda de 250kDa observada en la línea del "INPUT" es una banda inespecífica. Los marcadores de peso molecular marcados a la izquierda de los paneles representan kDa. **C.** Representación de los fragmentos ensayados mediante "Pull-down". Los fragmentos importantes para la interacción entre dAtr_L y dAdd1 se muestran con cajas de líneas interrumpidas. **D.** Ensayo de "Pull-down". La primera línea de todos los paneles (excepto los geles teñidos por Coomassie) muestran el 10% de la cantidad total de la proteína marcada generada mediante transcripción/traducción *in vitro* (fragmentos dAdd1) utilizada para cada experimento ("INPUT"). El resto de las líneas son la interacción experimental (fragmentos GST-dAtr_L y dAdd1) y la interacción control (fragmentos GST y dAdd) para cada polipéptido analizado. Los geles teñidos por Coomassie muestra la cantidad de proteína de fusionadas a GST que se utilizó para cada ensayo.

A partir de los datos de Pull-down que se acaban de describir se puede concluir que el dominio de dAdd1 que interacciona con dAtr_L se encuentra conservado en todas las isoformas de dAdd1. Por lo tanto, es posible que todas las isoformas interaccionen directamente con el extremo amino-terminal de dAtr_L^(1-221 a.a) a través del dominio amino terminal dAdd1-a^(1-625 a.a). Es importante mencionar que este fragmento dAtr_L solo se encuentra conservado en la isoforma larga, y no empalma con el dominio de interacción de HP1a (Iwase *et al*, 2011). En contraste, esta región empalma con el dominio de interacción con DREF, el cual fue reportado por nuestro grupo (Valadez-Graham, 2012). Con base en estos resultados, se puede concluir que todas las isoformas pueden interaccionar directamente con la proteína dAtr_L.

datrx y *dadd1* interaccionan genéticamente.

Hasta este punto se ha demostrado que dAdd1 y XNP/dAtr_L interaccionan físicamente, y es por eso que se deseó conocer si también interaccionan genéticamente en *Drosophila melanogaster*. Para este propósito, se realizó cruza entre moscas portadoras de alelos *atrx* y *dadd1* con el fin de obtener organismos transheterocigos. Para dicho análisis, se utilizó tres alelos *atrx* (Bassett *et al*, 2008).

*atrx*¹ es una deficiencia que descubre todo *datrx* así como tres genes adyacentes; *atrx*² es un alelo hipomórfico que afecta tanto a la isoforma larga como a la isoforma corta de dAtrx y *atrx*³ es un alelo hipomorfo que afecta solamente a la isoforma larga. La sobrevivencia de las moscas heteroalélicas de *atrx* se ve afectada, como previamente fue reportado, y no presentan ningún fenotipo obvio (Tabla 4, Valadez-Graham *et al*, 2012). Además, hemos utilizado dos líneas que portan inserciones de elementos P, las líneas *dadd1*^{NP1240} y *dadd1*^{NP0793}. Estas inserciones caen a 83 y 82 pb, respectivamente, con respecto al sitio de inicio de la transcripción [Figura 14A]. Para determinar si las inserciones afectan los niveles de las proteínas dAdd1, se extrajo la proteína total de moscas adultas de diferentes genotipos y se analizó la presencia de las proteínas dAdd1 a través de Western blot utilizando el anticuerpo pan-dAdd1 [Figura 14B]. Se encontró que los niveles de las proteínas dAdd1 disminuyen en individuos homocigos *dadd1*^{NP1240}/*dadd1*^{NP1240}, con respecto a las moscas heterocigas *dadd1*^{NP1240}/+ o +/+ [Figura 14B]. También se analizó los niveles de mRNA de *dadd1* en los individuos *dadd1*^{NP1240}/+ o *dadd1*^{NP0793}/+ a través de RT-PCR semi-cuantitativo y encontramos que los niveles del mRNA de *dadd1* disminuyen en los individuos mutantes en comparación con las moscas *dadd1* silvestre [Figura S4]. Estos resultados indican que estos alelos son hipomorfos. Resultados similares fueron obtenidos con las moscas heteroalélicas *dadd1*^{NP1240}/*dadd1*^{NP0793} (datos no mostrados) y es por ello que para el resto de nuestras pruebas utilizamos el alelo *dadd1*^{NP1240}.

El 44% y 90% de las moscas *dadd1*^{NP1240}/*dadd1*^{NP1240} y *dadd1*^{NP1240}/*dadd1*^{NP0793} alcanzan la etapa adulta, respectivamente, lo cual

demuestra que gran parte de la letalidad se presenta en los individuos *dadd1^{NP1240}/dadd1^{NP1240}* (56%) comparado con la letalidad que presentan las moscas *dadd1^{NP1240}/dadd1^{NP0793}* (10%) [Tabla 4]. Estos datos sugieren que la letalidad en las moscas *dadd1^{NP1240}/dadd1^{NP1240}* es causada por algún factor presente en el cromosoma portador del alelo *dadd1^{NP1240}* y no por la falta de *dAdd1*. Los individuos *dadd1^{NP1240}/dadd1^{NP0793}* son fértiles y no presentan ningún fenotipo obvio.

La sobrevivencia de las moscas transheterocigas *dadd1/atrx* se ve medianamente afectada, y un pequeño porcentaje de estas moscas presenta masas melanóticas; éstas últimas se observan tanto en individuos de larvas del tercer instar como en individuos adultos. El porcentaje de masas melanóticas es mayor en moscas portadoras de dos alelos de *atrx* distintos en combinación con un alelo de *dadd1* [Figura 14, Tabla 4]. Se obtuvieron resultados similares con todas las combinaciones de los alelos *atrx* y *dadd1* [Figura 14, Tabla 4]. Las masas melanóticas también aparecen durante las etapas larvarias, y en este caso los individuos no pueden continuar con las siguientes etapas del desarrollo [Figura 14C]. Algo similar sucede con las moscas adultas que presentan tumores melanóticos, debido a que mueren dentro de los siguientes 10 días post-eclosión (datos no mostrados). Estos datos proveen evidencia de que, además de que existe una interacción física como ya se ha demostrado en las secciones anteriores, también existe una interacción genética entre *dadd1* y *xnp/datrx* la cual es esencial para el desarrollo de la mosca.

Tabla 4. Interacción entre *dadd1* y *atrx*.

Genotipo	Viabilidad ^a (%)	Masas Melanóticas ^b (%)
<i>atrx</i> ¹ /+	789/789 (100)	0/789 (0)
<i>atrx</i> ² /+	202/202 (100)	0/202 (0)
<i>atrx</i> ³ /+	775/789 (98)	0/775 (0)
<i>atrx</i> ¹ / <i>atrx</i> ²	80/202 (40)	0/80 (0)
<i>atrx</i> ¹ / <i>atrx</i> ³	387/789 (49)	0/387 (0)
<i>atrx</i> ² / <i>atrx</i> ³	130/228 (57)	0/130 (0)
<i>dadd1</i> ^{NP1240} /+	180/180 (100)	0/180 (0)
<i>dadd1</i> ^{NP0793} /+	255/255 (100)	0/255 (0)
<i>dadd1</i> ^{NP1240} / <i>dadd1</i> ^{NP1240}	91/206 (44)	0/91 (0)
<i>dadd1</i> ^{NP1240} / <i>dadd1</i> ^{NP0793b}	163/180 (90)	0/163 (0)
<i>dadd1</i> ^{NP1240} /+; <i>atrx</i> ¹ /+	454/454 (100)	32/454 (7)
<i>dadd1</i> ^{NP1240} /+; <i>atrx</i> ² /+	568/568 (100)	11/568 (2)
<i>dadd1</i> ^{NP1240} /+; <i>atrx</i> ³ /+	632/632 (100)	14/632 (2)
<i>dadd1</i> ^{NP0793} /+; <i>atrx</i> ¹ /+	152/152 (100)	5/152 (3)
<i>dadd1</i> ^{NP0793} /+; <i>atrx</i> ² /+	322/322 (100)	11/322 (3)
<i>dadd1</i> ^{NP0793} /+; <i>atrx</i> ³ /+	243/243 (100)	7/243 (3)
<i>dadd1</i> ^{NP1240} /+; <i>atrx</i> ¹ / <i>atrx</i> ³	76/105 (72)	9/76 (12)
<i>dadd1</i> ^{NP1240} /+; <i>atrx</i> ² / <i>atrx</i> ³	106/141 (75)	8/106 (8)
<i>dadd1</i> ^{NP0793} /+; <i>atrx</i> ² / <i>atrx</i> ³	161/219 (73)	15/161 (9)

^a El número de moscas obtenido dividido entre el número de moscas esperadas de acuerdo a la clase más sana en cada cruce. El porcentaje se encuentra en paréntesis.

^b Número de individuos adultos observados con masas melanóticas [Figura 14B] dividido entre el número total de la clase examinada. El Porcentaje se encuentra en paréntesis.

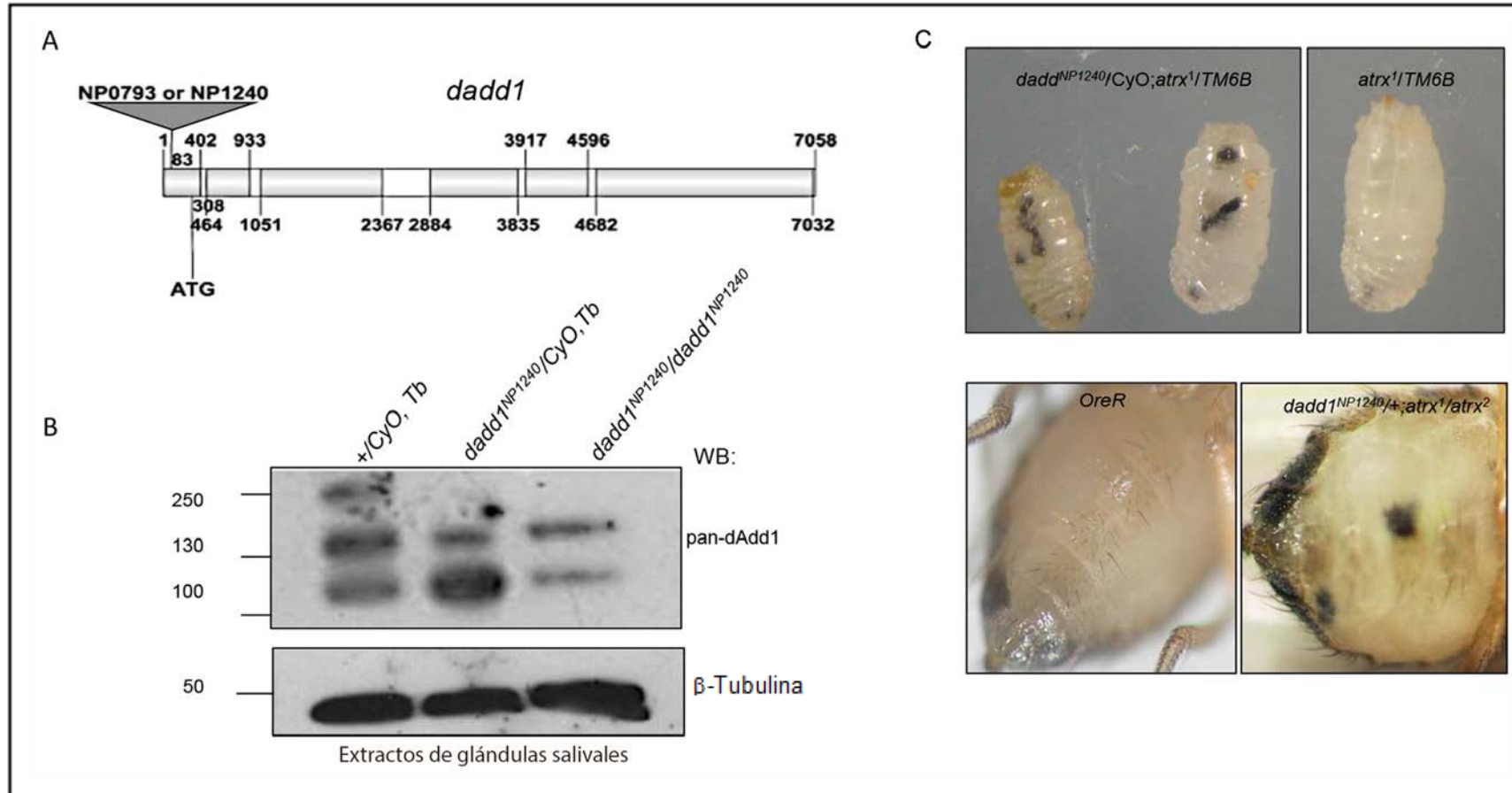


Figura 14 Interacción genética entre *dadd1* y *atrax*.

A. En el esquema de *dadd1* se muestra la posición de la inserción del elemento P (EP) (triángulo gris) en los alelos *dadd1*^{NP1240} y *dadd1*^{NP0793}, los intrones se representan con cajas blancas mientras que los exones se representan con cajas grises. También se muestra el codón de inicio de la traducción ubicado en los 308pb con respecto al sitio de inicio de la transcripción. **B.** *dadd1*^{NP1240} es un alelo hipomórfico. Ensayo de Western blot realizado con el anticuerpo pan-dAdd1. Cada línea contiene 150µg de proteína proveniente de moscas adultas de cada genotipo indicado. β-tubulina fue usado como un control de carga. Es importante resaltar que en los individuos homocigotos para el alelo *dadd1* se presenta menor cantidad de proteína dAdd1 con respecto a los individuos +/+. Esto demuestra que el alelo es hipomórfico. La banda de 250kDa que se observa en la línea silvestre es inespecífica. Los marcadores de peso molecular que se encuentran a la izquierda de los paneles representan kDa. **C.** Algunos individuos *dadd1/atrax* presentan masas melanóticas. Se muestran individuos *dadd1/atrax* que presentan masas melanóticas durante la etapa larvaria (panel superior) y etapa adulta (panel inferior). Los individuos silvestres (*w*¹¹¹⁸ larva y OreR para adulto) se muestran a la izquierda para comparación.

Las proteínas dAdd1 colocalizan con HP1a en regiones heterocromáticas y cooperan con dAtrx en el mantenimiento de la heterocromatina pericentromérica.

Como las proteínas dAdd1 interaccionan con dAtr_L, se planteó la posibilidad de que estas proteínas podrían estar involucradas en el mantenimiento de la heterocromatina; es por ello, que analizamos su interacción con HP1a. Como ya se ha mencionado anteriormente, el dominio de interacción de HP1a en la proteína dAtr_L (245aa-CxVxL-249aa, Bassett *et al*, 2008) no empalma con el dominio de interacción de las proteínas dAdd1. Por ello, es posible que las dAdd1-a, b o c, dAtr_L y HP1a puedan co-existir en el mismo complejo proteico. Si esto es verdad, entonces debemos ser capaces de coimmunoprecipitar a HP1a con las proteínas dAdd1. Por lo cual, expresamos a la proteína dAdd1a fusionada a V5 en células S2R⁺ y se detectó la presencia de HP1a en un ensayo de inmunoprecipitación (IP) de la proteína V5-dAdd1a con el anticuerpo V5 [Figura 15A, panel inferior, con asterisco blanco]. Aunque la señal es débil es específica debido a que no puede ser detectada en el control negativo de la IP (“mock”) [Figura 15A]. Este hallazgo indica que dAdd1-a es capaz de co-inmunoprecipitar con HP1a. Nosotros también demostramos que dAdd1 y HP1a colocalizan en regiones heterocromáticas y en el cromocentro de cromosomas politénicos [Figura 15B flecha amarilla]. La señal de dAdd1 también se observa en otras regiones donde la señal de HP1a es detectada [Figura 15B flecha verde].

Los resultados anteriores de los ensayos de coinmunoprecipitación e inmunolocalización sugieren que las proteínas dAdd1 pueden colocalizar en diferentes regiones de la cromatina. Para analizar con mayor detalle en qué tipo de cromatina se encuentran enriquecidas al mismo tiempo ambas proteínas, se analizó la unión de estos factores a diversas regiones de heterocromatina y eucromatina, para lo cual efectuamos ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (CHIP) utilizando diferentes anticuerpos contra las proteínas HP1a, dAtr_L y dAdd1 utilizando cromatina de glándulas salivales de larvas de la tercera etapa de desarrollo y células S2R⁺ (ver material y métodos).

HP1a no se encuentra enriquecida en las regiones TAS (por sus siglas en inglés *Telomeric Associated Sequences*) (Frydrychova *et al*, 2008). Por otro lado, Antão y cols. (2012) encontraron mediante análisis proteómicos de segmentos de cromatina (PICH) que dAtrx y los productos de CG8290 se encuentran enriquecidos en las secuencias asociadas a telómeros (TAS-L) pero no se encuentra HP1a. Por lo cual, nosotros buscamos la presencia de HP1a, dAtr_L y proteínas dAdd1 en las regiones teloméricas (TAS-L). Nuestros experimentos demostraron, al igual que Antão y cols. (2012), que dAtr_L y las proteínas dAdd1, pero no HP1a, se encuentran enriquecidas en las regiones TAS-L [Figura S5]. Así mismo, encontramos que dAtr_L y las proteínas dAdd1 colocalizan en una región que potencialmente forma la estructura G-cuadruplex (G4) [Figura S5].

Con el propósito de buscar regiones heterocromáticas donde las proteínas no colocalizan utilizamos la región donde se ubica el retrotransposón *rover*, región

que se sabe que es heterocromatina constitutiva y está enriquecida con la marca H3K9me3 (Palomera-Sánchez *et al*, 2010). Aquí encontramos que dAtr_L se encuentra presente pero las proteínas dAdd1 no están enriquecidas en esta región. Este resultado indica que dAdd1 y dAtr_L no colocalizan en todas las regiones heterocromáticas del genoma [Figura S5]. Con el fin de analizar una región eucromática, se decidió utilizar el promotor *sgs8* el cual está activo transcripcionalmente en las glándulas salivales de la tercera etapa de desarrollo (Palomera-Sánchez *et al*, 2010). En estas regiones eucromáticas se observó un enriquecimiento de las proteínas dAdd1 mientras que dAtr_L no se encuentra enriquecida tal como se esperaba [Figura S5]. Estos hallazgos concuerdan con los resultados de los experimentos de inmunolocalización que se muestran arriba, donde también observamos a dAdd1 en regiones eucromáticas en los brazos cromosomales [Figura 12D y Figura S3].

Los resultados obtenidos en los análisis de ChIP sugieren que las proteínas dAdd1 tienen diferentes capacidades para unirse a distintas regiones de la cromatina. El hecho de que las proteínas dAtr_L y dAdd1 no se encuentran siempre juntas, como se observa en el ChIP y en los análisis de inmunolocalización, provee evidencia de que las proteínas dAdd1 tienen algunas funciones en las que dAtr_L no participa. Estos resultados también demuestran que dAtr_L se puede unir a regiones de la cromatina sin ayuda de las proteínas dAdd1, posiblemente a través de interacciones con otros factores tales como DREF (Valdez-Graham *et al*, 2012)

La colocación de HP1a, dAtr_L y dAdd1 en el cromocentro sugiere que las proteínas dAdd1 están involucradas en el mantenimiento de la heterocromatina. En un modelo de mantenimiento de la heterocromatina propuesto por Eusternmann y cols. (2011), el dominio ADD de la proteína hATRX, reforzado por la interacción con HP1a, reconoce a la heterocromatina pericentromérica. Una vez que hATRX es reclutado su dominio helicasa/ATPasa dirige la deposición de la variante de histonas H3.3 (Eusternmann *et al*, 2011).

Aún no ha sido determinado si dAtr_L está involucrada en la deposición de la variante de histonas H3.3, pero si se sabe que tanto HP1a y dAtr_L se localizan en el cromocentro de los cromosomas politénicos y actúan como supresores del efecto de la variegación del alelo *w^{m4}*, una inversión que cae cerca de la heterocromatina pericentromérica (Bassett *et al*, 2008).

Siguiendo esta hipótesis probamos si *dadd1* tiene la capacidad de suprimir el efecto de la variegación. Nosotros utilizamos la línea *BL1*, la cual es portadora de una construcción que porta al gen reportero *LacZ*. Ésta última en la línea *BL1* se ubica cerca del centrómero (Lu *et al*, 1996; Gu y Elgin, 2013). Mediante este ensayo, se quería determinar si dAdd1 está involucrado en el establecimiento de la heterocromatina, cruzando hembras vírgenes portadoras de los alelos *dadd1* con los machos portadores del reportero *BL1* (efecto materno), o en el mantenimiento de la heterocromatina, cruzando machos portadores del alelo *dadd1* con hembras portadoras del reportero *BL1* (efecto del cigoto) (Gu y Elgin, 2013) (ver material y métodos). Los resultados muestran que *dadd1* no tiene un papel relevante en el

establecimiento de la heterocromatina pericentromérica [comparar con las barras M (Materno) y C (control) en la Figura 15C grafico superior]. Cuando analizamos el efecto del cigoto, las hembras vírgenes *BL1* cruzadas con los machos portadores de los alelos *dadd1*, la actividad de LacZ fue consistentemente mayor en las mutantes *dadd1* [comparar la barra Z (cigótico por su sigla en inglés *zygotic*) con la C (control) en la figura 15C gráfico superior], lo cual indica que el alelo *dadd1* puede suprimir el efecto de variegación por posición y que *dadd1* juega un papel importante en el mantenimiento de la heterocromatina pero no en el establecimiento de la heterocromatina.

Por otro lado, se probó si la combinación de los alelos *dadd1* y *atrX* incrementa el efecto de supresión de la variegación por posición de manera cooperativa. Nuestros resultados demuestran que las moscas transheterocigas *dadd1/atrX* suprimen la variegación de manera más eficiente que las moscas heteroalélicas que portan solo los alelos *dadd1* o *atrX* [comparar las barras tres y cuatro del grafico inferior de la Figura 15C].

Todos estos resultados, indican que las proteínas dAdd1 son capaces de interaccionar con proteínas, tales como HP1a, las cuales están involucradas en el establecimiento de la heterocromatina y que cooperan con dAtrXL en el mantenimiento de la heterocromatina.

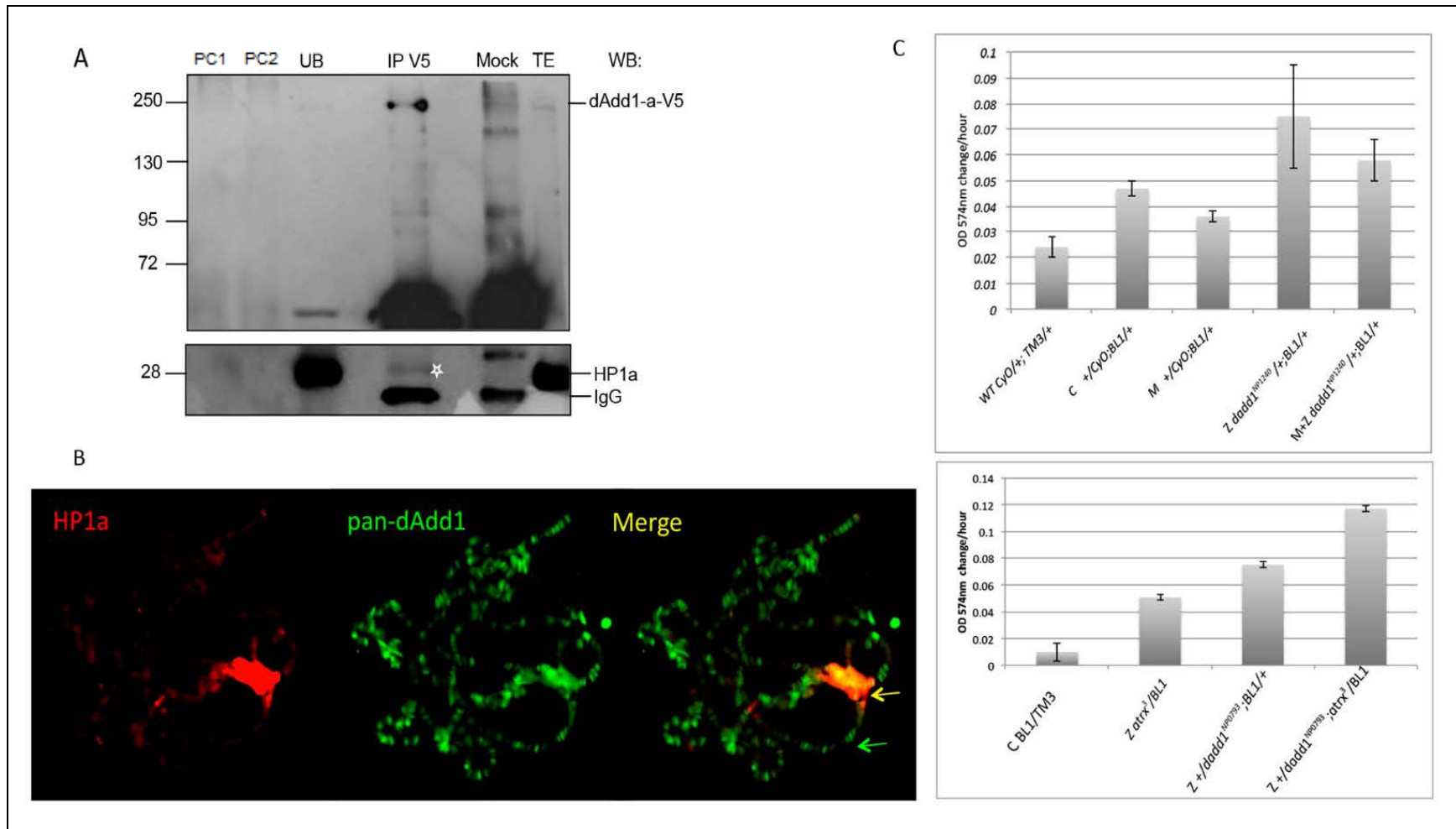


Figura 15 Las proteínas dAdd1 colocalizan en regiones heterocromáticas con HP1a y cooperan con dAtrx en el mantenimiento de la heterocromatina pericentromérica.

A. Ensayo de CoIP de dAdd1-a y HP1a. Extractos totales (TE) de células S2R⁺ transfectadas transitoriamente con dAdd1-a-V5, PC1 y PC2 son “preclearing” 1 y 2 (ver Material y Métodos); fracción proteica no unida (UB); IP realizada con anti-V5 (panel superior); “Mock” es la IP realizada con IgG purificada de ratón. La presencia de dAdd1-a-V5 se detectó utilizando el anticuerpo anti-V5. La presencia de HP1a se determinó utilizando el anticuerpo anti-HP1a (CIA9) (panel inferior). Los marcadores de peso molecular en los paneles de la izquierda representan kDa. **B.** Preparaciones de cromosomas politénicos de larvas OreR silvestre de la tercera etapa de desarrollo se tiñeron simultáneamente con los anticuerpos anti-

HP1a (señal roja) y pan-dAdd1 (a-c) (señal verde). "Merge": bandas de anti-HP1a y pan-dAdd1 visualizadas al mismo tiempo, ambas señales se observan principalmente en el cromocentro (señal amarilla). C. *dadd1* es un supresor de variegación por efecto de posición. Ensayo cuantitativo de β -galactosidasa. Las gráficas muestran que los alelos *dadd1* pueden suprimir el efecto de variegación por posición, se graficó la actividad enzimática de Lac-Z. WT = moscas silvestres (por sus siglas en inglés wild type) con los cromosomas balanceadores *CyO* y *TM3*; C = moscas control derivadas de la progenie F1 de padres portadores de los alelos *dadd1*; M = depleción maternal, progenie F1 proveniente de moscas que portan los alelos maternos *dadd1*; Z = depleción cigótica, moscas provenientes de la cruce de machos portadores de los alelos *dadd1* con hembras portadoras de los alelos *BL1*; M+Z = depleción maternal y cigótica, moscas derivadas de la cruce de hembras portadoras de los alelos *dadd1* con machos portadores del alelo *BL1* reportero. La gráfica de abajo muestra que moscas heterocigas *dadd1/atrx* tienen un efecto aditivo en la supresión de la variegación por efecto de posición.

Su(var)205 interacciona genéticamente con *dadd1* y *atrx*.

En este trabajo ya se han mostrado los experimentos que demuestran que los individuos *dadd1/atrx* presentan masas melanóticas, también se han mostrado los datos que indican que las proteínas dAdd1 junto con dAtrxL y HP1a participan en el establecimiento y mantenimiento de la heterocromatina. Debido a todos estos datos surgió la siguiente interrogante: ¿La formación de los tumores melanóticos en los individuos *dadd1/atrx* es consecuencia de la falta de regulación en el proceso de establecimiento y mantenimiento de la cromatina?. Para contestar esta pregunta se probó si el alelo de pérdida de función de HP1a en presencia de alelos de *dadd1* y/o *atrx* afecta la presencia de masas melanóticas en individuos *dadd1/atrx*. Para estos experimentos genéticos se utilizó el alelo *Su(var)205²*, este es un alelo de HP1a de pérdida de función, debido a que porta una mutación en el aminoácido 26 el cual se ubica dentro del cromodominio.

Los resultados obtenidos muestran que moscas transheterocigas *Su(var)205²* portadoras de alelos *dadd1*, o *atrx¹* o *atrx²* no presentan masas melanóticas, mientras que moscas portadoras de los alelos *Su(var)205²* y *atrx³* (el cual afecta solamente a la isoforma larga de *dAtrx*) presentan masas melanóticas en un porcentaje muy bajo [Tabla 5]. El porcentaje de masas melanóticas en

individuos: $dadd^{NP1240}/+; atrx^3$ (4%) o $Su(var)205^2/+; atrx^3/+$ (2%) se incrementa hasta en un 14% cuando alelos de los tres genes están presentes al mismo tiempo en individuos: $Su(var)205^2/dadd^{NP1240}; atrx^3/+$ [Tabla 5]. Estos datos demuestran que la presencia de masas melanóticas en moscas transheterocigas $dadd1$, $atrx$ y $Su(var)205$ parece ser consecuencia de la desregulación en el mantenimiento de la heterocromatina.

Tabla 5 Interacción de $Su(var)205$ con $dadd1$ y $atrx$.

Genotipo	Masas melanóticas ^a (%)
$Su(var)205^2/+$	0/487 (0)
$Su(var)205^2/+; atrx^3/+$	6/366 (2)
$Su(var)205^2/dadd1^{NP1240}$	0/201 (0)
$dadd1^{NP1240}/+; atrx^3/+$	3/69 (4)
$Su(var)205^2/dadd1^{NP1240}; atrx^3/+$	16/111(14)

^a Número de individuos adultos con masas melanóticas [Figura 14B] observados divididos entre el número total de individuos de la clase. El porcentaje se encuentra en paréntesis.

DISCUSIÓN

En vertebrados, hATRX es una proteína que contiene un dominio ADD y un motivo SNF2 helicasa ATPasa. A través de la evolución, el dominio SNF2 de hATRX se ha conservado, sin embargo en invertebrados, el dominio ADD se ha perdido [Figura 10D, Park *et al*, 2004]. En este trabajo, hemos descrito la caracterización de las proteínas dAdd1 de *Drosophila* como ortólogos de la región amino-terminal de Atrx. El gen $dadd1$ durante todo el desarrollo de *Drosophila* expresa las proteínas dAdd1, las cuales tienen un dominio ADD [Figura 10C]. La estructura 3D del dominio ADD de las proteínas dAdd [Figura 10B] se asemeja más a la estructura 3D del dominio

ADD de hATRAX que al dominio ADD de otras proteínas. En este trabajo se ha demostrado que dAdd1 y dAtrx interaccionan física [Figura 13A, 13B, 13D] y genéticamente [Tablas 4 y 5], además interaccionan con HP1a en regiones heterocromáticas [Figura 14B].

El gen *hATRAX* codifica una proteína, que pertenece a la familia de proteínas helicasa/ATPasa tipo SNF2, que tiene muchas funciones. Esta proteína forma parte de un complejo que incluye a la proteína DAXX, la cual funge como chaperona de la variante de histonas H3.3, y esta involucrada en la deposición de esta variante de histonas en la heterocromatina telomérica y centromérica (Drane' P *et al*, 2010; Gibbons *et al*, 2008 Lewis *et al*, 2010). Asimismo, la proteína hATRAX se puede unir a regiones en el genoma que potencialmente son capaces de formar la estructura G-cuadruplex y se ha propuesto que la unión de hATRAX evita que se forme la estructura G-cuadruplex y esto permite la deposición de la variante de histonas H3.3 para lo cual se requiere la actividad helicasa/ATPasa de hATRAX, aunque aún no se ha determinado si esta actividad también se requiere para la unión y reconocimiento de las estructuras G-cuadruplex del ADN. Adicionalmente al dominio SNF2 helicasa/ATPasa, hATRAX tiene un dominio amino-terminal llamado ADD compuesto de dos dedos de zinc: un dedo tipo GATA y un dedo PHD. Este dominio es capaz de reconocer a través del "pocket hidrofóbico" a la marca de histonas H3K9me3 en combinación con la H3K4 no modificada, lo cual es una característica poco usual de los dedos de zinc PHD zinc finger (Li y Li, 2012). Se ha demostrado que la interacción entre hATRAX y la histona H3 (H3K9me3 en combinación con la H3K4 no modificada), mantiene a hATRAX unida a la heterocromatina pericentromérica. Se ha

propuesto un modelo en el cual hATRX es dirigido hacia heterocromatina pericéntrica a través del dominio ADD, y su interacción es reforzada por la interacción entre hATRX y HP1a. En este modelo, el dominio SNF2 helicasa/ATPasa dirige la deposición de la H3.3 o realiza alguna otra función dependiente de ATP (Eustermann *et al*, 2011).

dadd1 codifica tres polipéptidos que contienen un dominio ADD que es altamente similar al dominio ADD de hATRX (36% de identidad y 52% de similitud, Alekseyenko *et al*, 2014 y este trabajo). Al comparar el análisis de la estructura 3D de ADD de dAdd1 de *Drosophila* y hATRX revela que estos dominios se sobrelapan y que el “pocket” de reconocimiento de histonas se encuentra conservado.

En este trabajo el análisis de inferencia filogenética utilizando el dominio de ADD de hATRX indica que el gen ATRX sufrió un evento de fisión. Esta fisión ha sido descrito en al menos otro gen que codifica para una proteína portadora de un dominio de unión a la cromatina, llamada cara mitad (cmi), la cual es la homóloga de la posición amino-terminal de las proteínas de mamífero MLL2 y MLL3 (Chauhan *et al*, 2012).

Es importante mencionar que hay al menos tres isoformas de la proteína dAdd1 generadas por “splicing” diferencial del gen *dadd1*. La isoforma dAdd1-a contiene el dominio ADD y ningún otro dominio, mientras que las otras dos isoformas tienen dominios adicionales llamados MADF. Los dominios MADF son

una subfamilia de los dominios SANT. En algunas proteínas de *Drosophila* se ha reportado que estos dominios MADF se unen a ADN. En el caso de Adf1, el primer factor identificado en *Drosophila* que tiene homología con la oncoproteína Myb (England *et al*, 1992), el dominio MADF reconoce y se une a ciertas secuencias de ADN repetido (Casola *et al*, 2007), aunque existen algunos ejemplos en los cuales los dominios MADF también pueden unirse a proteínas, aparentemente su especificidad depende del punto isoeléctrico del dominio (Maheshwari *et al*, 2008).

El punto isoeléctrico que se calcula a partir de la secuencia proteica de cada uno de los tres dominios MADF de las proteínas MADF dAdd1 es básico, lo cual indica que estos dominios podrían unirse al ADN. El hecho de que estas proteínas adquirieran nuevos dominios indica que posiblemente tienen funciones divergentes. Un indicador de este hecho es el patrón de inmunolocalización de dAdd1 en los cromosomas politénicos [Figura 12D y S3], donde observamos que no todas las señales derivadas del anticuerpo pan-dAdd1 colocalizan con la señal de dAtr_L. Esto indica que las isoformas dAdd1 también pueden tener funciones independientes a su interacción con dAtr_L.

En este trabajo se propone que se puede utilizar a *D. melanogaster* como modelo de estudio del cáncer y uno de los factores genéticos en los que se podrían enfocar los esfuerzos son *xnp/datrx* y *dadd1*, debido a que como ya se ha mencionado la sobrevivencia de individuos transheterocigos portadores de los alelos *dadd1/atrx* está comprometida, y algunas de las larvas e individuos adultos muestran masas melanóticas. Diversos estudios han demostrado que las masas

melanóticas en larvas y adultos de *Drosophila*, cuando se generan como consecuencia de mutaciones de genes relacionados con el cáncer, son el equivalente de los tumores cancerígenos que aparecen en humanos (Minakhina y Steward, 2010). Cabe señalar que organismos que tienen una vida corta como *Drosophila melanogaster* no desarrollan cáncer de manera natural, debido a que el número de divisiones celulares que ocurren durante su vida es significativamente menor al que el ser humano necesita para mantener sus tejidos durante largos periodos de tiempo (Tipping y Perrimon, 2014). Sin embargo, diversos estudios han demostrado que las células de *Drosophila* pueden exhibir características clásicas de cáncer, cuando genes relacionados con el cáncer son perturbados, tales como: evadir la apoptosis, proliferar de forma sostenida, metástasis, sobrevivir de manera prolongada, presentar inestabilidad del genoma y sufrir reprogramación metabólica (Hanahan y Weinberg, 2000, 2011; Luo *et al*, 2009).

En *Drosophila* la generación de masas melanóticas involucra problemas en la diferenciación del sistema hematopoyético. En humanos el estudio de cáncers en los que está implicado el sistema hematopoyético es complicado, debido a que las células madre del sistema hematopoyético (HSCs por sus siglas en inglés hematopoietic stem cells) se encuentran controladas por un microambiente que promueve su regeneración o diferenciación en diferentes linajes celulares (Schofield, 1978; Dykstra *et al.*, 2007). En los humanos cuando se rompe esta regulación se ocasionan algunos tipos de cáncer, entre los que se puede mencionar a la leucemia mieloide aguda (LMA) (Bonnet y Dick, 1997; Reya *et al*, 2001). Para

investigar los factores genéticos que determinan la generación y progresión de cáncer que implican la degeneración de las HSC es necesario estudiar rigurosamente su nicho. Para este propósito utilizar a *Drosophila melanogaster* como modelo de estudio es más ventajoso que el uso de mamíferos debido a que carece de médula espinal. La complejidad de la médula espinal, la cual brinda alojamiento a las HSCs en humanos y otros vertebrados, ha entorpecido los esfuerzos por entender la forma en que se regulan las HSCs. En *D. melanogaster* los precursores de las células equivalentes a las HSCs de humano llamadas prohemocitos se localizan en un área específica de la glándula linfática llamada centro posterior de señalización (PSC por sus siglas en inglés: posterior signaling center) (Lebestky *et al*, 2003; Jung *et al*, 2005), lo cual provee un sistema mucho más accesible para estudiar las señales que determinan el destino de las HSCs.

Es importante recordar que en el humano se ha encontrado que la expresión de ATRX y su función se encuentra regulada anormalmente en diversos tipos de cáncer, entre los que se puede mencionar la leucemia mieloide aguda LMA (AML por sus siglas en inglés: acute myeloid leukemia). Éste es un tipo de cáncer producido en las células de la línea mieloide de los leucocitos, caracterizado por la rápida proliferación de células anormales que se acumulan en la médula ósea e interfieren en la producción de glóbulos rojos normales (Fadoo *et al*, 2012). Muchos pacientes con LMA suelen presentar una serie de anomalías citogenéticas específicas (Niederhuner *et al*, 2014). Algunos pacientes que tienen LMA presentan mutaciones en el dominio PHD de ATRX lo cuál exacerban el fenotipo de

hematopoyesis o tienen niveles de expresión anormales del gen *ATRX* (Gibbons *et al*, 2003; Serrano *et al*; 2006). Éste hecho refuerza la idea de utilizar a *Drosophila* como modelo de estudio del cáncer enfocándose en la interacción *dadd1* y *datrx*, debido a que el gen *dadd1* codifica proteínas que portan el dominio ADD el cuál se compone de un dedo de zinc tipo GATA y un dominio tipo PHD. En este trabajo se aportaron datos que demuestran que las proteínas dAdd1 colocalizan con HP1a en algunas regiones de la cromatina y además que dAdd1-a inmunoprecipita con HP1a. La disminución en los niveles de HP1a en las moscas *dadd1/atrx* aumenta la incidencia de masas melanóticas. Estos resultados se encuentran soportados por el reporte reciente de Alekseyenko y cols. (2014), en el cual se demostró que dAdd1 interacciona físicamente con HP1a y que dAdd1 es un supresor de la variegación. Estos datos llevan a suponer que la formación de masas melánóticas en individuos portadores de los alelos *dadd1/datrx* es consecuencia de problemas en la regulación de la formación y/o mantenimiento de la heterocromatina.

En *Drosophila* la diferenciación de células hematopoyéticas toma lugar en el mesodermo del embrión y en la glándula linfática de la larva, tres diferentes tipos celulares se derivan de los prohemocitos: los plasmocitos, las células cristal y lamelocitos. Diversas vías regulan la diferenciación de estas células (Jung *et al*, 2005). Una de esas vías involucra el balance en la expresión de las proteínas Pnr-a y Pnr-b, la cual es controlada por la vía JAK/STAT (Minakhina *et al*, 2011). La hiperactivación de Jak resulta en la proliferación de hemocitos, diferenciación de lamelocitos y la generación de pseudotumores melanóticos. Los pseudotumores o

masas melanóticas se forman por las células cristal y lamelocitos (Minakhina y Steward, 2006). Por otro lado, Stat es un regulador positivo de la diferenciación de los plasmocitos, y uno de los factores regulados río abajo por la vía Stat es el factor GATA Pannier (Minakhina *et al*, 2011). Nuestro grupo ha identificado a *pannier* (*pnr*) como un gen regulado por dAtr_L y DREF, otro factor transcripcional (Valadez-Graham *et al*, 2012). En dicho reporte, nosotros concluimos que dAtr_L se recluta al promotor del gen *pnr* a través de DREF, y de esta manera éste actúa como co-represor de la expresión del gen *pnr*. Lo que es más, los datos obtenidos a partir de las interacciones genéticas entre los alelos *dadd1*, *atr* y *Su(var)205²* indican que las masas melanóticas se derivan por problemas en las proteínas involucradas en el mantenimiento de la heterocromatina, tales como dAtr_L y HP1a. El ensayo de variegación por efecto de posición indica que las proteínas dAdd1 están involucradas en el mantenimiento de la heterocromatina. Por ello, una hipótesis atractiva es suponer que dAdd1, dAtr_L y HP1a cooperan y promueven la heterocromatinización en los promotores de los genes involucrados en la vía JAK/STAT incluyendo *pnr*. La carencia de estas proteínas lleva a la desregulación de los efectores de la vía, dando lugar a masas melanóticas. Se están efectuando experimentos para probar nuestra hipótesis.

En humanos portadores del síndrome ATR-X, la mayoría de las mutaciones identificadas afectan a los dominios ADD y helicasa ATPasa. El hecho de que estos dominios estén separados en la mosca provee una nueva herramienta de estudio

para estudiar las funciones que individualmente tienen estos dominios durante el desarrollo del organismo.

CONCLUSIONES

- Las proteínas codificadas por el gen *dadd1* son ortólogas del extremo amino terminal de la proteína hATR_X.
- dAdd1 y dAtr_x interactúan físicamente. Todas las isoformas de dAdd1 tienen la capacidad de interactuar directamente con dAtr_{xL}.
- *dadd1* y *datrx* interactúan genéticamente, dicha interacción es esencial para el desarrollo de la mosca. La supervivencia de individuos transheterocigotos portadores de los alelos *dadd1/atrx* está comprometida, y algunas de las larvas e individuos adultos muestran masas melanóticas.
- El hecho de que las proteínas dAtr_{xL} y dAdd1 no se encuentran siempre juntas, como se observa en el ChIP y en los análisis de inmunolocalización, provee evidencia de que las proteínas dAdd1 tienen funciones en las que dAtr_{xL} no participa.
- *dadd1* juega un papel importante en el mantenimiento de la heterocromatina, pero no en el establecimiento de la heterocromatina.
- Las proteínas dAdd1 son capaces de interactuar con proteínas, tales como HP1a, las cuales están involucradas en el establecimiento de la heterocromatina y que cooperan con dAtr_{xL} en el mantenimiento de la heterocromatina.

- La presencia de masas melanóticas en moscas transheterocigas *dadd1, atrx* y *Su(var)205* parece ser consecuencia de la desregulación en el mantenimiento de la heterocromatina.

PERSPECTIVAS

- En organismos *dadd1/attrx* determinar durante las etapas embrionarias y larvarias la presencia de lamelocitos, sea que se observen o no masas melánóticas, de igual forma caracterizar la forma y tamaño de estas células.
- Determinar si dAdd1, dAtr_L y HP1a cooperan y promueven la heterocromatinización en los promotores de los genes involucrados en la vía JAK/STAT incluyendo *pnr*.
- Determinar si los niveles de expresión de genes involucrados en la vía JAK/STAT se modifican en individuos *dadd1/attrx* con respecto a los organismos silvestres.
- Determinar si dAdd1, dAtr_L y HP1a cooperan y promueven la heterocromatinización en los promotores de los genes involucrados en las vías Wingless (Wn), Hedgehog (Hh) y JNK, las cuales son vías involucradas en regular la diferenciación y proliferación de prohemocitos.
- Determinar si los niveles de expresión de genes involucrados en las vías Wn, Hh y JNK, se modifican en individuos *dadd1/attrx* con respecto a los organismos silvestres.
- Determinar si *dadd1* y/o *datrx* interaccionan genéticamente con genes involucrados en las vías JAK/STAT, Wn, Hh y JNK.

LITERATURA CITADA

- Abascal F, Zardoya R and D Posada *ProtTest*: selection of best-fit models of protein evolution *BIOINFORMATICS APPLICATIONS NOTE* Vol. 21 no. 9 2005, pages 2104–2105.
- Abbas A, Lichtman A and S Pillai (2008). *Inmunología Celular y Molecular*. 6ª Edición. Sección IV: mecanismos efectores de las respuestas inmunitarias; Citoquinas McGraw-Hill Interamericana de España S.L. 624pp
- Ahmad K and S Henikoff (2002). The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Mol. Cell* 9, 1191–1200.
- Alekseyenko AA, Gorchakov AA, Zee BM, Fuchs SM, Kharchenko PV and M.I. Kuroda (2014) Heterochromatin-associated interactions of *Drosophila* HP1a with dADD1, HIP1, and repetitive RNAs. *Genes Dev* 28: 1445–60.
- Allis C. David, Jenuwein Thomas, D Reinberg and M-L Caparros (2007). *Epigenetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Edition 2009: 29-33.
- Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U and HY Zoghbi (1999). "Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2". *Nat. Genet.* 23 (2): 185–8. doi:10.1038/13810. PMID 10508514.
- Argentaro A, Yang JC, Chapman L, Kowalczyk MS, Gibbons RJ, Higgs DR, Neuhaus D and D Rhodes (2007). Structural consequences of diseasecausing mutations in the ATRX-DNMT3-DNMT3L (ADD) domain of the chromatin-associated protein ATRX. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104(29): 11939–11944. doi:10.1073/pnas.0704057104.
- Antão JM, Mason JM, Déjardin J and RE Kingston (2012). Protein landscape at *Drosophila melanogaster* telomere-associated sequence repeats. *Mol Cell Biol* 32: 2170–82.
- Arnold K1, Bordoli L, Kopp J and T Schwede (2006) The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*. 2006 Jan 15;22(2):195-201. Epub 2005 Nov 13.
- Bassett AR, Cooper SE, Ragab A and AA Travers (2008). The chromatin remodelling factor dATRX is involved in heterochromatin formation. *PLoS ONE*, 3(5): e2099. doi:10.1371/journal.pone.0002099.
- Baumann C, Schmidtmann A, Muegge K and R De La Fuente (2008). Association of ATRX with pericentric heterochromatin and the Y chromosome of neonatal mouse spermatogonia. *BMC Mol. Biol.* 9(1): 29. doi:10.1186/1471-2199-9-29.
- Baker LA, Allis CD and GG Wang (2008). PHD fingers in human diseases: disorders arising from misinterpreting epigenetic marks. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 647 3–12. (doi:10.1016/j.mrfmmm.2008.07.004)
- Bagheri-Fam S, Argentaro A, Svingen T, Combes AN, Sinclair A. H., Koopman P and VR Harley (2011). Defective survival of proliferating Sertoli cells and androgen receptor function in a mouse model of the ATR-X syndrome. *Human Molecular Genetics*. Vol. 20, No. 11.

- Banaszynski LA, Allis CD and PW Lewis (2010). Histone variants in metazoan development. *Dev Cell* 19: 662–674.
- Bérubé NG, Smeenk CA and D.J Picketts (2000). Cell cycle dependent phosphorylation of the ATRX protein correlates with changes in nuclear matrix and chromatin association. *Hum. Mol. Genet.* 9(4): 539–547. doi:10.1093/hmg/9.4.539.
- Bérubé NG, Jagla M, Smeenk C, De Repentigny Y, Kothary R and DJ Picketts (2002). Neurodevelopmental defects resulting from ATRX overexpression in transgenic mice. *Hum. Mol. Genet.* 11(3): 253–261. doi:10.1093/hmg/11.3.253.
- Bérubé NG, Mangelsdorf M, Jagla M, Vanderluit J, Garrick D, Gibbons, RJ, Higgs DR, Slack RS and DJ Picketts (2005). The chromatin-remodeling protein ATRX is critical for neuronal survival during corticogenesis. *J. Clin. Invest.* 115: 258–267.
- Bérubé NG, Healy J, Medina CF, Wu S, Hodgson T, Jagla M and DJ Picketts (2008). Patient mutations alter ATRX targeting to PML nuclear bodies. *Eur. J. Hum. Genet.* 16(2): 192–201. doi:10.1038/sj.ejhg.5201943.
- Bérubé NG (2011) ATRX in chromatin assembly and genome architecture during development and disease. *Biochem. Cell Biol.* 89: 435–444
- Bender AM, Wells O and DS (2004). Fay: lin-35/Rb and xnp-1/ATR-X function redundantly to control somatic gonad development in *C. elegans*. *Dev Biol.* Vol. 273:335-49.
- Bhaskar V and AJ Courey (2002). The MADF-BESS domain factor Dip3 potentiates synergistic activation by Dorsal and Twist. *Gene* 299: 173–84
- Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, Arnold K, Studer G, Schmidt T, Kiefer F, Cassarino TG, Bertoni M, Bordoli L and T Schwede (2014). SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res.* Jul; 42 (Web Server issue):W252-8. doi: 10.1093/nar/gku340. Epub 2014 Apr 29.
- Bonnet D and J.E Dick (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3:730–737.
- Cardoso C, Timsit, S, Villard L, Khrestchatisky M, Fontes M and L Colleaux (1998). Specific interaction between the XNP/ATR-X gene product and the SET domain of the human EZH2 protein. *Hum. Mol. Genet.* 7(4): 679–684. doi:10.1093/hmg/7.4. 679.
- Casanova JL, Holland SM and LD Notarangelo (2012). Inborn errors of human JAKs and STATs. *Immunity.* Apr 20;36(4):515-28. doi:10.1016/j.immuni.2012.03.016.
- Clappier CR and BR Cairns (2009). The Biology of Chromatin Remodeling Complexes. *Annu. Rev. Biochem.* 2009. 78:273–304
- Casola C, Lawing AM, Betrán E and C Feschotte (2007). PIF-like transposons are common in *Drosophila* and have been repeatedly domesticated to generate new host genes. *Mol Biol Evol* 24: 1872–1888.
- Chauhan C, Zraly CB, Parilla M, Diaz MO, and AK Dingwall (2012). Histone recognition and nuclear receptor co-activator functions of *Drosophila* cara mitad, a homolog of the N-terminal portion of mammalian MLL2 and MLL3. *Development* 139: 1997–2008.

- De Castro E, Sigrist CJA, Gattiker A, Bulliard V, Langendijk-Genevaux PS, Gasteiger E, Bairoch A, Hulo N (2006) ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Res.* Jul 1;34
- De La Fuente R, Baumann C and MM Viveiros (2011) Role of ATRX in chromatin structure and function: implications for chromosome instability and human disease. *Reproduction*142:221–234
- De la Cruz X, Lois S, Sánchez-Molina S and MA. Martínez-Balabás. (2005) Do protein motifs read the histone code? *BioEssays* 27:164–175.
- Dhayalan A, Tamas R, Bock I, Tattermusch A, Dimitrova E, Kudithipudi S, Ragozin S and A Jeltsch . (2011). The ATRX-ADD domain binds to H3 tail peptides and reads the combined methylation state of K4 and K9. *Hum Mol Genet* 20: 2195–2203.
- Drané P, Ouararhni K, Depaux A, Shuaib M and A Hamiche A (2010). The death-associated protein DAXX is a novel histone chaperone involved in the replication-independent deposition of H3.3. *Genes Dev*; 24:1253-65; PMID:20504901; <http://dx.doi.org/10.1101/gad.566910>.
- Dykstra B, Kent D, Bowie M, McCaffrey L, Hamilton M, Lyons K, Lee SJ, Brinkman R and C Eaves (2007). Long-term propagation of distinct hematopoietic differentiation programs *in vivo*. *Cell Stem Cell* 1:218–229.
- Eisen JA, Sweder KS and PC Hanawalt (1995) Evolution of the SNF2 family of proteins: subfamilies with distinct sequences and functions. *Nucleic Acids Res* 23, 2715–2723.
- Eissenberg JC, James TC, Foster-Hartnett DM, Hartnett T, Ngan V, Elgin SCR (1990) Mutation in a heterochromatin-specific chromosomal protein is associated with suppression of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 9923-9927.
- Eissenberg JC, Morris G, Reuter G, Hartnett T (1992) The heterochromatin associated protein HP1 is an essential protein in *Drosophila* with dosage dependent effects on position effect variegation. *Genetics* 131: 345-352.
- Elsässer SJ, Allis CD and PW Lewis (2011) New epigenetic drivers of cancers. *Science* 331 1145–1146. (doi:10.1126/science.1203280).
- Elsässer SJ, Huang H, Lewis PW, Chin JW, Allis CD and DJ Patel (2012). DAXX envelops a histone H3.3-H4 dimer for H3.3-specific recognition. *Nature*; 491:560-5; PMID:23075851; <http://dx.doi.org/10.1038/nature11608>.
- Emelyanov AD, Konev YA, Vershilova E and DV Fyodorov (2010). Protein complex of *Drosophila* ATRX/XNP and HP1a is required for the formation of pericentric beta-heterochromatin *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, 285, 15027–15037.
- England BP, Admon A and R Tjian (1992). Cloning of *Drosophila* transcription factor Adf-1 reveals homology to Myb oncoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 683–687.
- Eustermann S, Yang JC, Law MJ, Amos R, Chapman LM, Jelinska C, Garrick D, Clynes D, Gibbons RJ, Rhodes D, Higgs DR and D Neuhaus (2011). Combinatorial readout of histone H3 modifications specifies localization of ATRX to heterochromatin. *Nat Struct Mol Biol*; 18:777-82; PMID:21666677; <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.2070>.

- Fadoo Z, Mushtaq N, Alvi S, Ali M. Acute myeloid leukaemia in children: experience at a tertiary care facility of Pakistan. (2012) *J Pak Med Assoc.* Feb;62(2):125-8.
- Felsenfeld G and M Groudine. (2003). Controlling the double helix. *Nature*, 421(6921), 444-8. doi:10.1038/nature01410
- Fiskus W, Pranpat M, Balasis M, Herger B, Rao R, Chinnaiyan A, Atadja P and K Bhalla (2006). «Histone deacetylase inhibitors deplete enhancer of zeste 2 and associated polycomb repressive complex 2 proteins in human acute leukemia cells». *Mol Cancer Ther* 5 (12): pp. 3096–104. doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0418. PMID 17172412.
- Flaus A, Martin DM, Barton GJ, T Owen-Hughes (2006). Identification of multiple distinct Snf2 subfamilies with conserved structural motifs. *Nucleic Acids Res.* 2006 May 31;34(10):2887-905. Print 2006.
- Flaus A and T Owen-Hughes (2011). Mechanisms for ATP-dependent chromatin remodelling: the means to the end. *FEBS Journal* 278: 3579–3595.
- Frydrychova RC, Mason JM and TK Archer (2008). HP1 is distributed within distinct chromatin domains at *Drosophila* telomeres. *Genetics* 180: 121–31.
- Garrick D, Samaraa V, McDowella TL, Smithb AJH, Dobbie L, Higgsa DR, and RJ Gibbons (2004). A conserved truncated isoform of the ATR-X syndrome protein lacking the SWI/SNF-homology domain. *Gene* 326 23–34.
- Garrick D, Sharpe JA, Arkell R, Dobbie L, Smith AJ, Wood WG, Higgs DR and RJ Gibbons (2006). Loss of Atrx affects trophoblast development and the pattern of X-inactivation in extraembryonic tissues. *PLoS Genet.*2(4):e58. doi:10.1371/journal.pgen.0020058.
- Gibbons RJ, Suthers GK, Wilkie AOM, Buckle VJ and DR Higgs (1992). X-linked α thalassemia/mental retardation (ATR-X) syndrome: localisation to Xg12–21.31 by X-inactivation and linkage analysis. *Am. J. Hum. Genet.*, 51 (1992), pp. 1136–1149
- Gibbons RJ, Picketts DJ, Villard L and D.R. Higgs (1995) Mutations in a putative global transcriptional regulator cause X-linked mental retardation with alpha-thalassemia (ATR-X syndrome). *Cell* 80: 837–845.
- Gibbons RJ, Pellagatti A, Garrick D, Wood WG, Malik N, Ayyub H, Langford C, Boulwood J, Wainscoat JS and DR Higgs (2003). Identification of acquired somatic mutations in the gene encoding chromatin-remodeling factor ATRX in the [alpha]-thalassemia myelodysplasia syndrome (ATMDS). *Nat Genet* 34:446–449
- Gibbons R (2006) Alpha thalassaemia-mental retardation, X linked. *Orphanet J Rare Dis* 1: 15.
- Gibbons RJ, Wada T, Fisher C, Malik N, Mitson M, Steensma D, Goudie D, Fryer A, Krantz I and J Traeger-Synodinos. (2008) Mutations in the chromatin-associated protein ATRX. *Hum Mutat* 29: 796–802.
- Gibbons RJ (2012). α -Thalassemia, Mental Retardation, and Myelodysplastic Syndrome. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; doi: 10.1101/cshperspect.a011759
- Girtan JR and KM Johansen (2008). Chromatin structure and the regulation of gene expression: the lessons of PEV in *Drosophila*. *Adv Genet.* 2008;61:1-43. doi: 10.1016/S0065-2660(07)00001-6. Review.

- Goldberg AD, Banaszynski LA, Noh KM, Lewis PW, Elsaesser SJ, Stadler S, Dewell S, Law M, Guo X, Li X, Wen D, Chappier A, DeKolver RC, Miller JC, Lee YL, Boydston EA, Holmes MC, Gregory PD, Grealley JM, Rafii S, Yang C, Scambler PJ, Garrick D, Gibbons RJ, Higgs DR, Cristea IM, Urnov FD, Zheng D and C.D Allis (2010). Distinct factors control histone variant H3.3 localization at specific genomic regions. *Cell*; 140:678-91; PMID:20211137;http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.003.
- Griswold MD (1998). The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, 9, 411–416.
- Gu T and SC Elgin (2013). Maternal depletion of Piwi, a component of the RNAi system, impacts heterochromatin formation in *Drosophila*. *PLoS Genet*.9(9): e1003780.
- Guindon S and O Gascuel (2003). A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood." *Systematic Biology* 52, 696–704
- Hanratty WP and C.R Dearolf (1993). The *Drosophila* tumorous-lethal hematopoietic oncogene is a dominant mutation in the hopscotch locus. *Mol Gen Genet* 238:33–37.
- Harrison DA, Binari R, Nahreini TS, Gilman M and N Perrimon (1995). Activation of a *Drosophila* Janus kinase (JAK) causes hematopoietic neoplasia and developmental defects. *EMBO J* 14:2857–2865.
- Hargreaves DC and GR Crabtree (2011). ATP-dependent chromatin remodeling: genetics, genomics and mechanisms. *Cell Res* 21, 396–420.
- Hake SB and CD Allis, (2006). Histone H3 variants and their potential role in indexing mammalian genomes: the “H3 barcode hypothesis”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 6428–6435.
- Hake SB, Garcia BA, Duncan EM, Kauer M, Dellaire G, Shabanowitz J, Bazett-Jones DP, Allis CD and DF Hunt (2006). Expression patterns and post-translational modifications associated with mammalian histone H3 variants. *J. Biol. Chem.* 281, 559–568.
- Haas PS, Roy NB, Gibbons RJ, Deville MA, Fisher C, Schwabe M, Bisse E, van Dorselaer A, Higgs DR and M Lubbert (2009). The role of X-inactivation in the gender bias of patients with acquired a-thalassaemia and myelodysplastic syndrome (ATMDS). *Br J Haematol* 144: 538–545.
- Hanahan D and R.A. Weinberg (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57–70.
- Hanahan D and R.A Weinberg (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144:646–674.
- Henikoff S and TD Dreesen (1989). Trans-inactivation of the *Drosophila* brown gene: Evidence for transcriptional repression and somatic pairing dependence. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:6704–6708.
- Hu Z, Dandekar D, O’Shaughnessy PJ, De Gendt K, Verhoeven G and MF Wilkinson (2010). Androgen-induced Rhox homeobox genes modulate the expression of AR-regulated genes. *Mol. Endocrinol.*, 24,60–75.
- Iwase S, Xiang B, Ghosh S, Ren T, Lewis PW, Cochrane JC, Allis CD, Picketts DJ, Patel DJ, Li H, Shi Y (2011) ATRX ADD domain links an atypical histone

methylation recognition mechanism to human mental-retardation syndrome. *Nat Struct Mol Biol* 18(7): 769-76.

- Jiao Y, Shi C, Edil BH, de Wilde RF, Klimstra DS, Maitra A, Schulick RD, Tang LH, Wolfgang CL, Choti MA, Velculescu VE, Diaz LA Jr, Vogelstein B, Kinzler KW, Hruban RH and N Papadopoulos (2011). DAXX/ATR, MEN1, and mTOR pathway genes are frequently altered in pancreatic neuroendocrine tumors. *Science* 331: 1199–1203.

- Jin C, Zang C, Wei G, Cui K, Peng W, Zhao K and G Felsenfeld (2009).

H3.3/H2A.Z double variant-containing nucleosomes mark 'nucleosome-free regions' of active promoters and other regulatory regions. *Nat. Genet.* 41, 941–945.

- Jung SH, Evans CJ, Uemura C and U Banerjee (2005). The *Drosophila* lymph gland as a developmental model of hematopoiesis. *Development* 132: 2521–2533.

- Kernohan KD, Jiang Y, Tremblay DC, Bonvissuto AC, Eubanks JH, Mann MR and NG Bérubé (2010). ATRX partners with cohesin and MeCP2 and contributes to developmental silencing of imprinted genes in the brain. *Dev. Cell*, 18(2): 191–202. doi:10.1016/j.devcel.2009.12.017.

- Kornberg RD (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science*. May 24;184(4139):868-71.

- Lacronique V, Boureux A, Valle VD, Poirel H, Quang CT, Mauchauffe M, Berthou C, Lessard M, Berger R, Ghysdael J and OA Bernard (1997). A TEL-JAK2 fusion protein with constitutive kinase activity in human leukemia. *Science* 278:1309–1312.

- Ladurner AG (2003). Inactivating chromosomes: A macro domain that minimizes transcription. *Mol. Cell* 12: 1–3.

- Larkin, M.A. et al. (2007): Clustal W and Clustal X version 2.0. In: *Bioinformatics*. Bd. 23, S. 2947-2948. PMID 17846036

- Law MJ, Lower KM, Voon HP, Hughes JR, Garrick D, Viprakasit V, Mitson M, De Gobbi M, Marra M, Morris A, Abbott A, Wilder SP, Taylor S, Santos GM, Cross J, Ayyub H, Jones S, Ragoussis J, Rhodes D, Dunham I, Higgs DR and RJ Gibbons (2010). ATR-X syndrome protein targets tandem repeats and influences allele-specific expression in a sizedependent manner. *Cell*, 143(3): 367–378. doi:10.1016/j.cell.2010.09.023.

- Le SQ and Gascuel O (2001). An Improved General Amino Acid Replacement Matrix. *Mol Biol Evol* 25(7): 1307–1320.

- Le Douarin B, Nielsen AL, Garnier JM, Ichinose H, Jeanmougin F, R Losson and P Chambon. (1996). A possible involvement of TIF1 alpha and TIF1 beta in the epigenetic control of transcription by nuclear receptors. *EMBO J.* 15: 6701–6715.

- Lebestky T, Jung S.H and U. Banerjee (2003). A serrate-expressing signaling center controls *Drosophila* hematopoiesis. *Genes Dev* 17:348–353.

- Lechner MS, Schultz DC, Negorev D, Maul GG and FJ Rauscher 3rd (2005). The mammalian heterochromatin protein 1 binds diverse nuclear proteins through a common motif that targets the chromoshadow domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331(4): 929–937. doi:10.1016/j.bbrc.2005.04.016.

- Leclerc V, Tassan JP, O'Farrell PH, Nigg EA and P Leopold P (1996). *Drosophila* Cdk8, a kinase partner of cyclin C that interacts with large subunit of RNA polymerase II. *Mol. Biol. Cell* 7, 505-513.
- Letunic I and P Bork (2011). Interactive Tree Of Life v2: online annotation and display of phylogenetic trees made easy. *Nucleic Acids Res.* 2011 Jul; 39(Web Server issue):W475-8. doi: 10.1093/nar/gkr201. Epub 2011 Apr 5
- Lewis PW, Elsaesser SJ, Noh KM, Stadler SC and CD Allis (2010). Daxx is an H3.3-specific histone chaperone and cooperates with ATRX in replication-independent chromatin assembly at telomeres. *Proc Natl Acad Sci. U S A*; 107:14075-80; PMID:20651253; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1008850107>.
- Levenson JM and JD Sweatt (2005) Epigenetic mechanisms in memory formation. *Nat Rev Neurosci.* Feb; 6(2):108-18. Review.
- Levy B, Stephansky MR, Dobie KC, Monzani BA, Medina AM and RD Weiss (2009) The duration of inpatient admission predicts cognitive functioning at discharge in patients with bipolar disorder. *Compr Psychiatry.* Jul-Aug; 50(4):322-6. doi: 10.1016/j.comppsy.2008.09.005. Epub 2008 Nov 17.
- Lewis PW, Elsaesser SJ, Noh KM, Stadler SC, and Allis CD (2010) Daxx is an H3.3-specific histone chaperone and cooperates with ATRX in replication-independent chromatin assembly at telomeres. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 14075–14080.
- Liu CP, Xiong C, Wang M, Yu Z, Yang N, Chen P, Zhang Z, Li G and RM Xu (2012). Structure of the variant histone H3.3-H4 heterodimer in complex with its chaperone DAXX. *Nat Struct Mol Biol*; 19:1287-92; PMID:23142979; <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.2439>.
- Li Y and H Li (2012). Many keys to push: diversifying the 'readership' of plant homeodomain fingers. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 44: 28–39.
- Lindsley DL and GG Zimm (1992). *The Genome of Drosophila melanogaster*. Academic Press, New York. 1133pp
- Lovejoy CA, Li W, Reisenweber S, Thongthip S, Bruno J, de Lange T, De S, Petrini JHJ, Sung PA, Jasin M, Rosenbluh J, Zwang Y, Weir BA, Hatton C, Ivanova E, Macconail L, Hanna M, Hahn WC, Lue NF, Reddel RR, Jiao Y, Kinzler K, Vogelstein B, Papadopoulos N and Meeker AK (2012) Loss of ATRX, Genome Instability, and an Altered DNA Damage Response Are Hallmarks of the Alternative Lengthening of Telomeres Pathway. *PLoS Genetics* July 2012 | Volume 8 | Issue 7 | e1002772
- Lu BY, Bishop CP and JC Eissenberg (1996). Developmental timing and tissue specificity of heterochromatin-mediated silencing. *EMBO J* 15: 1323 – 1332.
- Lukacsovich T, Yuge K, Awano W, Asztalos Z, Kondo S, Juni N and D Yamamoto. The ken and barbie gene encoding a putative transcription factor with a BTB domain and three zinc finger motifs functions in terminalia development of *Drosophila*. *Arch Insect Biochem Physiol.* 2003 Oct;54(2):77-94.
- Luo J, Solimini NL and S.J Elledge (2009). Principles of cancer therapy: Oncogene and nononcogene addiction. *Cell* 136:823–837.
- Maheshwari S, Wang J and DA Barbash (2008) Recurrent positive selection of the *Drosophila* hybrid incompatibility gene *Hmr*. *Mol Biol Evol* 25: 2421–2430.

- Mandal L, Martinez-Agosto JA, Evans CJ, Hartenstein V and U. Banerjee U (2007). A Hedgehog- and antennapedia-dependent niche maintains *Drosophila* haematopoietic precursors. *Nature* 446:320–324.
- Matthews JM and M Sunde M (2002). Zinc fingers--folds for many occasions. *IUBMB Life*. 2002 Dec;54(6):351-5.
- Medina CF, Mazerolle C, Wang Y, Bérubé NG, Coupland S, Gibbons RJ, Wallace VA and DJ Picketts (2009). Altered visual function and interneuron survival in Atrx knockout mice: inference for the human Syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 18: 966–977.
- Maclean JA, Chen MA, Wayne CM, Bruce SR, Rao M, Meistrich ML, Macleod C and MF Wilkinson (2005). RhoX: a new homeobox gene cluster. *Cell*, 120, 369–382.
- Meyer, S (2012). CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS DEL GEN add EN EL DESARROLLO DE *Drosophila melanogaster*. Tesis para obtener el grado académico de maestro en ciencias. Director de tesis: Dra. Viviana Valadez Graham. Programa de maestría y doctorado en ciencias bioquímicas, UNAM.
- McDowell TL, Gibbons RJ, Sutherland H, O'Rourke DM, Bickmore WA, Pombo A, Turley H, Gatter K, Picketts DJ, Buckle VJ, Chapman L, Rhodes D and DR Higgs (1999). Localization of a putative transcriptional regulator (ATRX) at pericentromeric heterochromatin and the short arms of acrocentric chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96(24): 13983–13988. doi:10.1073/pnas.96.24.13983.
- Minakhina S and R Steward (2006). Melanotic mutants in *Drosophila*: pathways and phenotypes. *Genetics* 174: 253–263.
- Minakhina S, Tan W, Steward R (2011) JAK/STAT and the GATA factor Pannier control hemocyte maturation and differentiation in *Drosophila*. *Dev Biol* 352: 308–16.
- Mito Y, Henikoff JG and S Henikoff (2005). Genome-scale profiling of histone H3.3 replacement patterns. *Nat. Genet.* 37, 1090–1097.
- Mitson M, Kelley LA, Sternberg MJ, Higgs DR and RJ Gibbons (2011). Functional significance of mutations in the Snf2 domain of ATRX. *Hum Mol Genet* 20: 2603–2610.
- Nan X, Hou J, Maclean A, Nasir J, Lafuente MJ, Shu X, Kriaucionis S and A Bird (2007). Interaction between chromatin proteins. MECP2 and ATRX is disrupted by mutations that cause inherited mental retardation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104(8): 2709–2714. doi:10.1073/pnas.0608056104.
- Nasmyth K and CH Haering (2005). "The structure and function of SMC and kleisin complexes.". *Annu. Rev. Biochem.* 74: 595–648. doi:10.1146/annurev.biochem.74.082803.133219. PMID 15952899.
- Neumann-Mondlak, Adina. Análisis de la posible interacción entre dADD (CG8290) y dATRX en *Drosophila melanogaster* (2010). Tesis Licenciatura. UDLAP, Puebla, México.
- Niederhuber JE; Armitage JO; Doroshow JH; Kastan MB; Tepper JE and Abeloff (2014). Abeloff's clinical oncology. Philadelphia: Churchill Livingstone/Elsevier. 5^{ed}: 2831–32 pp.
- Owen-Hughes T. (2003) Colworth memorial lecture. Pathways for remodelling chromatin. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 893–905.

- Owusu-Ansah E and U Banerjee (2009). Reactive oxygen species prime *Drosophila* haematopoietic progenitors for differentiation. *Nature* 461:537–541.
- Palomera-Sanchez Z, Bucio-Mendez A, Valadez-Graham V, Reynaud E and M Zurita (2010). *Drosophila* p53 is required to increase the levels of the dKDM4B demethylase after UV induced DNA damage to demethylate histone H3-lysine 9. *J Biol Chem* 285: 31370–31379.
- Park DJ, Pask AJ, Huynh K, Renfree MB, Harley VR and JA Graves (2004). Comparative analysis of ATRX, a chromatin remodeling protein. *Gene* 2004, 339:39-48.
- Pedraza-Alva G, Mérida LB, Burakoff SJ, Rosenstein Y (1998) T cell activation through the CD43 molecule leads to Vav tyrosine phosphorylation and mitogen-activated protein kinase pathway activation. *J Biol Chem.* 273(23):14218-24.
- Pehrson JR and VA Fried (1992). MacroH2A, a core histone containing a large nonhistone region. *Science* 257: 1398–1400.
- Picketts DJ, Higgs DR, Bachoo S, Blake DJ, Quarrell OJW and RJ Gibbons (1996). ATRX encodes a novel member of the SNF2 family of proteins: mutations point to a common mechanism underlying the ATRX syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 5, 1899 – 1907.
- Picketts DJ, Tastan AO, Higgs DR and RJ Gibbons (1998). Comparison of the human and murine ATRX gene identifies highly conserved, functionally important domains. *Mamm. Genome* 9, 400–403.
- Qian L and R. Bodmer (2009). Partial loss of GATA factor Pannier impairs adult heart function in *Drosophila*. *Hum Mol Genet.* 2009 Sep 1;18(17):3153-63. doi: 10.1093/hmg/ddp254. Epub 2009 Jun 3.
- Rambaldi D1, Ciccarelli FD (2009). FancyGene: dynamic visualization of gene structures and protein domain architectures on genomic loci. *Bioinformatics.* 2009 Sep 1;25(17):2281-2. doi: 10.1093/bioinformatics/btp381. Epub 2009 Jun 19.
- Ratnakumar K, Duarte LF, LeRoy G, Hasson D, Smeets D, Vardabasso C, Bönisch C, Zeng T, Xiang B, Zhang DY, Li H, Wang X, Hake SB, Schermelleh L, Garcia BA and E Bernstein (2012). ATRX-mediated chromatin association of histone variant macroH2A1 regulates α -globin expression. *Genes Dev.* 2012 Mar 1;26(5):433-8. doi: 10.1101/gad.179416.111.
- Ray-Gallet D, Quivy JP, Scamps C, Martini EM, Lipinski M and G Almouzni (2002). HIRA is critical for a nucleosome assembly pathway independent of DNA synthesis. *Mol. Cell* 9, 1091–1100.
- Ren J, Wen L, Gao X, Jin C, Xue Y and X Yao (2009). DOG 1.0: illustrator of protein domain structures. *Cell Res.* 2009 Feb; 19(2):271-3. doi: 10.1038/cr.2009.6.
- Reya T, Morrison S.J, Clarke MF and I.L Weissman (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414:105–111.
- Ritchie K, Seah C, Moulin J, Isaac C, Dick F and NG Bérubé (2008). Loss of ATRX leads to chromosome cohesion and congression defects. *J. Cell Biol.* 180, 315–324.
- Sambrook J and DW Russell (2001), Molecular Cloning: A laboratory manual, 3rd ed, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York.

- Sass G and S Henikoff (1998) Comparative analysis of position-effect variegation mutations in *Drosophila melanogaster* delineates the targets of modifiers. *Genetics* 148:733–741.
- Sacristan C, Tussie-Luna MI, Logan SM and AL Roy (2004). Mechanism of Bruton's Tyrosine Kinase-mediated Recruitment and Regulation of TFII-I. Vol. 279 (8): 7147–7158.
- Schneider, I (1972). Cell Lines Derived from Late Embryonic Stages of *Drosophila melanogaster*. *J. Embryol. Exp. Morph.* 27: 363-365.
- Schreiber E, Matthias P, Müller MM, Schaffner W. (1989). Rapid detection of octamer binding proteins with mini-extracts, prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.* 17(15): 6419.
- Schneiderman JI, Sakai A, Goldstein S and K Ahmad (2009). The XNP remodeler targets dynamic chromatin in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106(34): 14472–14477. doi:10.1073/pnas.0905816106.
- Schofield R (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 4:7–25.
- Schoeftner S and M.A. Blasco (2008) Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. *Nature Cell Biology* 10, 228 - 236 (2008) Published online: 23 December 2007 | doi:10.1038/ncb1685
- Serrano E, Lasa A, Perea G, Carnicer M, Brunet S, Aveniñán A, Sierra J and J Nomdedéu (2006). Acute myeloid leukemia subgroups identified by pathway-restricted gene expression signatures. *Acta Haematologica* 116:77–89. (doi:10.1159/000093636)
- Sharpe RM, McKinnell C, Kivlin C and JS Fisher (2003). Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction*, 125, 769–784.
- Sinenko SA, Mandal L, Martinez-Agosto JA, U Banerjee (2009). Dual role of wingless signaling in stem-like hematopoietic precursor maintenance in *Drosophila*. *Dev Cell* 16:756–763
- Smith D and L Corcoran (2001). Expression and purification of glutathione-S-transferase fusion proteins. In: Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore D, Seidman J, Smith J, Struhl K, Editors. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley and Sons. 16.7.1–16.7.
- St. Pierre SE, Ponting L, Stefancsik R, McQuilton P, FlyBase Consortium (2014) FlyBase 102 -advanced approaches to interrogating FlyBase. *Nucleic Acids Res* 42(D1): D780–D788.
- Steensma DP, Porcher JC, Litzow MR, Hogan WJ, Arora S and ES Van Laar (2009). Assessment of ATRX expression in patients with myelodysplastic syndromes treated with decitabine. *Leuk Res* 2009; 33:81-2
- Sullivan W, Ashburner M and RS Hawley (2000) *Drosophila Protocols*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Tagami H, Ray-Gallet D, Almouzni G and Y Nakatani (2004). Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell* 116, 51–61.
- Tang J, Wu S, Liu H, Stratt R, Barak OG, Shiekhhattar R, Picketts DJ and X Yang (2004). A novel transcription regulatory complex containing death domain-

- associated protein and the ATR-X syndrome protein. *J Biol Chem*; 279:20369-77; PMID:14990586; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M401321200>.
- Tipping M and N Perrimon (2014) *Drosophila* as a model for context-dependent tumorigenesis, *J. Cell. Physiol.* 229 (1): 27–33.
 - Valadez-Graham V, Razin SV and F Recillas-Targa (2004). CTCF-dependent enhancer blockers at the upstream region of the chicken α -globin gene domain. *Nucleic Acids Res* 32: 1354–1362
 - Valadez-Graham V, Yoshioka Y, Velazquez O, Kawamori A, Vázquez M, Neumann A, Yamaguchi M and M Zurita (2012). XNP/dATRX interacts with DREF in the chromatin to regulate gene expression. *Nucleic Acids Research*, 2011: 1–15.
 - Wang W, Yu H and M Long (2004). Duplication-degeneration as a mechanism of gene fission and the origin of new genes in *Drosophila* species. *Nat Genet* 36: 523–527.
 - Wilhelm D, Palmer S and P Koopman. (2007) Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiol. Rev.*, 87, 1–28.
 - Wong LH, McGhie JD, Sim M, Anderson MA, Ahn S, Hannan RD, Amee JG, Morgan KA, Mann JR and K.HA Choo (2010). ATRX interacts with H3.3 in maintaining telomere structural integrity in pluripotent embryonic stem cells. *Genome Res.* 20(3): 351–360. doi:10.1101/gr.101477. 109.
 - Wong LH, Ren H, Williams E, McGhie J, Ahn S, Sim M, Tam A, Earle E, Anderson MA, Mann J and KHA Choo (2009). Histone H3.3 incorporation provides a unique and functionally essential telomeric chromatin in embryonic stem cells. *Genome Res*; 19:404-14; PMID:19196724; <http://dx.doi.org/10.1101/gr.084947.108>.
 - Xue Y, Gibbons R, Yan Z, Yang D, McDowell TL, Sechi S, Qin J, Zhou S, Higgs D and W Wang (2003). The ATRX syndrome protein forms a chromatin-remodeling complex with Daxx and localizes in promyelocytic leukemia nuclear bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 100:10635-40; PMID:12953102; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1937626100>.
 - Zhang R, Poustovoitov MV, Ye X, Santos HA, Chen W, Daganzo SM, Erzberger JP, Serebriiskii IG, Canutescu AA, Dunbrack RL, Pehrson JR, Berger JM, Kaufman PD and PD Adams (2005). Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Dev Cell* 8: 19–30.
 - Zhao Q, Rank G, Tan YT, Li H, Moritz RL, Simpson RJ, Cerruti L, Curtis DJ, Patel DJ, Allis CD, Cunningham JM and SM Jane (2009). PRMT5-mediated methylation of histone H4R3 recruits DNMT3A, coupling histone and DNA methylation in gene silencing. *Nat Struct Mol Biol.* Vol.16(3): 304-311.
 - Zeng L and MM Zhou (2002). «Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain». *FEBS Lett.* 513 (1): 124-8.

ANEXOS

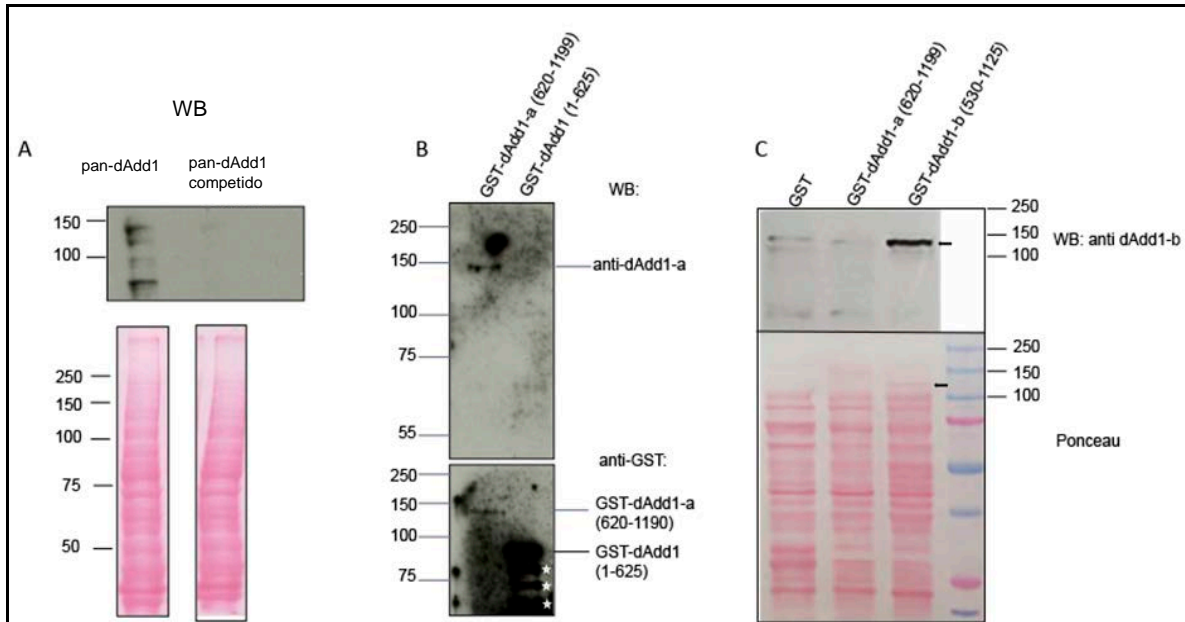


Figura S1. Los anticuerpos contra dAdd1 reconocen específicamente a las proteínas dAdd1. a) Western blot utilizando el anticuerpo pan-dAdd1. La señal de la isoforma dAdd1 (línea 1) observada con el anticuerpo pan-dAdd1 no se observa en la línea 2 (donde se utilizó el pan-dAdd1 competido con GST-dAdd1) (ver material y métodos). Esto demuestra que la proteína de fusión GST-dAdd1, la cual porta el péptido utilizado para elaborar el anticuerpo pan-dAdd1 es capaz de unirse al anticuerpo, esta interacción se utilizó para eliminar la presencia del anticuerpo en este ensayo. La señal dAdd1 no se observa en la línea 2, lo que demuestra que el pan-dAdd1 reconoce específicamente a la isoforma dAdd1. En el panel inferior las membranas utilizadas en el ensayo fueron teñidas con Ponceau lo que permite mostrar que se cargó el extracto de proteína total de células S2R⁺ en las dos membranas de nitrocelulosa. **b) El anticuerpo Anti-dAdd1-a reconoce a la proteína dAdd1-a.** El Western blot se efectuó con el anticuerpo anti-dAdd1-a (panel superior) o con el anticuerpo anti-GST (panel inferior). La señal específica de dAdd1-a se observa únicamente donde las proteínas de fusión GST-dAdd1-a contienen el péptido utilizado para elaborar el anticuerpo (GST-dAdd1 aminoácidos 620-1199) (a la izquierda del panel superior). El anticuerpo no reconoce a la proteína de fusión que carece de este péptido (línea derecha, panel superior). Por otro lado, el anticuerpo GST reconoce las dos proteínas GST-dAdd1 antes mencionadas (panel inferior). Las bandas extras (señaladas con asteriscos (línea derecha, panel inferior) pueden ser resultado de degradación de proteínas de fusión. **c) Ensayo para demostrar la especificidad del anticuerpo anti-dAdd1-b.** En el panel inferior las membranas utilizadas en el ensayo fueron teñidas con Ponceau lo que permite mostrar que se cargó el extracto proteico que contiene las proteínas fusionadas a GST cuya expresión se indujo en *E. coli*. En el panel superior se muestra el Western blot que se realizó utilizando el anticuerpo anti-dAdd1-b. Se observa una señal específica en la línea 3 (señalada con una flecha negra tanto en el blot como en la membrana teñida con Ponceau) que corresponde al fragmento GST-dAdd1-b (aa 530-1125) y no GST o GST-dAdd1-a (aa 620-1199) (línea 1 y 2 respectivamente). Bandas finas en las primeras dos líneas son señales inespecíficas.

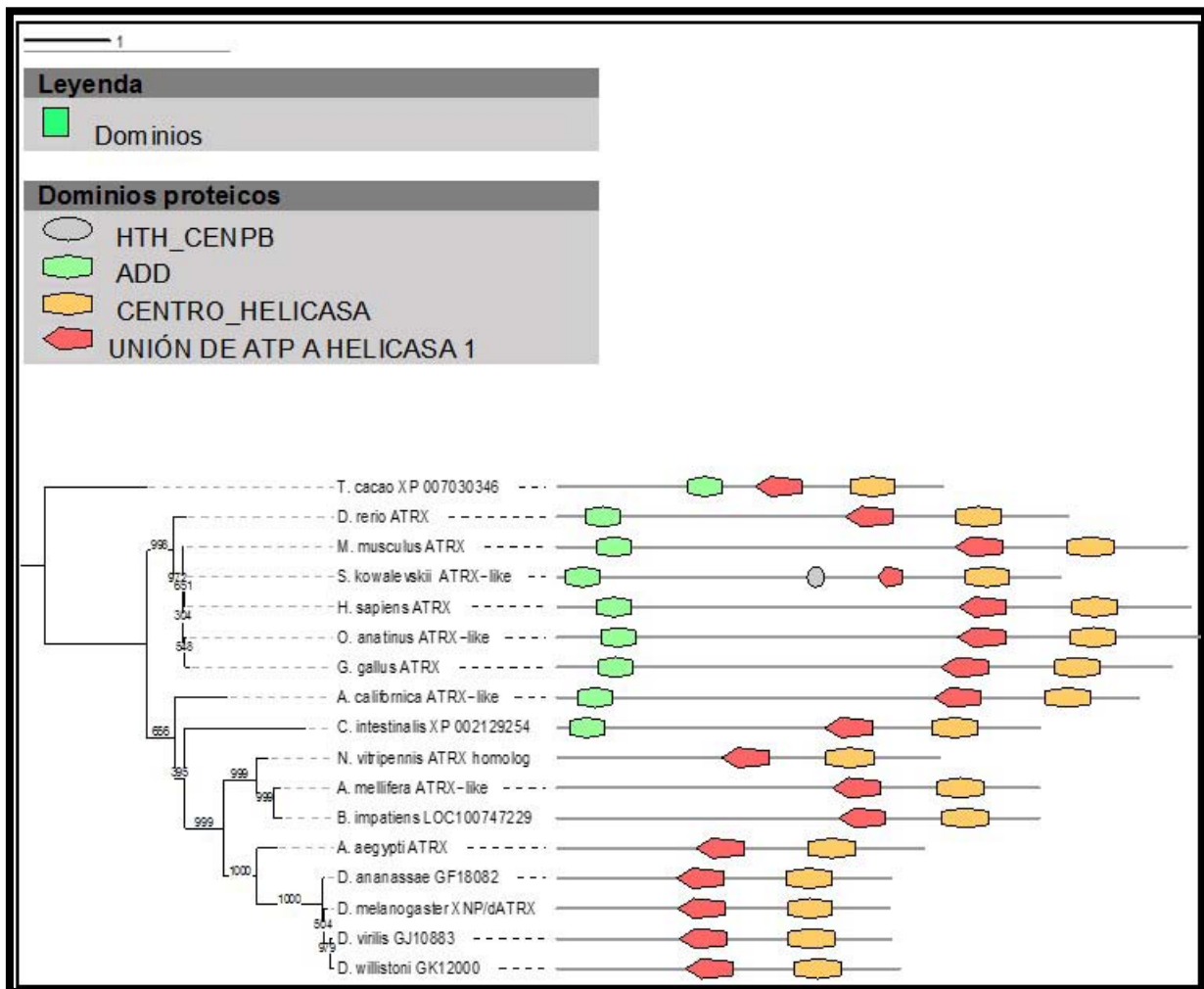


Figura S2. El gen *atrx* sufre un evento de fisión en la clase insecta. La figura muestra el árbol filogenético que resulta del análisis filogenético del dominio helicasa/ATPasa de ATRX. Además a lado derecho del árbol se observa la arquitectura de dominios de cada una de las proteínas utilizadas para el análisis. Los números corresponden a los valores de “bootstrap”. Se puede observar que el ancestro común tanto de plantas como de animales es una proteína que tiene tanto los dominios ADD y helicasa/ATPasa, sin embargo en los insectos estos dominios se encuentran en proteínas diferentes. Por ello, es más probable que se presentara un evento de fisión ocurrido en la clase insecta. Para conocer los parámetros utilizados ver la sección de materiales y métodos.

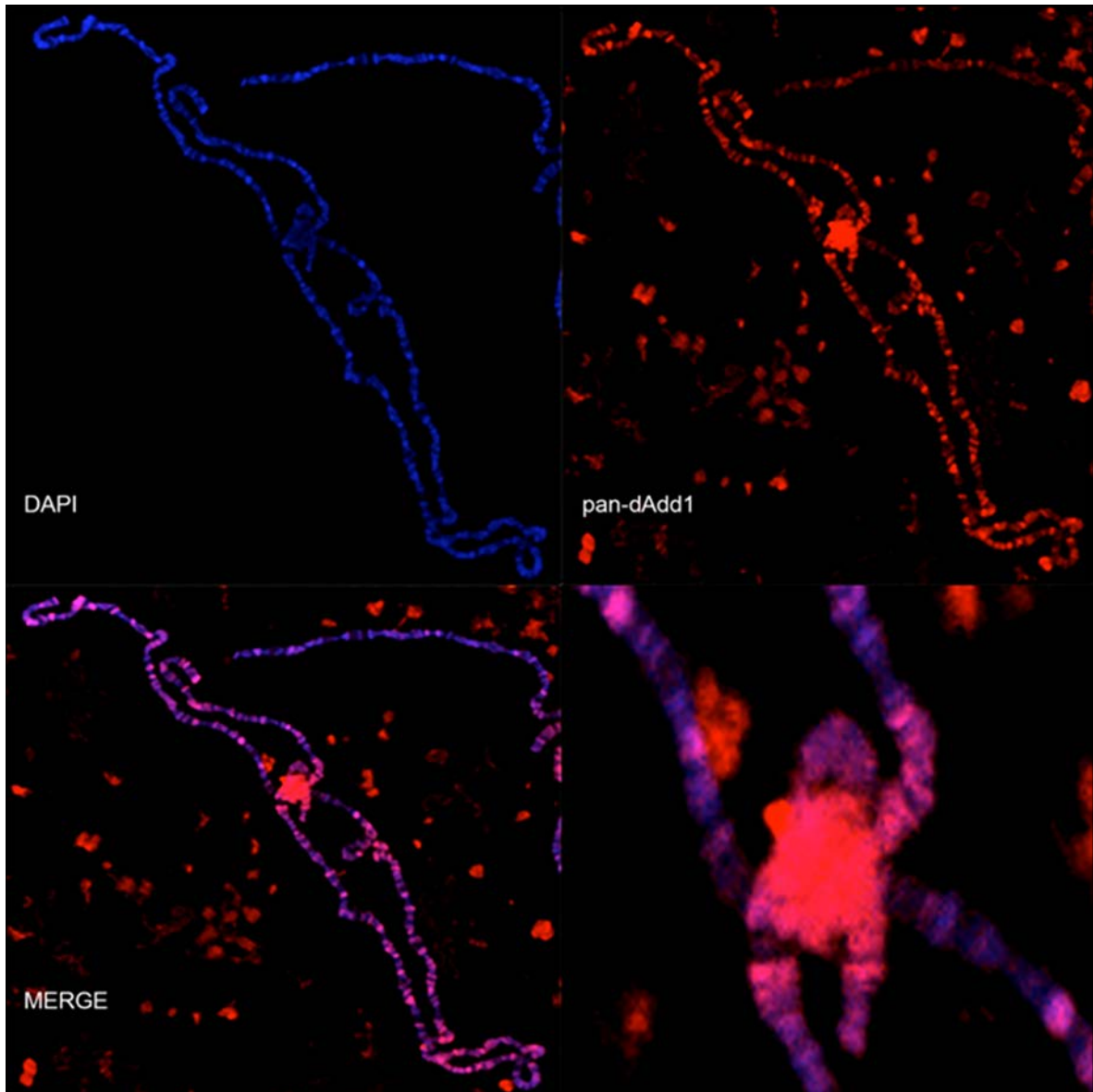


Figura S3. Las proteínas dAdd1 se localizan en muchas regiones de la cromatina en los cromosomas politénicos. La tinción de los cromosomas politénicos silvestres se efectuó con el anticuerpo pan-dAdd1 (rojo). Las proteínas dAdd1 se localizan en las regiones heterocromáticas tales como el cromocentro y el cuarto cromosoma. También se observa la tinción a lo largo de los brazos cromosomales y las regiones eucromáticas.

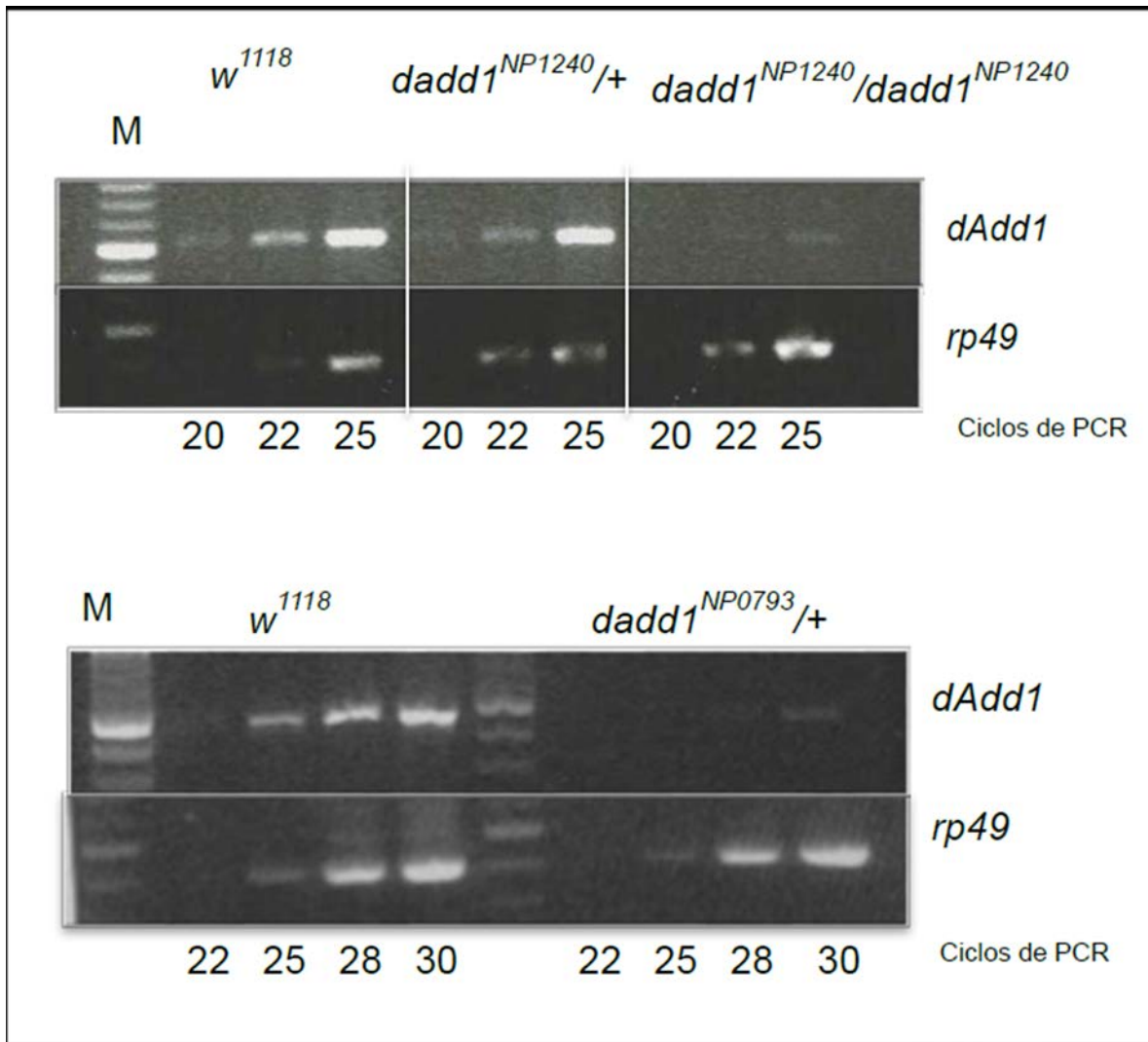


Figura S4. Los alelos *dadd1^{NP1240}* y *dadd1^{NP0793}* son hipomorfos. RT-PCR semicuantitativo de moscas silvestres y mutantes para *dadd1*. El nivel del mRNA de *dadd1* es menor en moscas heterocigas *dadd1^{NP1240}/+* (panel superior y *dadd1^{NP0793}/+* (panel inferior) que con respecto a las moscas silvestres (*w¹¹¹⁸*). El nivel del mRNA de *dadd1* es mucho menor en homocigos *dadd1^{NP1240}/dadd1^{NP1240}* (panel superior) que con respecto a los heterocigos *dadd1^{NP1240}/+*. Los niveles del transcrito *rp49* permanecen sin cambio en los alelos mutantes.

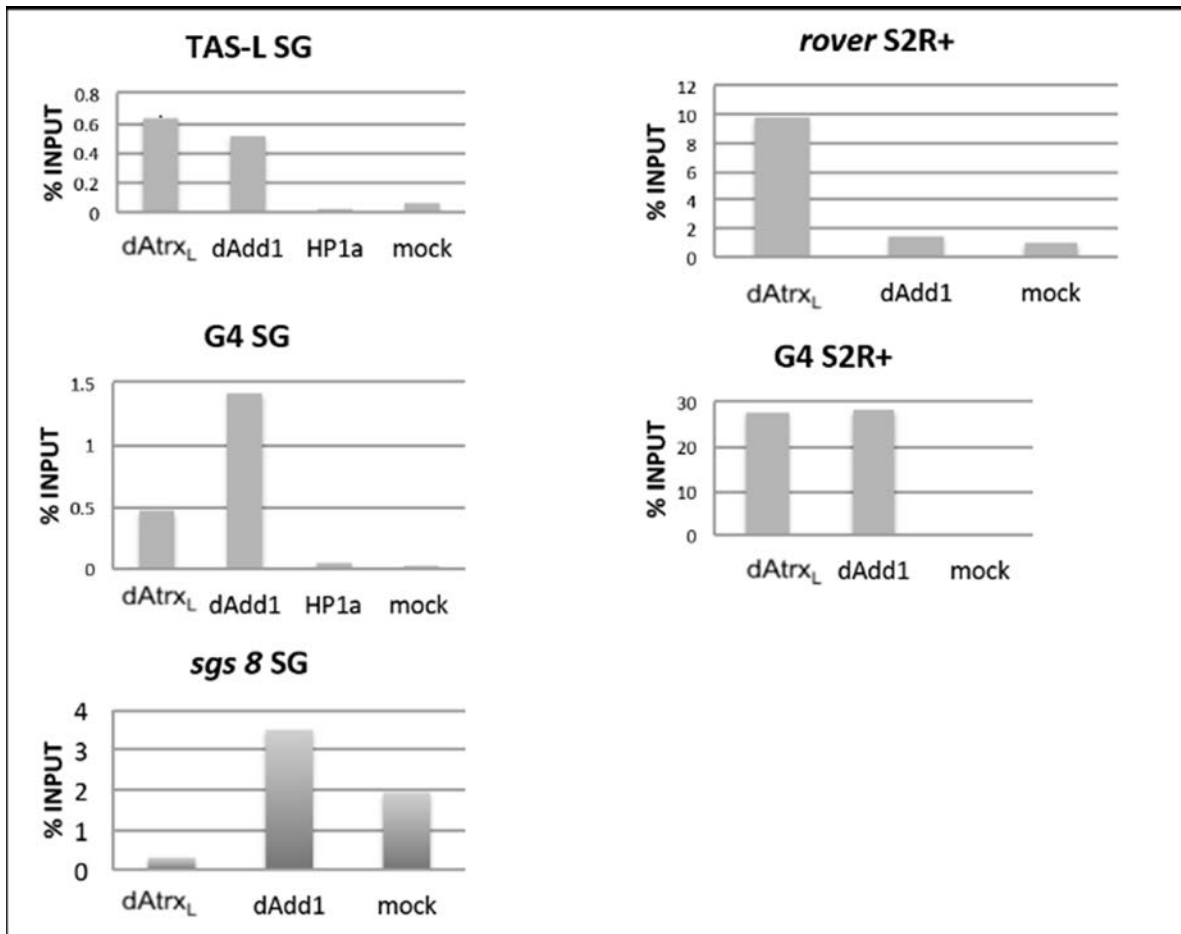


Figura S5. Las proteínas dAdd1 colocalizan *in vivo* con dAtrx_L y HP1a en algunas regiones de la cromatina. Ensayos de ChIP utilizando extractos proteicos totales provenientes de glándulas salivales (SG) preparados a partir de larvas silvestres y células S2R⁺. Las gráficas representan el porcentaje de “input” precipitado utilizando diferentes anticuerpos para las mismas regiones. Es importante hacer notar que en la región de *rover* solamente se encuentra enriquecido dAtrx_L. Se efectuaron tres replicados biológicos independientes.

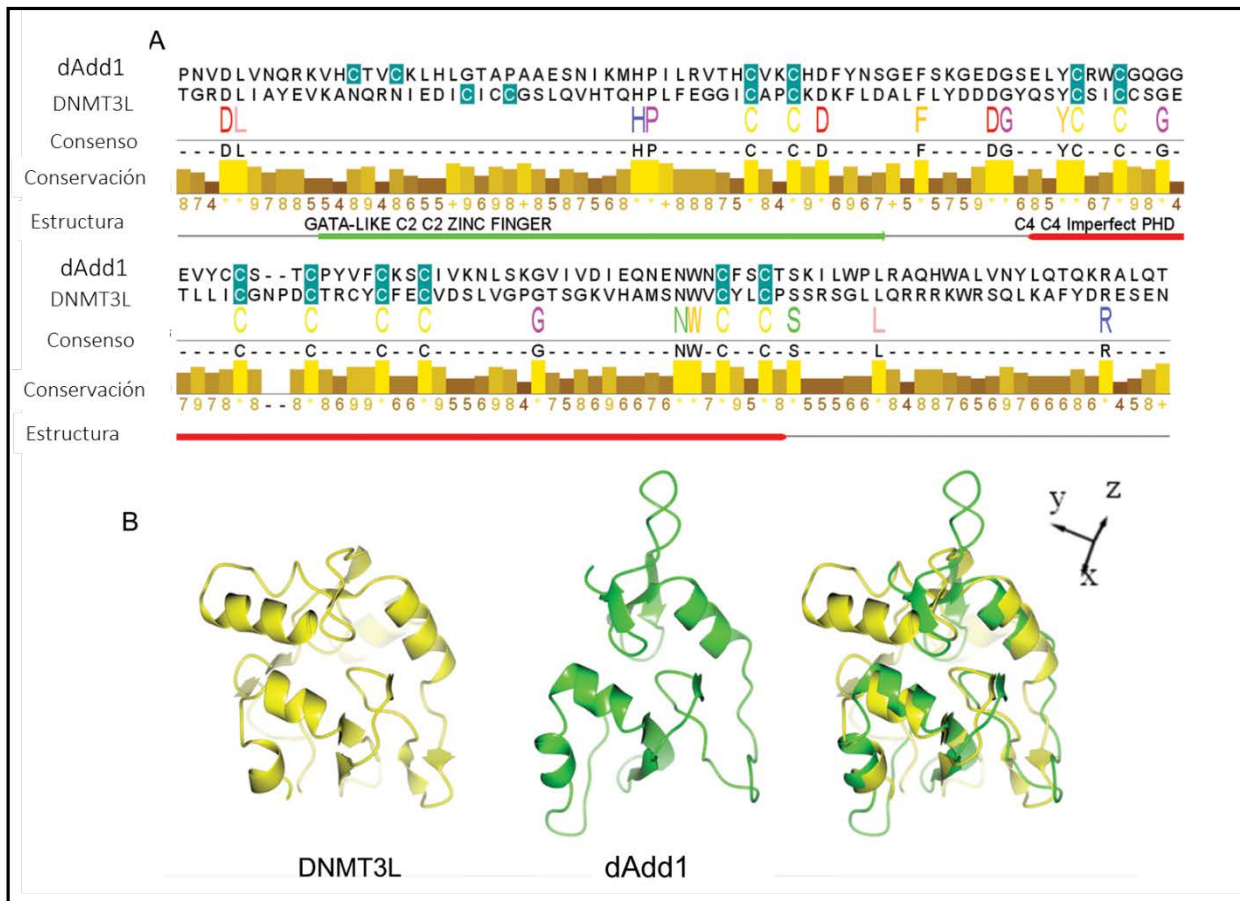


Figure S6. Al comparar la estructura tridimensional del dominio ADD de dAdd1 y DNMT3L se observa que tienen poca semejanza.

- A. Alineamiento de la secuencia peptídica del dominio ADD de dAdd1 y del dominio ADD de DNMT3L. Las cisteínas conservadas se representan con letras amarillas y se encuentran enmarcadas con cajas azules. El dedo de zinc C2-C2 tipo GATA se subraya con una barra verde y el PHD C4 –C4 imperfecto se subraya con barras rojas.
- B. Representación de “Ribbon” del dominio ADD de DNMT3L (en verde) y del dominio ADD de dAdd1 (en Amarillo). En el panel de la derecha se observa el empalme de los dominios ADD de DNMT3L y dAdd1. Por favor observar que existe poca semejanza estructural.

CORRECTION

Correction: Characterization of the *Drosophila* Group Ortholog to the Amino-Terminus of the Alpha-Thalassemia and Mental Retardation X-Linked (ATRX) Vertebrate Protein

Brenda López-Falcón, Silvia Meyer-Nava, Benjamín Hernández-Rodríguez, Adam Campos, Daniel Montero, Enrique Rudiño, Martha Vázquez, Mario Zurita, Viviana Valadez-Graham

The following information is missing from the Funding section: Brenda Araceli López Falcón Piza is a recipient of the scholarship registered under number: 176609 of the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Additionally, the following information is missing from the Acknowledgements section: This article was part of the doctoral thesis of the student Brenda Araceli López Falcón Piza who is a student of the PhD: Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (PDCB) at the Universidad Nacional Autónoma de México. This student receives the scholarship registered under number: 176609 of the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).



Reference

1. López-Falcón B, Meyer-Nava S, Hernández-Rodríguez B, Campos A, Montero D, Rudiño E, et al. (2014) Characterization of the *Drosophila* Group Ortholog to the Amino-Terminus of the Alpha-Thalassemia and Mental Retardation X-Linked (ATRX) Vertebrate Protein. PLoS ONE 9(12): e113182. doi: [10.1371/journal.pone.0113182](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113182) PMID: [25437195](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25437195/)

OPEN ACCESS

Citation: López-Falcón B, Meyer-Nava S, Hernández-Rodríguez B, Campos A, Montero D, Rudiño E, et al. (2016) Correction: Characterization of the *Drosophila* Group Ortholog to the Amino-Terminus of the Alpha-Thalassemia and Mental Retardation X-Linked (ATRX) Vertebrate Protein. PLoS ONE 11(2): e0149367. doi:10.1371/journal.pone.0149367

Published: February 10, 2016

Copyright: © 2016 López-Falcón et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

RESEARCH ARTICLE

Characterization of the *Drosophila* Group Ortholog to the Amino-Terminus of the Alpha-Thalassemia and Mental Retardation X-Linked (ATRX) Vertebrate Protein

Brenda López-Falcón¹*, Silvia Meyer-Nava¹*, Benjamín Hernández-Rodríguez¹, Adam Campos², Daniel Montero¹, Enrique Rudiño², Martha Vázquez¹, Mario Zurita^{1*}, Viviana Valadez-Graham^{1*}

1. Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México, 2. Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México

*vvaladez@ibt.unam.mx (VVG); marioz@ibt.unam.mx (MZ)

These authors contributed equally to this work.



OPEN ACCESS

Citation: López-Falcón B, Meyer-Nava S, Hernández-Rodríguez B, Campos A, Montero D, et al. (2014) Characterization of the *Drosophila* Group Ortholog to the Amino-Terminus of the Alpha-Thalassemia and Mental Retardation X-Linked (ATRX) Vertebrate Protein. PLoS ONE 9(12): e113182. doi:10.1371/journal.pone.0113182

Editor: Barbara Jennings, Oxford Brookes University, United Kingdom

Received: July 17, 2014

Accepted: October 21, 2014

Published: December 1, 2014

Copyright: © 2014 López-Falcón et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability: The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by grant 127440 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología to MZ and grants 177393, Joven Investigador, from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología and IA200613 from Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Universidad Nacional Autónoma de México to VVG. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

The human *ATRX* gene encodes hATRX, a chromatin-remodeling protein harboring an helicase/ATPase and ADD domains. The ADD domain has two zinc fingers that bind to histone tails and mediate hATRX binding to chromatin. dAtrx, the putative *ATRX* homolog in *Drosophila melanogaster*, has a conserved helicase/ATPase domain but lacks the ADD domain. A bioinformatic search of the *Drosophila* genome using the human ADD sequence allowed us to identify the *CG8290* annotated gene, which encodes three ADD harboring- isoforms generated by alternative splicing. This *Drosophila* ADD domain is highly similar in structure and in the amino acids which mediate the histone tail contacts to the ADD domain of hATRX as shown by 3D modeling. Very recently the *CG8290* annotated gene has been named *dadd1*. We show through pull-down and CoIP assays that the products of the *dadd1* gene interact physically with dAtrx_L and HP1a and all of them mainly co-localize in the chromocenter, although euchromatic localization can also be observed through the chromosome arms. We confirm through ChIP analyses that these proteins are present *in vivo* in the same heterochromatic regions. The three isoforms are expressed throughout development. Flies carrying transheterozygous combinations of the *dadd1* and *atrx* alleles are semi-viable and have different phenotypes including the appearance of melanotic masses.

Interestingly, the dAdd1-b and c isoforms have extra domains, such as MADF, which suggest newly acquired functions of these proteins. These results strongly support that, in *Drosophila*, the *atrx* gene diverged and that the *dadd1*-encoded proteins participate with dAtrx in some cellular functions such as heterochromatin maintenance.

Introduction

The human *ATRX* gene (*hATRX*) was described approximately 20 years ago as the main gene mutated in ATRX syndrome (Alpha-Thalassemia with mental Retardation X-related). *ATRX* is localized on the X chromosome in position Xq13.1–q21.1. Individuals with mutations in this gene present several phenotypic characteristics that may include mental retardation, craniofacial and urogenital deformities, psychomotor failure and alpha-thalassemia [1]. Since its description, there have been important advances in the characterization of the molecular functions of the protein encoded by this gene. In humans, there are mainly two isoforms named hATRX (289 kDa) and hATRXt (t, from truncated, 200 kDa) that are encoded by this gene [2]. Both proteins contain an amino-terminal domain which is composed of PHD and GATA-like zinc fingers, named ADD after the three proteins that contain this domain (ATRX, DNMT3b and DNMT3L). It was recently demonstrated through different *in vitro* and *in vivo* approaches that this domain recognizes the combination of K9me3 and unmethylated K4 residues of the histone H3 tail [3]. This domain directs the protein mainly to pericentric heterochromatin [4]. Mutations described in patients afflicted with the syndrome mainly affect the important amino acids that form the "pocket" of the ADD domain for the histone H3 tail recognition. The hATRX protein additionally has a helicase/ATPase domain, which classifies it as a member of the SNF2 subfamily of chromatin remodelers [5]. The hATRX SNF2 domain has *in vitro* ATPase activity, which can be stimulated both by DNA and nucleosomes [6]. About 50% of the mutations described in patients fall in the ADD domain, whereas the other 50% affect the SNF2 helicase/ATPase and other protein domains [7]. hATRX, as many chromatin remodelers, has been identified as a component of a complex that includes the histone variant H3.3 chaperone DAXX (Death domain Associated protein). This particular histone variant is incorporated at different chromatin regions, such as promoters, enhancers and heterochromatic regions, and it has been proposed to have dual functions in promoting both an active chromatin state and the maintenance of heterochromatin [8]. hATRX ATPase activity is important for incorporation of the histone variant H3.3 by the chaperone DAXX into specific regions of the chromosomes, such as telomeres and pericentric heterochromatin [9].

Genome-wide studies have identified hATRX as a protein that is able to bind to DNA regions that can acquire a G4 structure conformation, such as telomeres and

repetitive G-rich regions [9]; however, the important domain that mediates this interaction it is not yet known.

It is clear though that both the ADD and helicase/ATPase domains play crucial roles during development [1]. The *ATRX* gene is highly conserved through eukaryotic evolution, but in invertebrates and particularly in *Drosophila*, it encodes proteins that lack the ADD N-terminal domain, i.e., the dAtr_{x_L} and dAtr_{x_s} isoforms are encoded by the same gene but lack an ADD domain. The dAtr_{x_L} isoform interacts with HP1a and is localized to heterochromatin, whereas the dAtr_{x_s} isoform is localized to euchromatin [10].

We decided to determine if there was a gene in *Drosophila* that could encode proteins with the conserved the amino-terminus of the vertebrate ATRX. Performing *in silico* analyses, we demonstrate that the annotated gene *CG8290*, recently named *dadd1* [11], encodes three proteins with a conserved ADD domain that physically interact with dAtr_{x_L}. Using a genetic approach, we found that these proteins have important functions during *Drosophila* development and that they cooperate with dAtr_{x_L} in certain functions. The evidence leads us to propose that the dAdd1 proteins are orthologs of the amino-terminus of the ATRX protein in vertebrates.

Materials and Methods

Ethics statement

All animal handling was approved by the Instituto de Biotecnología Bioethics Committee, Permit Number 344 (2011/02/10), which follows NOM-062 animal welfare mexican law. All efforts were made to minimize animal suffering. Animals were sacrificed by CO₂ euthanasia.

Protein domain structure illustration

The domain organization of dAdd1 isoforms (Fig. 1C) and the representation of the fragments assayed by pull-down were performed using the DOG 1.0 Illustrator of Protein Domain Structures [12]. For gene representation we used FancyGene [13].

Alignments and phylogenetic inference analyses

Multiple alignments were performed with CLUSTALX2 2.1 [14] and the parameters for the Phylogenetic Inferences were used as estimated by ProtTest 2.4 program [15] for selection of models of protein evolution. The Maximum Likelihood Phylogenetic Analysis was computed by PhyML 3.0 [16] with the parameters: Substitution model: WAG (ADD) & LG (Helicase/ATPase) [17]; Bootstrap: 1000; Proportion of invariable sites: 0.12 (Both); Gamma shape parameter: 2.15 (ADD) & 0.81 (Helicase/ATPase). The tree was edited using Interactive Tree Of Life (iTOL) v2 [18] with Protein Domain Architecture information of the containing proteins as predicted by ScanProsite [19].

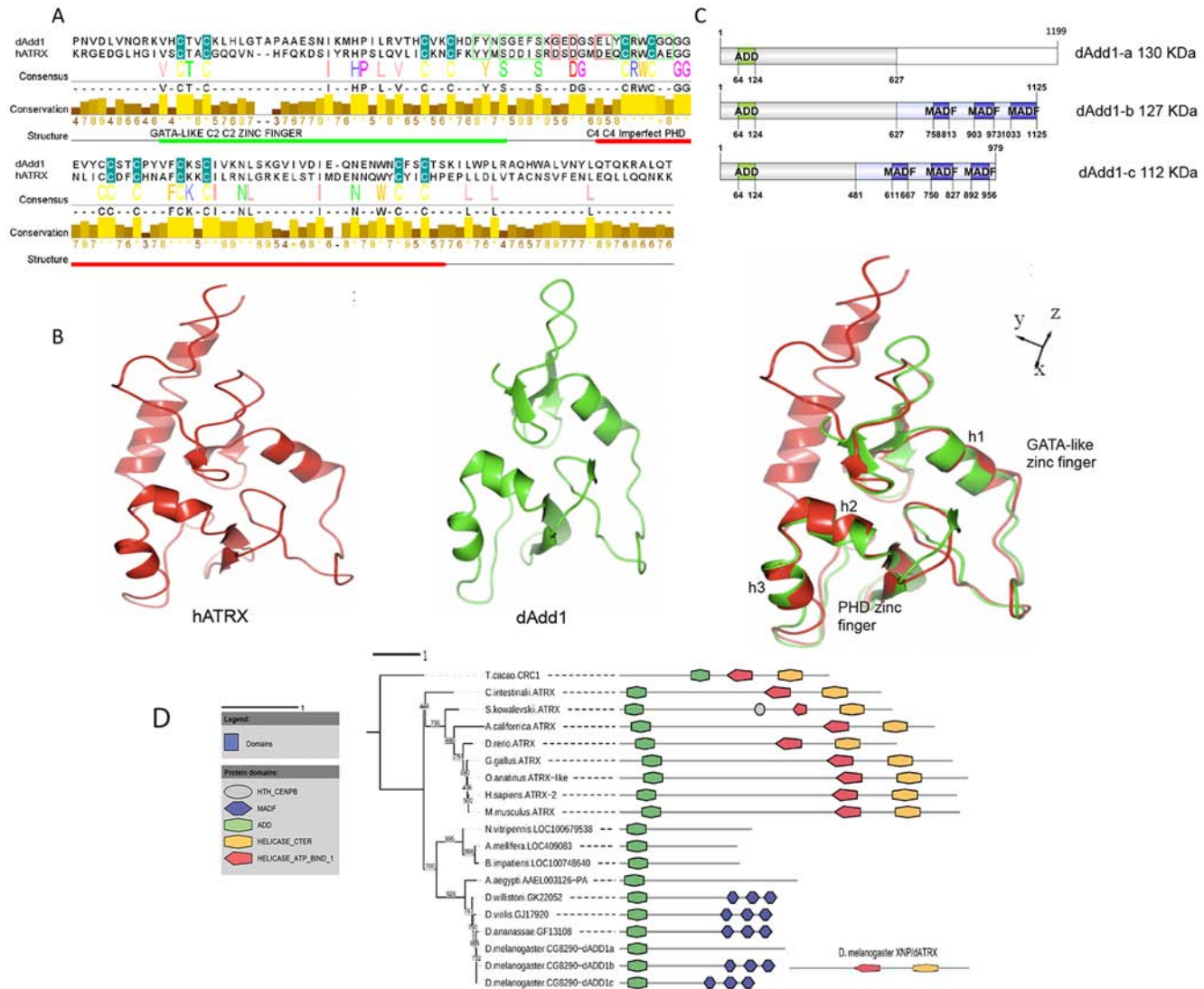


Figure 1. The ADD domain of the hATRAX protein is conserved in the dAdd1 proteins of *Drosophila*. A. ADD domain prediction in the protein sequence alignment of hATRAX and dAdd1 proteins. Conserved cysteines are shown as yellow letters within a cyan box. The amino acids involved in H3K9me3 and H3K4me0 recognition are marked by green and red boxes respectively. The GATA-like C2-C2 zinc finger and the C4-C4 imperfect PHD are marked by green and red boxes respectively. B. Ribbon representation of ADD domain of hATRAX on red (left) and dAdd on green (center) CPH models-3.0 server was used to create the model of the ADD domain of dAdd1. Structural superposition of ADD domains of hATRAX and dAdd1 (right). C. Domain organization of dAdd1 (a-c) isoforms. All of them have an N-terminal ADD domain. A C-terminal MADF domain is present in two (dAdd1-b, and dAdd1-c isoforms) copies. D. Maximum Likelihood Phylogenetic Analysis of the ADD domain and the corresponding Protein Domain Architecture information of the containing proteins as computed by PhyML [16] and ScanProsite [19], respectively. The numbers shown represent bootstrap values. Note that the ADD harboring protein underwent a gene fission event during the evolution of insects. Also note that the homologous proteins within the *Drosophila* genus have acquired a tandem MADF domain during its divergence from other insects. This domain is likely to be functional given its conservation within the genus. For the parameters used, refer to Material and Methods.

doi:10.1371/journal.pone.0113182.g001

Protein structure homology model

In an attempt to determine a protein-modeling of ADD domain (101 amino acid residues), we generated by SWISS-MODEL [20], a three-dimensional structural model of a protein target, based on identity sequence related with structures deposited in the Protein Data Bank. Basically the steps used in homology

modeling are the following: template identification, amino acid sequence alignment, model building and model verification (model quality) [21]. The crystal structure of the transcriptional regulator ATRX from *Homo sapiens* [22] PDB entry 3qla chain A, was used as a template for homology modeling. The identity between these two proteins was 37% and the structural similarity was 0.42. It is important to mention that the procedures implemented in SWISS-MODEL allow the modeling of sequences which share at least 35% identity with a known three dimensional structure. Although the resulting models do not represent the real 3D structure, it is accurate enough to learn about the general topology and a possible residue arrangement of the ADD protein sequence.

Fly stocks

The wild-type flies used in this study were Oregon R (*OreR*) or w^{1118} , and fly stocks were maintained at 25°C with standard food. The stocks that carried the *atr*x alleles were obtained from the Bloomington Stock Center. The stocks that carried *dadd1* and *Su(var)2-5* alleles were obtained from the *Drosophila* Genetic Resource Center (DGRC), Kyoto Institute of Technology. The *xnp/atr*x alleles (called *atr*x for simplicity) were described by Bassett AR, *et al.*, (2008) [10]. The *dadd1* alleles: $dadd1^{NP0793} (w^*;P\{GawB\}^{NP0793}/CyO)$ and $dadd1^{NP1240} (y^*w^*;P\{GawB\}^{NP1240}/CyO, P\{UAS lacZ.UW14\} UW14)$, carry a *P*-element insertion at -225 and -223 bp from the translation initiation codon of the *dadd1* gene, respectively. The *Su(var)2-5²* allele is a missense mutation that has been characterized molecularly by Eissenberg *et al.*, (1992) [23]. This is a single mutation in the open reading frame: a G-A transition in the first nucleotide of codon 26, resulting in the substitution of methionine for valine that affects the chromodomain. The *Su(var)2-5⁵* allele is an X-ray induced mutation, in which only the first 10 amino acids of HP1a are translated [23]. The position effect variegation (PEV) reporter line BL1 is an inversion allele of the *hsp70-lacZ* transgenic reporter, with the reporter gene positioned adjacent to a 3L pericentric heterochromatin mass [24].

Genetic crosses

All stocks were outcrossed with $w^{1118}; Sp/CyO; TM6B, Tb/MKRS$ flies for five generations. Chromosomes with the alleles of interest were followed by segregation with specific balancer chromosomes. To reassure the presence of the *atr*x alleles in these lines, females carrying alleles *atr*x¹, *atr*x² and *atr*x³ chromosomes were outcrossed with males from parental *atr*x¹ allele and viability was assayed and compared to the previously reported viability [10]. The stocks that carried the *atr*x alleles were established and balanced with *TM6B, Tb* for chromosome 3. The stocks that carried the *dadd1* alleles were established and balanced with the *CyO* balancer for chromosome 2 and followed by *white* complementation. Fly crosses were performed according to standard procedures, three biological replicates were performed. At least 100 flies were examined for each genotype.

Antibodies

The dAtrx_L antibody was previously described [25]. All antibodies were generated by New England Peptide (NEP). The pan-dAdd1 antibody was generated using the peptide: QGGEVYCCSTCPYVFCKSC which recognizes dAdd1-a, b and c isoforms. For the dAdd1-a isoform, the CDLIKALGSPSVLP peptide was used and for the dAdd1-b isoform the CDKQFCQQLVLAM peptide was used. Specificity of these antibodies was assayed by their capability to recognize dAdd1-a or dAdd1-b fused to GST (see pull-down section and antibody specificity assays section for details) by western blot (Fig. S1). The HP1a antibody was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank DSHB at the University of Iowa (C1A9). The HA antibody was obtained from Roche (Ref.11867423001). Antibodies used for mock immunoprecipitations were purified IgG from mouse GenScript (Cat. A01007); and purified IgG from rabbit Invitrogen (Cat.02-6102).

Antibody specificity assays

To test the specificity of the pan-dAdd1 antibody, a Western blot was performed with 100 µg of S2R+ protein extracts either using as primary antibody the non-depleted pan-dAdd1 antibody fraction or a supernatant from where the pan-dAdd1 antibodies were depleted (Fig. S1A). Depletion was performed by incubating the pan-dAdd1 antibody in PBS, Tween 0.01%, 5% nonfat milk for 2 hours in the presence of the dAdd1-GST fusion protein blotted onto a nitrocellulose membrane, after the incubation period, supernatant fraction was saved (depleted fraction). The GST-dAdd1 fusion protein harbors the dAdd1 QGGEVYCCSTCPYVFCKSC peptide (aa 122-137) that was used to raise the pan-dAdd1 antibody.

To test the specificity of the dAdd1-a and dAdd1-b antibodies, GST-dAdd1-a or b fusion proteins were expressed in bacteria, blotted onto a nitrocellulose membrane and incubated with either anti-dAdd1-a (Fig. S1B) or anti-dAdd1-b (Fig. S1C) showing that the different antibodies recognize their specific substrate. Detection was performed with the PIERCE quimioluminescence substrate.

Immunostaining of polytene chromosomes

Polytene chromosomes for immunostaining were obtained from wild type *OreR* or *w¹¹¹⁸* lines or from *Xnp^{Scer\UAS.T:Ivir\HA1}/Sgs3-GAL4 (w¹¹¹⁸; P{w^{+mC=Sgs3-GAL4.PD}}TP1)* larvae. The *Xnp^{Scer\UAS.T:Ivir\HA1}* allele is described in [10], and the *Sgs3-GAL4 (w¹¹¹⁸; P{w^{+mC=Sgs3-GAL4.PD}}TP1)* driver line was used to direct Xnp/dAtrx (called dAtrx for simplicity throughout this manuscript) expression to salivary glands from third instar larvae. Both latter lines were obtained from the Bloomington *Drosophila* Stock Center.

Immunostaining of polytene chromosomes was performed with slight modifications of the protocol described in [25]. Salivary glands from third instar larvae were fixed in solution I (PBS, 3.7% paraformaldehyde and 1% Triton X-100) and then in solution II (3.7% paraformaldehyde, 50% acetic acid). The chromosomes were spread on poly-L-Lysine coated microscope slides. Anti-HP1a

(DSHB) antibody was used at 1:300, anti-dAtrx_L antibody at 1:100, pan-dAdd1 at 1:50 and anti-HA (Roche) at 1:50. Secondary antibodies were Alexa fluor 488 used at 1:500 and Alexa fluor 568 or 594 used at 1:100 (Invitrogen). Images were taken on a confocal laser-scanning microscope (Olympus FV1000) at the Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (LNMA, UNAM).

For the double dAdd1/dAtrx immunostaining we followed an epitope tagged version of dAtrx_L (dAtrx_L-HA) because the dAdd1 and dAtrx_L antibodies were raised in the same species and could not be used together for this experiment.

Pull-down assays

We generated fusion proteins of several fragments of dAtrx_L and the dAdd1 proteins. All the clones used in this work were nucleotide-sequenced. The *Drosophila* LD28477, LD24316 and LD37351 cDNA (BDGP Gold collection of *Drosophila* Genomics Resource Center) were amplified by PCR and cloned in the *EcoRI*, *NotI*, *SmaI*, *XhoI* or *SalI* sites of the pGEX-4T1 or pGBKT7 vector (details are available upon request). The dAtrx_L and dAdd1 fragments were expressed as GST fusion proteins in a bacterial system. For interaction assays, over-expression of dAtrx_L fragments fused to GST in bacteria was induced with 0.4 mM IPTG during 3 h. GST-dAtrx_L fragments were purified using glutathione-sepharose (Amersham) according to manufacturer's instructions. The dAdd1 fragments were expressed and labelled with S³⁵ using an *in vitro* transcription/translation system (TNT-Quick-Coupled Transcription/Translation System from Promega). Pull-down assays were performed according to the manufacturer's instructions.

Cell culture transfection and co-immunoprecipitation

The dAdd1-a cDNA was cloned into *EcoRI/NotI* sites of pAc5.1/V5-HisA vector (Invitrogen). *Drosophila* S2R+ cells were maintained in Schneider medium with 10% fetal bovine serum and 100 μg streptomycin/0.25 μg amphotericin. Cells were cotransfected with 10 μg of each construction by the calcium method (Invitrogen). Forty-eight hours after transfection, the cells were collected and lysed. Lysates were clarified by centrifugation at 15.7 g at 4°C. CoIPs were performed as indicated in [26]. For embryo-stage immunoprecipitations: embryo nuclear extracts were prepared as described [27]. The Co-IP was performed as described in [28]. Antibodies used for mock immunoprecipitations were purified IgG from mouse GenScript (Cat. A01007); and purified IgG from rabbit Invitrogen (Cat.02-6102).

RT-PCR assays

RNA was obtained using the Trizol reagent (Invitrogen®) from embryos (0–3 and 3–21 hour post-fertilization), 1st, 2nd and 3rd instar larvae (L1, L2 and L3), pupae (P), pharate (Ph) and female and male adults Oregon R flies (F and M). 10 μg of total RNA was converted to cDNA using reverse transcriptase enzyme (Invitrogen) and oligo-dT and random primers (Stratagene®). To assess the

presence of the transcripts the following oligonucleotides were used for the PCR reaction: dAdd1-a forward (5'CATCTTACGGGCAAAGTGGT-3'); dAdd1-a reverse (5'CAGGCTGGCCAATATCGTGG-3'); dAdd1-b forward (5'GCTTGT-CATCGGGCATATCT-3'); dAdd1-b reverse (5'GCTCATAAGCAGCCAGCAG-T-3'); dAdd1-c forward (5'ACAGCGGCAGCAACGGAAGC-3'); dAdd1-c reverse (5'GCGGAAGTCCTTGACGCGGT-3'); rp49 forward (5'TCAAGATGACCATC-CGCCA-3'); rp49 reverse (5'GTTCTCTTGAGAACGCAGGC-3'). rp49 was used as an RT-PCR control.

Chromatin Immunoprecipitation

S2R+ cells or third instar larvae salivary glands from wild type organisms were fixed in 1% formaldehyde. The fixation reaction was stopped by adding glycine (125 mM). Cells or salivary glands were washed and resuspended in lysis buffer, and sonication was performed until the size of chromatin reached between 200 and 800 bp. Pre-clearing, antibody incubations, immunoprecipitation and phenol:chloroform extractions were performed as described in [25]. For the 'mock' condition, a pre-immune sera against dAtrx or an anti-GFP antibody was used. The following oligonucleotides were used: rover forward (5'-CAACCAAG-ACCAACCTACCC-3'); rover reverse (5'-GCTCATTTTAGTCTGTCCGC-3') [29]; for TAS-L, TAS3L_ChIP1 (5'-TGACTGCCTCTCATTCTGTC-3') and TAS3L_ChIP2 (5'-TATCATCTCGTTCATCCGCC-3') [30]. qPCRs were performed using the light cycler DNA master SYBR green 1 run in a Lyght cycler 1.5 (ROCHE), and the quantification of %INPUT was performed as in [31].

β -galactosidase quantitative assay

Detection of β -galactosidase in adult flies was performed as in Gu and Elgin (2013) [32]. For quantitative β -galactosidase assays, flies were homogenized in 300 μ l of assay buffer (50 mM potassium phosphate, 1 mM MgCl₂, pH 7.5), followed by spinning to pellet the debris. An aliquot of 50 μ g of protein extract was transferred to CPRG solution (1 mM chlorophenol red b-D-galactopyranoside in assay buffer) and the O.D. at 574 nm was measured at intervals over a 2-hour period. The β -galactosidase activity was calculated as a function of the change in O.D.

Results

The ADD domain of Atrx is highly conserved in *Drosophila* and other invertebrates

We searched for genes encoding proteins with the ADD domain in the *Drosophila* genome using the ADD region (aa 169-268) of the hATRX protein with the BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) of the NCBI (National Center of Biotechnology Information). Using this approach, we identified the CG8290 annotated gene, which putatively encodes three annotated proteins that have a

conserved amino-terminal ADD domain that is 52% homologous and 36% identical to the hATRX ADD domain (Fig. 1A, B). Protein alignment (Fig. 1A) showed that there is a high conservation at the position of the cysteins that coordinate de zinc atoms in the GATA-like and PHD zinc fingers. This conservation is not as high when we align DNMT3L, a methyltransferase that also has an ADD domain (data not shown). The ADD domain in the *Drosophila* CG8290 encoded proteins is more similar to the one in hATRX than in DNMT3L (data not shown). While this work was in preparation for publication Alekseyenko *et al.*, (2014) named the CG8290 gene *dadd1* [11].

In the hATRX protein, there are some amino acids in a "hydrophobic pocket" that mediate the interaction between the H3K9me3 and unmethylated H3K4 (H3K4me0) histone tail combination. In general, it is noteworthy that the whole "hydrophobic pocket" binding site is conserved between the ADD in *Drosophila* and in hATRX (aa 110-126 in dAdd1) [33]. There are also many conserved amino acids that are not part of the "hydrophobic pocket", such as the histidine 189 and proline 190 of hATRX (which correspond to aa 96 and 97 in dAdd1) that are mutated in ATRX syndrome [22]. We constructed a three-dimensional model of the ADD domain found in the dAdd1 proteins (aa 64 to 164) and compared it to the hATRX ADD domain (Fig. 1B). The human and *Drosophila* domains mainly overlap in the GATA-like and PHD zinc fingers helices 1, 2 and 3 (h1, h2 and h3, respectively), and the pocket that is important for recognition of H3K9me3 and H3K4me0 is also conserved (Fig. 1C). In the recently published work by Alekseyenko *et al.*, (2014), the capability of this domain to bind to the H3K9me3 tail was assayed, confirming it preferentially binds to this histone modification [11].

We also compared the native structure of the ADD domain of dAdd1 to the ADD domain of DNMT3L (data not shown) and found less overlapping when we superimpose the structures. This led us to propose that during ATRX evolution, the protein may have undergone a fission event. To obtain insight into the evolutionary history of ATRX, we decided to perform a rooted phylogenetic inference analysis using homologous sequences of the ADD and the helicase/ATPase domains from ATRX of higher eukaryotes. We found that the shared common ancestor of higher eukaryotes possessed a protein with both the ADD and helicase/ATPase domains, but in insects, it underwent a fission event by which the two domains were separated, generating two different genes (Fig. 1D, Fig. S2) (perhaps involving gene duplication with subsequent partial degeneration, as has been proposed for *cmi* and *TRR* proteins or the *monkey king* (*mkg*) gene family in *Drosophila*) [34, 35].

Another interesting feature is that, in *Drosophila*, ADD harboring-proteins acquired other domains such as MADF (myb/Sant-like domain in Adf1, shown in blue hexagons), suggesting novel functions for these proteins (Fig. 1D). MADF domains can recognize repetitive sequences on DNA, for instance in Adf1 and Dip3 the MADF domain directs the binding of these transcription factors to specific promoter sequences [36]. All these data led us to propose that the proteins

encoded by *dadd1* could represent the orthologs of the amino terminal half of the hATRX protein.

The dAdd1 proteins are expressed throughout development and are preferentially nuclear proteins that can bind to different chromatin regions

Through RT-PCR analyses of cDNAs obtained from different developmental stages (see Material and Methods and Fig. 2A), we found three transcripts *dAdd1-a*, *dAdd1-b* and *dAdd1-c* (Fig. 2A, and B top panel). The transcripts (*dAdd1-a*, *dAdd1-b*, *dAdd1-c*) corresponded to the ones derived from alternatively spliced transcripts of *CG8290* described in FlyBase [37]. All of these transcripts are deposited maternally into the embryo and are later expressed through all stages of development (Fig. 2B, 0-3 lanes).

Interestingly when we amplify the *dAdd1-b* transcript, another higher molecular weight band appears (Fig. 2B top panel). We sequenced this fragment and it

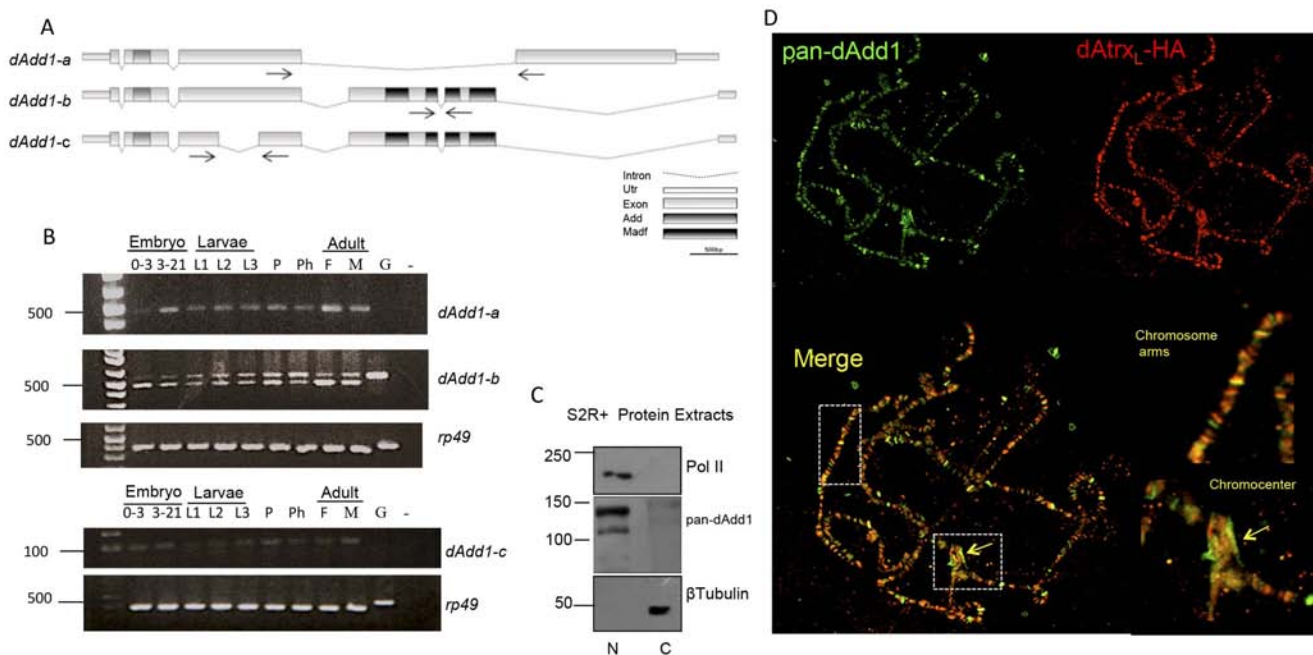


Figure 2. The dAdd1 proteins are expressed throughout development. A. Scheme of the *dadd1* mRNAs generated by alternative splicing. The nucleotide sequence of the ADD and MADF domains are represented as gray boxes. Primers used to amplify cDNAs representing mRNAs encoding Add isoforms are indicated by horizontal arrows. B. The *dadd1* transcripts were detected throughout all *Drosophila* stages of development by RT-PCR. Detection of exons from different *dadd1* mRNAs in cDNA generated from total RNA isolated from embryos (0–3 and 3–21 hour), 1st, 2nd and 3rd instar larvae (L1, L2 and L3), pupae (P), pharate (Ph) and female and male adults (F and M). *rp49* was used as a RT-PCR control. Sequence of the specific primers used to detect and sequence exons from each different *dadd1* mRNA are described in Material and Methods section. Molecular weight markers on the left of the panels represent base pairs. C. The dAdd1 (a-c) protein isoforms are mainly nuclear. Detection of dAdd1 (a-c) proteins by Western blotting using the pan-dAdd1 antibody in nuclear (N) and cytoplasmic (C) soluble fractions isolated from S2R⁺ cells. The largest RNA polymerase II subunit and β -tubulin were used as controls of nuclear and cytoplasmic fractions, respectively. Molecular weight markers on the left of the panels represent kDa. D. dAdd1 proteins colocalize with dAtrx protein in polytene chromosomes of third instar larvae. dAtrx_L-HA and dAdd1 were followed with an anti-HA (red, right upper panel) and the pan-Add1 (green, left upper panel) antibodies respectively. The dAdd1 and dAtrx_L-HA proteins colocalize in some bands and interbands (left lower panel). They also co-localize in heterochromatic regions such as the chromocenter (see Insets, lower panel right). Note that not all the bands co-localize.

doi:10.1371/journal.pone.0113182.g002

corresponds to a transcript that retains the fifth intron. The presence of this putative transcript varies throughout development being more abundant in larval stages. Bioinformatic analyses indicate that retention of the fifth intron in this transcript would generate a stop codon which will in turn translate into a protein that conserves only one MADF domain. Further analyses are being carried out to assess the presence of this putative protein.

We found that there are three proteins derived from these transcripts that have similar predicted molecular weights ranging from 112 kDa to 130 kDa (Fig. 1C). Interestingly, the dAdd1-b and dAdd1-c proteins have several MADF domains in their carboxy-termini. We designed an antibody that recognizes the three dAdd1 isoforms (called pan-dAdd1, see Materials and Methods), and we tested the antibody's specificity through Western blot and depletion with a GST-dAdd1 fusion protein (Fig. S1A and Materials and Methods section). In the immunoblots we observe two main bands (112 and 130 kDa). Based on the predicted molecular weight of the proteins, the signals of these high-molecular weight bands probably represent the three proteins but cannot be resolved by standard SDS-PAGE electrophoresis.

We found that the dAdd1 proteins are enriched in the nuclear fraction of S2R⁺ cells (Fig. 2C). Because the proteins are nuclear and have putative chromatin and DNA binding domains, we analyzed their location on chromatin. We made polytene chromosomes preparations from third instar larvae, and using immunostaining with the pan-dAdd1 antibody, we found that the dAdd1 proteins are located in several bands and interbands in the polytene arms (Fig. S3). The signal is also present in heterochromatic regions such as the chromocenter and on the fourth chromosome, and it co-localizes with the dAtrx signal in this region and in other heterochromatic regions (Fig. 2D and Fig. S3).

To determine whether dAdd1 colocalizes with dAtrx, we expressed an epitope tagged-dAtrx_L (dAtrx_L-HA) [10] in larval salivary glands. This tagged dAtrx_L-HA version localizes to the same sites as wild type dAtrx_L [25] and does not alter dAdd1 distribution (compare Fig. 2D and Fig. S3). We found that dAdd1 colocalizes with dAtrx_L-HA in the chromocenter and in other heterochromatic regions (Fig. 2D insets).

These results opened the possibility that dAdd1 proteins with an ADD domain could interact with the ADD-less *Drosophila* dAtrx and cooperate in some cellular functions in the organism.

The dAdd1 proteins interact directly with the dAtrx_L protein

To test the proposed interaction hypothesis, we performed co-immunoprecipitation experiments using different antibodies generated against the dAdd1 proteins and dAtrx_L (see Materials and Methods). As a first approach we coimmunoprecipitated dAdd1 with the pan-dAdd1 antibody and tested whether we could detect dAtrx_L. In addition to detecting dAdd1 (Fig. 3A, top panel, pan-dAdd1 blot) we found dAtrx_L in the immunoprecipitate (Fig. 3A top panel, dAtrx_L blot, IP lane), the specific bands obtained in the IP are marked with a

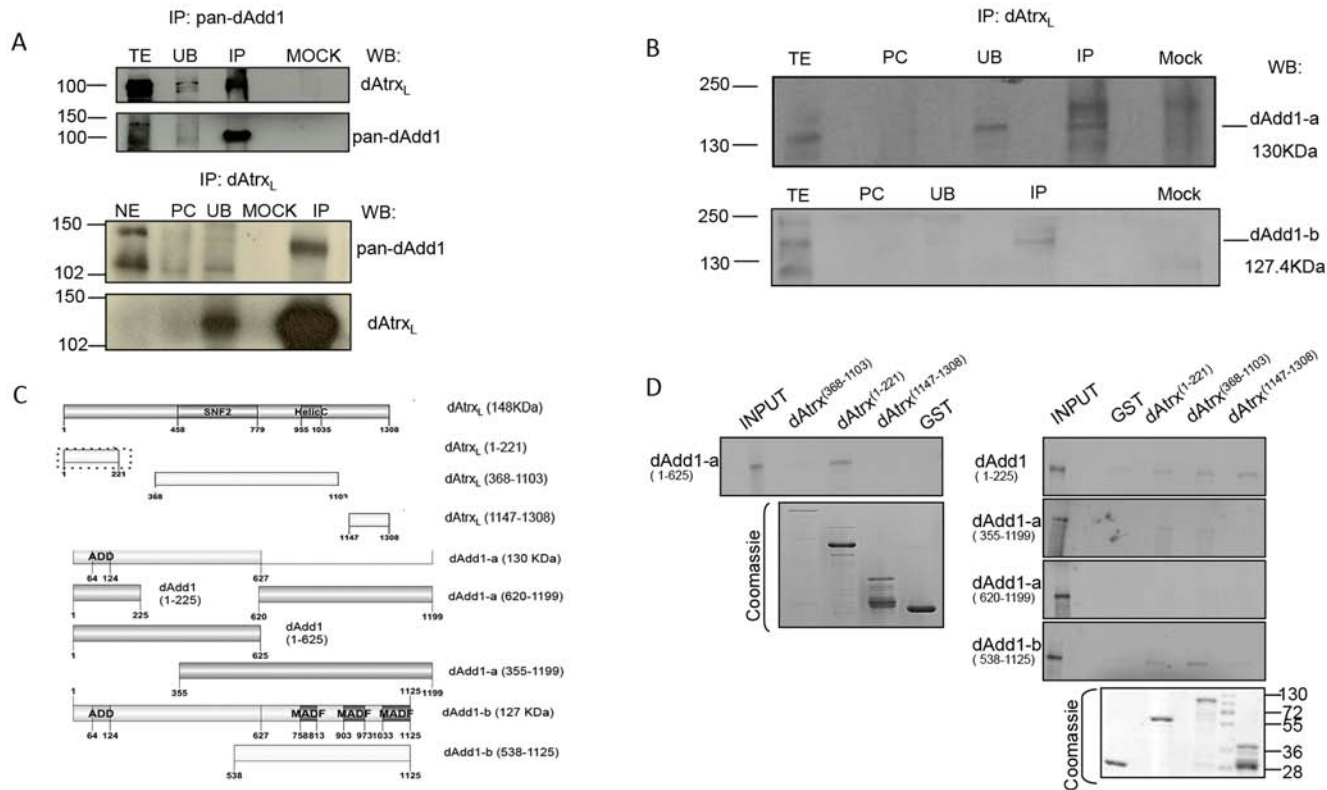


Figure 3. The dAtrx and dAdd1 proteins physically interact. A. Co-immunoprecipitation (CoIP) assays of dAdd1 and dAtrx_L. IP performed with pan-dAdd1 antibody (top panels) and the reciprocal CoIP assay with anti-dAtrx_L antibody (bottom panels). Embryo nuclear extract (NE); S2R⁺ cells total extract (TE); pre-clearing (PC); unbound protein fraction (UB); Mock is the IP performed with an unrelated antibody. The presence of dAdd1 and dAtrx_L in the precipitated proteins was determined by Western blotting using the specific antibody. 10% of the nuclear extract (corresponding to approximately 50 μg of protein) used for the IP was loaded as the INPUT fraction. 20% of the total extract (corresponding to 150 μg of protein) was loaded as the INPUT fraction. Molecular weight markers on the left of the panels represent kDa. B. CoIP assay of dAdd1-a and dAdd1-b with dAtrx_L. S2R⁺ cells total extract (TE); pre-clearing (PC); unbound protein fraction (UB); IP was performed with anti-dAtrx_L. Mock is the IP performed with an unrelated antibody. The presence of dAdd1-a and dAdd1-b in the precipitated proteins was determined using the specific antibody. 20% of the total extract (corresponding to 150 μg of protein) was loaded as the INPUT fraction. The 250 kDa band observed in the INPUT lane is an unspecific band. Molecular weight markers on the left of the panels represent kDa. C. Representation of the fragments assayed by Pull-down. The important fragments for the interaction between dAtrx and dAdd are shown in dashed boxes. D. Pull-down assay. The first lane of all panels (except the coomassie panels) shows the 10% of the total amount of transcription/translation labeled protein (dAdd1 fragments) used for each experiment (input). The rest of the lanes are the experimental interaction (GST-dAtrx fragments and dAdd1 fragments) and the control interaction (GST and dAdd fragments) for each analyzed polypeptide. Coomassie staining of the loaded GST-fused proteins is shown in the bottom panels.

doi:10.1371/journal.pone.0113182.g003

white arrow. We also performed the reciprocal immunoprecipitation with the dAtrx_L antibody, and we show that at least one of the dAdd1 proteins, approximately 130 kDa, co-immunoprecipitates with dAtrx_L (Fig. 3A bottom panel, IP lane) the specific band is marked with a black arrow. The signal in both cases is specific because it cannot be detected when we used an irrelevant antibody to perform the immunoprecipitation assay (mock lane in all the blots).

To further characterize which of the dAdd1 proteins are in the observed immunoprecipitated band, we performed a coimmunoprecipitation assay using S2R⁺ total extracts with antibodies generated against dAdd1-a or dAdd1-b. We found that both, dAdd1-a and dAdd1-b coimmunoprecipitate with dAtrx_L (Fig. 3B, top and bottom panels), the white arrows indicate the specific bands corresponding

to the co-immunoprecipitated proteins. In the dAdd1-a blot (Fig. 3B, top panel) there is a high molecular weight band, near the 250 kDa weight marker, this band is unspecific because it also appears in the immunoprecipitation performed with a purified rabbit IgG antibody (Fig. 3B, mock lane). The fact that both proteins, dAdd1-a and dAdd1-b, can immunoprecipitate with dAtrx_L indicates that the interaction domain is most likely conserved in both proteins or that a third protein is mediating the interaction.

To map the dAdd1 protein domain(s) important for the interaction with dAtrx_L, we performed a series of pull-down assays. We generated several fragments of dAtrx_L and dAdd1 proteins and expressed them as GST-fusion proteins in a bacterial system or expressed and labeled them with S³⁵ using an *in vitro* transcription/translation system (see Materials and Methods, Fig. 3C). We tested four different fragments of the dAdd1-a protein. Two of these fragments are present in the three isoforms (dAdd1 1-225, dAdd1 1-625). When we assayed the dAdd1 1-225 fragment with three different dAtrx_L fragments, we observed that it binds to all of the tested fragments of dAtrx_L, but this fragment also binds to the negative control GST, although with less affinity (Fig. 3D top panel on the right). In contrast, the larger fragment that contains aminoacids 226-625 (fragment dAdd1 1-625) binds specifically to the amino-terminal fragment of dAtrx_L (dAtrx 1-221) (Fig. 3D top left panel).

We also tested the dAdd1-a (355-1199) and dAdd1-a (620-1199) fragments. The first fragment, which contains amino acids 355-625 binds to two dAtrx_L fragments (1-221 and 368-1103), corresponding to the amino-terminal and SNF2 fragments, whereas the second dAdd1-a fragment (620-1199), which lacks amino acids 355-625, fails to interact with any of the tested dAtrx_L fragments (compare second and third panels from top to bottom on the right of Fig. 3D).

In these analyses, we also found that a fragment that includes the MADF domains (dAdd1-b 538-1125) interacts with the amino terminal and SNF2-containing fragments of the dAtrx_L protein (Fig. 3D from top to bottom: fourth panel on the right) but this fragment also binds to the negative control GST.

From these data, we conclude that the dAdd1 domain that interacts with dAtrx_L is conserved in all dAdd1 isoforms. Thus, all dAdd1 isoforms can directly interact with the amino-terminal domain of dAtrx_L (a.a. 1-221) through their amino-terminal domain (a.a. 1-625). Interestingly, this dAtrx_L fragment is only conserved in the long isoform, and it does not overlap with the HP1a interaction domain [22]. In contrast, it does overlap with the DREF interaction domain, which was reported by our group [25]. Based on these results, we conclude all dAdd1 isoforms can interact directly with the dAtrx_L protein.

atrx and *dadd1* interact genetically

At this point we have demonstrated that dAdd1 and dAtrx physically interact; and therefore, we wanted to know whether they genetically interact in the fly. For this purpose, we made transheterozygous *atrx* and *dadd1* flies. For these analyses, we used three *atrx* alleles [20]. *atrx*¹ is a deficiency that uncovers dAtrx as well as

three more adjacent genes; *atr^{x2}* is an hypomorphic allele that affects both the long and short dAtx isoforms and *atr^{x3}* is an hypomorphic allele that affects only the long isoform. The survival of heteroallelic *atr^x* flies is affected, as previously reported, and they do not present any other obvious phenotype (Table 1, [10]).

We also used two *P*-element insertion lines, *dadd1^{NP1240}* and *dadd1^{NP0793}*. These insertions lie at 83 or 81 bp, respectively, from the *dadd1* transcriptional start site (Fig. 4A). To determine whether the insertions affected the levels of the dAdd1 proteins, we extracted total proteins from adult flies of the different genotypes and analyzed the presence of the dAdd1 proteins through Western blotting using the pan-dAdd1 antibody (Fig. 4B). We found that the levels of the dAdd1 proteins are diminished in homozygous *dadd1^{NP1240}/dadd1^{NP1240}* individuals, with respect to the heterozygous *dadd1^{NP1240}/+* or *+/+* flies (Fig. 4B). We also analyzed the *dadd1* mRNA levels of *dadd1^{NP1240}/+* or *dadd1^{NP0793}/+* individuals through semi-quantitative RT-PCR and found that the *dadd1* mRNA levels are diminished in the mutant individuals compared to the *dadd1* wild type flies (Fig. S4). These results indicate that these alleles are hypomorphic. Similar results were obtained with the *dadd1^{NP1240}/dadd1^{NP0793}* heteroallelic flies (data not shown) and thus we used for the rest of our tests the *dadd1^{NP1240}* allele. 44% and 90% of the *dadd1^{NP1240}/dadd1^{NP1240}* and *dadd1^{NP1240}/dadd1^{NP0793}* flies reach adulthood respectively, showing that the higher lethality present in *dadd1^{NP1240}/*

Table 1. Interaction between *dadd1*, and *atr^x*.

Genotype	Viability ^a (%)	Melanotic Masses ^b (%)
<i>atr^{x1}/+</i>	789/789 (100)	0/789 (0)
<i>atr^{x2}/+</i>	202/202 (100)	0/202 (0)
<i>atr^{x3}/+</i>	775/789 (98)	0/775 (0)
<i>atr^{x1}/atr^{x2}</i>	80/202 (40)	0/80 (0)
<i>atr^{x1}/atr^{x3}</i>	387/789 (49)	0/387 (0)
<i>atr^{x2}/atr^{x3}</i>	130/228 (57)	0/130 (0)
<i>dadd1^{NP1240}/+</i>	180/180 (100)	0/180 (0)
<i>dadd1^{NP0793}/+</i>	255/255 (100)	0/255 (0)
<i>dadd1^{NP1240}/dadd1^{NP1240}</i>	91/206 (44)	0/91 (0)
<i>dadd1^{NP1240}/dadd1^{NP0793}</i>	163/180 (90)	0/163 (0)
<i>dadd1^{NP1240}/+;atr^{x1}/+</i>	454/454 (100)	32/454 (7)
<i>dadd1^{NP1240}/+;atr^{x2}/+</i>	568/568 (100)	11/568 (2)
<i>dadd1^{NP1240}/+;atr^{x3}/+</i>	632/632 (100)	14/632 (2)
<i>dadd1^{NP0793}/+;atr^{x1}/+</i>	152/152 (100)	5/152 (3)
<i>dadd1^{NP0793}/+;atr^{x2}/+</i>	322/322 (100)	11/322 (3)
<i>dadd1^{NP0793}/+;atr^{x3}/+</i>	243/243 (100)	7/243 (3)
<i>dadd1^{NP1240}/+;atr^{x1}/atr^{x3}</i>	76/105 (72)	9/76 (12)
<i>dadd1^{NP1240}/+;atr^{x2}/atr^{x3}</i>	106/141 (75)	8/106 (8)
<i>dadd1^{NP0793}/+;atr^{x2}/atr^{x3}</i>	161/219 (73)	15/161 (9)

^aThe number of flies obtained over the number of flies expected according to the healthiest class in each cross. Percentage is in parentheses.

^bNumber of adult individuals with melanotic masses (Fig. 4B) observed over the total number of that particular class. Percentage is in parentheses.

doi:10.1371/journal.pone.0113182.t001

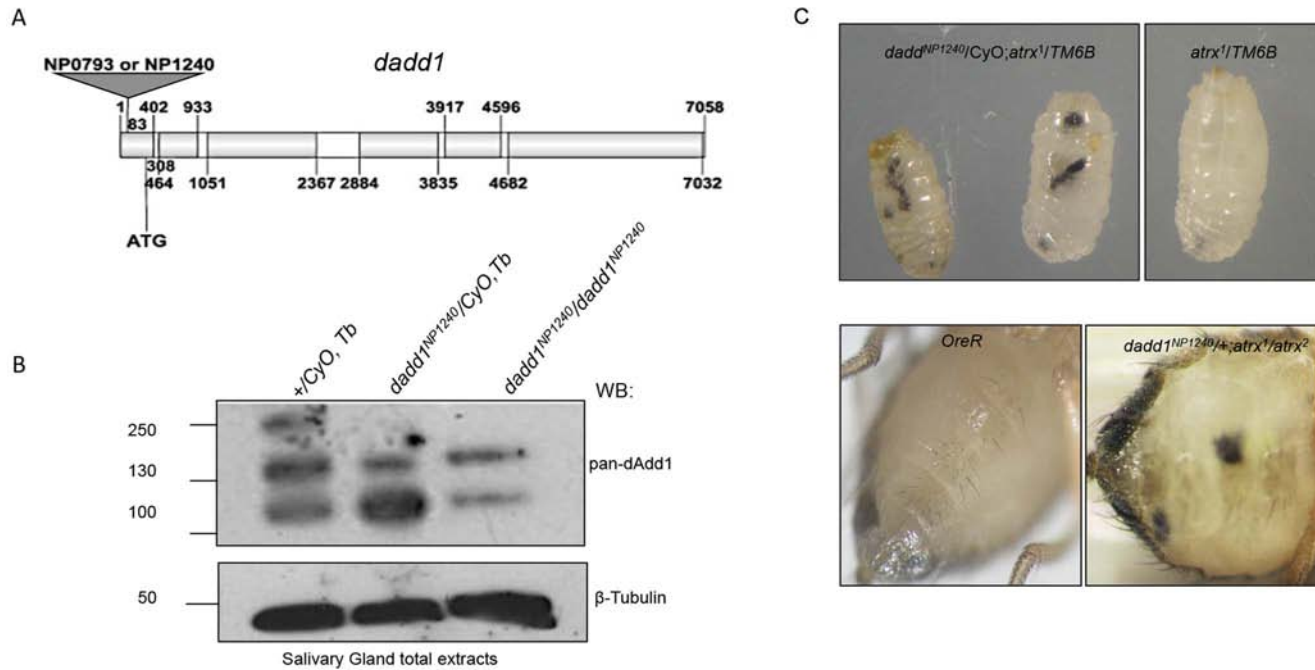


Figure 4. Genetic interaction between *dadd1* and *atrax*. A. Scheme of *dadd1* showing the position of the *EP* elements insertions (gray triangle) in *dadd1*^{NP1240} and *dadd1*^{NP0793} alleles, introns are represented by white boxes while exons are represented by gray boxes. The start codon at position 308 pb is also shown. B. *dadd1*^{NP1240} is an hypomorphic *dadd1* allele. Western blotting assay probed with the pan-dAdd1 antibody. Each lane contains 150 μ g of proteins from adult flies of the indicated genotype. β -tubulin was used as a loading control. Note the low levels of the dAdd1 proteins in homozygous individuals with respect to +/+ individuals. This demonstrates the allele is hypomorphic. The 250 kDa band observed in the wild type lane is an unspecific band. Molecular weight markers on the left of the panels represent kDa. C. Some *dadd1/atrax* individuals present melanotic masses. Melanotic masses that appear during larval (upper panel) and adult stages (lower panel) of mutant *dadd1/atrax* individuals are shown. Wild type individuals (*w*¹¹¹⁸ for larvae and *OreR* for adult) are shown to the left for comparison.

doi:10.1371/journal.pone.0113182.g004

dadd1^{NP1240} individuals (56%) compared to the one presented by the *dadd1*^{NP1240}/*dadd1*^{NP0793} flies (only 10%) may be caused by other lethals present in the *dadd1*^{NP1240} chromosome (Table 1). The heteroallelic *dadd1*^{NP1240}/*dadd1*^{NP0793} individuals are fertile and do not present any other obvious phenotype.

Survival of the transheterozygous *dadd1/atrax* flies is mildly affected, and a small percentage of these flies present melanotic masses, both in third instar larvae and adult individuals. The percentage of melanotic masses is higher in flies carrying two different alleles of *atrax* in combination with one allele of *dadd1* (Fig. 4, Table 1). We obtained similar results for all the combinations of *atrax* and *dadd1* alleles (Fig. 4, Table 1). The masses also appear during larval stages, and these individuals fail to advance further in development (Fig. 4C). Similarly, adult flies presenting melanotic tumors die within the first 10 days post-eclosion (data not shown). These data provide evidence that, besides the physical interaction we showed in the previous sections, there is a genetic interaction between dAdd1 and Atrax functions that is essential for fly development.

The dAdd1 proteins co-localize with HP1a in heterochromatic regions and cooperate with dAtrx in the maintenance of pericentric heterochromatin

As dAdd1 proteins interact with dAtrx_L, we thought that they could be involved in heterochromatin maintenance; therefore, we analyzed their interaction with HP1a.

As mentioned before, the HP1 α interaction domain in the dAtrx_L protein (245aa-CxVxL-249aa, [10]) does not overlap with the interaction domains of the dAdd1 proteins. It is possible that dAdd1-a, b or c, dAtrx_L and HP1a can co-exist in the same protein complex. If this is true, then we should be able to coimmunoprecipitate HP1 α with the dAdd1 proteins. We expressed a V5 epitope-tagged dAdd1 version in S2R⁺ cells and detected the presence of HP1a in an immunoprecipitation (IP) assay of the V5-dAdd1 protein with the V5 antibody (Fig. 5A, lower panel, white asterisk). Although the signal is faint it is specific because it cannot be detected in the mock control IP (Fig. 5A). This finding indicates that dAdd1-a is able to co-immunoprecipitate with HP1a.

We also show that dAdd1 and HP1a co-localize in heterochromatin regions and in the chromocenter of wild type polytene chromosomes (Fig. 5B yellow arrow). The dAdd1 signal is also observed in regions where no HP1a signal is detected (Fig. 5B green arrow).

The coimmunoprecipitation and immunolocalization analyses suggest that the dAdd1 proteins could be located in different regions of the chromatin. To analyze the binding of these factors at several heterochromatic and euchromatic regions in more detail, we performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays using different antibodies against HP1a, dAtrx_L and the dAdd1 proteins with chromatin from third instar larvae salivary glands and S2R⁺ cells (see Material and Methods).

HP1 α is not enriched in the TAS (Telomeric Associated Sequences) regions [38]. On the other hand, Antão *et al.*, (2012) [30] found through a proteomic analysis of chromatin segments (PICH) that dAtrx and of the product of *CG8290* are enriched in the telomeric associated sequences (TAS-L) but they did not find HP1a. Thus, we looked for the presence of HP1 α , dAtrx_L and the dAdd1 proteins in the telomeric region (TAS-L). Our ChIP experiments show, similar to Antão *et al.*, (2012) [30], that dAtrx_L and the proteins, but not HP1 α , are enriched in the TAS-L region (Fig. S5). We also found that dAtrx_L and the dAdd1 proteins colocalize in a region that can potentially form a G quadruplex structure (G4) (Fig. S5).

In search for heterochromatic regions where the proteins did not co-localize we tested the rover retrotransposon, which we know is a constitutive heterochromatic region enriched in H3K9me3 mark [29]. Here we found dAtrx_L is present but the dAdd1 proteins are not enriched in this region. This result indicates that dAdd1 and dAtrx_L do not colocalize at all the heterochromatic regions in the genome (Fig. S5). Next, we looked for an euchromatic region, we decided to use the *sgs8* promoter which is actively transcribing in third instar salivary glands [29]. We observed that in this euchromatic region there is some enrichment of dAdd1

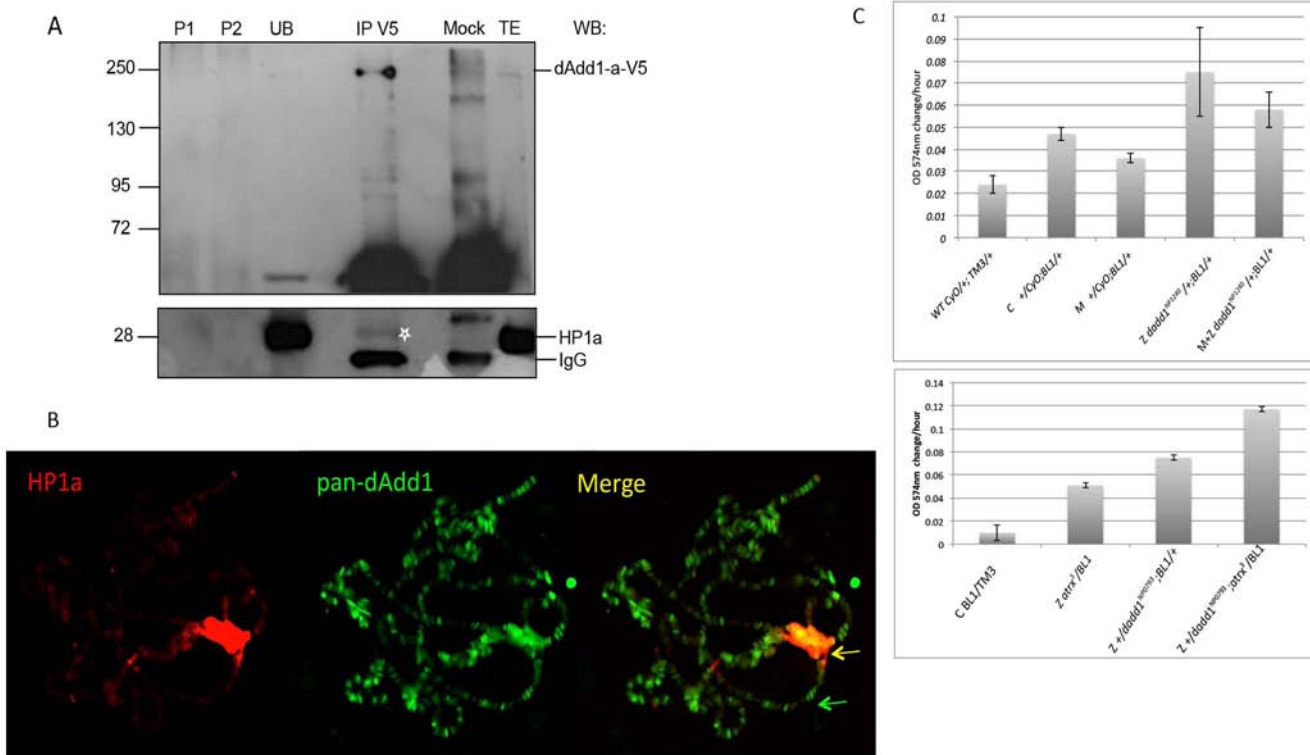


Figure 5. The dAdd1 proteins co-localize in heterochromatic regions with HP1a and cooperate with dAtrx in the maintenance of pericentric heterochromatin. A. ColP assay of dAdd1-a and HP1a. Total extract (TE) from transiently transfected S2R⁺ cells with dAdd1-a-V5, P1 and P2 are pre-clearing 1 and 2 (see Material and Methods); unbound protein fraction (UB); IP performed with anti-V5 (upper panel); Mock is the IP performed with purified mouse IgG. The presence of dAdd1-a-V5 was determined using the anti-V5 antibody. The presence of HP1a was determined using the anti-HP1a (CIA9) antibody (lower panel). Molecular weight markers on the left of the panels represent kDa. B. Polytene chromosomes preparations from wild-type *OreR* third instar larvae were simultaneously stained with anti-HP1a (red signal) and pan-dAdd1 (a-c) antibody (green signal). Merge bands containing both factors can be visualized mainly in the chromocenter (yellow signal). C. *dadd1* is a suppressor of position effect variegation. Quantitative β -galactosidase assay. The graphs show that *dadd1* alleles can suppress position effect variegation measured by the enzymatic activity of Lac-Z. WT= wild type flies with CyO and TM3 chromosome balancers; C= control flies derived from F1 progeny of paternally delivered *dadd1* alleles; M= Maternal depletion, F1 progeny flies of maternally delivered *dadd1* alleles; Z=zygotic depletion, flies derived from crossing males carrying the *dadd1* alleles to females carrying the BL1 allele; M+Z= maternal and zygotic depletion, flies derived from crossing females carrying the *dadd1* alleles to males carrying the BL1 reporter allele. The bottom graph shows that transheterozygous *dadd1*, *atrx* flies have an additive effect in the suppression of position effect variegation.

doi:10.1371/journal.pone.0113182.g005

proteins whereas dAtrx_L is not enriched as expected (Fig. S5). This finding is supported by the fact that in the immunolocalization experiments shown above, we also observe dAdd1 in euchromatic regions in the chromosome arms (Fig. 2D and Fig. S3).

The results obtained in the ChIP analyses could represent the capability of the different dAdd1 proteins to bind different regions of the chromatin. The fact that dAtrx_L and the dAdd1 proteins are not always together, as shown in the ChIP and the immunolocalization analyses, provide evidence that the dAdd1 proteins have functions independent of that with dAtrx_L. This result also shows that dAtrx_L can bind to chromatin regions independent of the dAdd1 proteins, most likely through interactions with other factors such as DREF [23].

The colocalization of HP1a, dAtrx_L and dAdd1 in the chromocenter raises the possibility that the dAdd1 proteins are involved in the maintenance of

heterochromatin. In a model for the maintenance of pericentric heterochromatin proposed by Eustermann S, *et al.*, (2011) [4], the ADD domain of the hATRX protein, reinforced by the interaction with HP1a, recognizes pericentric heterochromatin. Once hATRX is recruited its helicase/ATPase domain directs deposition of the histone variant H3.3 [4].

It has not been determined conclusively whether *Drosophila* dAtrx is involved in the deposition of the histone variant H3.3, but both HP1a and dAtrx_L localize at the chromocenter of polytene chromosomes and act as suppressors of position effect variegation for the *w^{m4}* allele, an inversion that lies near pericentric heterochromatin [10].

Following this hypothesis we tested the *dadd1* capability to suppress position effect variegation. We used the BL1 line, which carries a LacZ reporter construct that lies near the centromere [24,32]. In this assay, we can determine whether *dadd1* is involved in the establishment, crossing virgin females carrying the *dadd1* alleles to males carrying the reporter BL1 (maternal effect), or maintenance, crossing males carrying the *dadd1* alleles to females carrying the reporter BL1 (zygotic effect), of heterochromatin [32] (see Material and Methods).

The results show that *dadd1* does not have a relevant role in the establishment of pericentric heterochromatin (compare M (maternal) bar and C (control) bar in Fig. 5C top graph). When we analyzed the zygotic effect, virgin BL1 females crossed to *dadd1* male carrying alleles, the activity of LacZ was consistently higher in *dadd1* mutants (compare Z (zygotic) bar to C (control) bar in Fig. 5C top graph), indicating that the *dadd1* alleles can suppress position effect variegation and that *dadd1* has a role in the maintenance of heterochromatin rather than in the establishment of heterochromatin.

Next, we tested whether a combination of *dadd1* and *atrx* alleles enhances the suppression of position effect variegation in a cooperative manner. In fact, this is what we observed. Our results show that transheterozygous *dadd1/atrx* flies suppress position effect variegation more efficiently than heteroallelic flies carrying either the *dadd1* or *atrx* alleles (compare third and fourth bars in Fig. 5C bottom graph).

Overall, these results indicate that dAdd1 proteins are capable of interacting with proteins, such as HP1a, that are involved in the establishment of heterochromatin and that they cooperate with dAtrx_L in the maintenance of heterochromatin.

Su(var)205 interacts genetically with *dadd1*, and *atrx*

We showed that *dadd1/atrx* individuals present melanotic masses. The *Su(var)205²* is a loss-of-function HP1a allele because it carries a mutation in aminoacid 26 within the chromodomain. We tested whether the loss of function of HP1a in the presence of *dadd1* and/or *atrx* mutations affects the presence of the melanotic masses found in *dadd1/atrx* individuals.

Transheterozygous *Su(var)205²* flies carrying the *dadd1*, or *atrx¹* or *atrx²* alleles do not present melanotic masses, whereas *Su(var)205²* flies carrying *atrx³* (which

Table 2. *Su(var)205* interaction with *dadd1*, and *atr*x.

Genotype	Melanotic Masses ^a (%)
<i>Su(var)205</i> ² /+	0/487 (0)
<i>Su(var)205</i> ² /+; <i>atr</i> x ³ /+	6/366 (2)
<i>Su(var)205</i> ² / <i>dadd1</i> ^{NP1240}	0/201 (0)
<i>dadd1</i> ^{NP1240} /+; <i>atr</i> x ³ /+	3/69 (4)
<i>Su(var)205</i> ² / <i>dadd1</i> ^{NP1240} ; <i>atr</i> x ³ /+	16/111(14)

^aNumber of adult individuals with melanotic masses (Fig. 4B) observed over the total number of that particular class. Percentage is in parentheses.

doi:10.1371/journal.pone.0113182.t002

affects only the long isoform of dAtrx) present melanotic masses in a small percentage (Table 2). The penetrance of melanotic masses in *dadd*^{NP1240}/+; *atr*x³/+ (4%) or *Su(var)205*²/+; *atr*x³/+ (2%) individuals increases to 14% in *Su(var)205*²/*dadd*^{NP1240}; *atr*x³/+ individuals where mutations in the three genes are together (Table 2). These data show that the presence of melanotic masses in transheterozygous *dadd1*, *atr*x and *Su(var)205* flies most likely involves misregulation in the maintenance of heterochromatin.

Discussion

In vertebrates, hATRX is a protein with an ADD domain and an SNF2-helicase/ATPase motif. Through evolution, the SNF2 domain of hATRX has been highly conserved, but in invertebrates, the ADD domain is lost (Fig. 1D, [39]). In this article, we describe the characterization of the *Drosophila* dAdd1 proteins as orthologs to the amino-terminal region of Atrx. The *dadd1* gene expresses the dAdd1 proteins, which have an ADD domain (Fig. 1C), throughout development (Fig. 2B). The 3D structure of the dAdd proteins ADD domain (Fig. 1B) is more similar to the one found in hATRX than to the ADD domains found in other proteins. *Drosophila* dAdd1 and the ADD-less dAtrx interact physically (Fig. 3A, 3D) and genetically (Tables 1 and 2), and they interact with HP1a in heterochromatic regions (Fig. 5B).

The human *hATRX* gene encodes an SNF2 helicase/ATPase protein that has many different functions. It is part of a complex that includes the histone variant H3.3 chaperone DAXX, and it is involved in the deposition of this histone variant in pericentric and telomeric heterochromatin [7, 40, 41]. The hATRX protein can also bind to regions in the genome that can potentially form G-quadruplex structures and it has been proposed that this binding alleviates the quadruplex conformation and allows the deposition of H3.3 [9, 42]. Its participation in the deposition of histone variant H3.3 requires the helicase/ATPase activity, although it has not been determined whether this activity is also required for the binding and recognition of the G-quadruplex structures of the DNA. In addition to the SNF2 helicase/ATPase domain, hATRX also has an amino-terminal domain composed of two zinc fingers, a GATA-like finger and a PHD finger called the

ADD domain. This domain is able to recognize the H3K9me3 histone mark in combination with unmodified H3K4 through a "hydrophobic pocket", which is an unusual feature for a PHD zinc finger [33]. The interaction between hATRX and histone H3 chromatin marks has been shown to maintain hATRX binding to pericentric heterochromatin. A model has been proposed in which hATRX is directed to pericentric heterochromatin through the ADD domain, and this interaction is reinforced by the interaction between hATRX and HP1a. In this model, the SNF2 helicase/ATPase domain then directs histone H3.3 deposition or performs other required ATP-dependent functions [4].

dadd1 encodes three polypeptides that contain an ADD domain that is highly similar to the hATRX ADD domain (36% identity and 52% of similarity, [11] and this work). The comparison of the 3D-structure analyses of the ADD of *Drosophila* dAdd1 and hATRX reveal that these domains overlap and that the histone recognition pocket is conserved.

Our phylogenetic inference analysis using the ADD domain of hATRX indicates that the ATRX gene underwent a fission event. This fission has been described in at least another chromatin-binding-protein encoding gene, *cara mitad* (*cmi*), which is the homolog of the amino-terminal portions of mammalian *MLL2* and *MLL3* [32].

It is intriguing that there are three spliced isoforms encoded by the *dadd1* gene. The dAdd1-a isoform contains the ADD domain and no other putative domains, while the other two spliced isoforms have additional domains called MADF (myb/SANT-like domain in Adf1). The MADF domains are a subfamily of the SANT domains. They are DNA-binding domains found in all *Drosophila* species. In the case of Adf1, the first *Drosophila* factor identified to have an homology to the Myb oncoprotein [43], the MADF domain recognizes and binds certain sequences in repetitive regions [44], although there are some examples in which the MADF domains can also bind proteins, and apparently the specificity lies in the domain's isoelectric point [45].

The predicted isoelectrical point of the three MADF domains in the dAdd1 proteins is basic, which could indicate that they can bind to DNA.

The acquisition of new domains indicates that these proteins most likely have diverged functions. One indication of this could be the pattern of the immunolocalization of dAdd1 in polytene chromosomes, where not all the signals derived from the pan-dAdd1 antibody co-localize with dAtrx_L. This indicates that the dAdd1 isoforms could also have roles independent of their interaction with dAtrx_L.

The survival of transheterozygous individuals carrying the *dadd1/atrx* alleles is compromised, and some of the larvae and adult individuals show melanotic masses. We found that these proteins also colocalize with HP1a and that dAdd1-a immunoprecipitates with HP1a. Diminished HP1a levels in *dadd1/atrx* flies enhance the incidence of melanotic masses. Our results are supported by the recent report of Alekseyenko *et al.*, (2014), in which it is demonstrated that dAdd1 physically interacts with HP1a and that dAdd1 is a suppressor of variegation [11].

The generation of melanotic masses involves problems in the differentiation of hematopoietic cells in the flies. The differentiation of hematopoietic cells takes place in the early embryonic head mesoderm and in the lymph gland of late larvae, and three different types of cells are derived from the prohemocytes; the plasmatocytes, crystal cells and lamellocytes. Several different pathways regulate the differentiation of these cells [46]. One of the pathways involves a balance in the expression of the Pnr- α and Pnr- β proteins, which is controlled by the JAK/STAT pathway [48]. Jak hyperactivation results in the proliferation of hemocytes, lamellocyte differentiation and the generation of melanized pseudotumors. Pseudotumors or melanotic masses are formed by crystal cells and lamellocytes [47]. On the other hand, Stat is a positive regulator of plasmatocyte differentiation, and one of the downstream factors regulated by Stat is the GATA factor Pannier [48]. Importantly, our group had already identified *pannier* (*pnr*) as a gene regulated by dAtr_L and another transcriptional factor DREF [25]. In that report, we concluded that dAtr_L is recruited to the *pnr* gene promoter through DREF, and that it acts as a co-repressor of *pnr* gene expression.

Furthermore, the data obtained from the genetic interactions between the *dadd1*, *atr* and *Su(var)205*² alleles indicates that melanotic masses are derived from problems in the proteins involved in heterochromatin maintenance, such as dAtr_L and HP1a. The position effect variegation assay indicated that the dAdd1 proteins are involved in the maintenance of heterochromatin. Thus, an attractive hypothesis is that dAdd1, dAtr_L and HP1a cooperate and promote heterochromatinization at the promoters of the genes involved in the JAK/STAT pathway, including *pnr*. Lack of these proteins could lead to misregulation of the effectors of the pathway, giving rise to the melanotic masses. Experiments are being carried out to test this hypothesis.

In the human ATRX syndrome, the majority of the mutations identified so far affect the ADD or the SNF2 helicase/ATPase domains. The fact that the domains are separated in flies provides a new important tool to study the individual roles these domains have in the development of the organism.

Supporting Information

Figure S1. dAdd1 antibodies recognize specifically the dAdd1 proteins. a) Western blot using the pan-dAdd1 antibody. The dAdd1 isoform signals (lane 1) observed with the pan-dAdd1 antibody are no longer observed in lane 2. This demonstrates that the GST-dAdd1 fusion protein which harbors the peptide used to raise the pan-dAdd1 antibody is able to deplete them from this fraction. The dAdd1 signals are no longer observed (lane 2) showing that the pan-dAdd1 specifically recognizes the dAdd1 isoforms (see also Materials and Methods). b) Anti-dAdd1-a antibody recognizes the dAdd1-a protein. Indicated GST fusion proteins were loaded and blotted onto a nitrocellulose membrane. The Western blot was performed with an anti-dAdd1-a antibody (top panel) or an anti-GST antibody (bottom panel). The dAdd1 specific signal is observed only where the

GST-dAdda-1 fusion protein harboring the peptide used to raise the antibody was loaded (GST-dAdd1 aminoacids 620-1199) (left lane, top panel). The antibody does not recognize a fusion protein that lacks this peptide (right lane, top panel). The GST antibody recognizes the aforementioned two GST-dAdd1 fusion proteins (bottom panel). Extra bands (asterisks, right lane, bottom panel) may be fusion protein degradation. c) Specificity test for the dAdd1-b antibody. Indicated GST-fusion proteins were induced in *E. coli*. Induced extracts were loaded and blotted onto nitrocellulose membranes. The Western blot (upper panel) was performed using the anti-dAdd1-b antibody. A specific signal is observed (lane 3, black arrow in the blot and in the Ponceau staining) which corresponds to the induced GST-dAdd1-b fragment (aa 530-1125) and not GST or GST-dAdd1-a (aa 620-1199) (lanes 1 and 2 respectively). Faint bands in the first two lanes are unspecific signals.

[doi:10.1371/journal.pone.0113182.s001](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113182.s001) (TIF)

Figure S2. The *atrx* gene suffered a fission event in the Insecta class. Maximum Likelihood Phylogenetic Analysis of Helicase/ATPase domain and the corresponding Protein Domain Architecture information of its containing proteins. The numbers shown represent bootstrap values. It can be seen that the common ancestor to plants and animals had a protein with both, the ADD and the helicase/ATPase domains, but insects show the homologous domains in different proteins. Since it is more likely that only one fusion event, instead of two independent acquisitions of the same domain, occurred during the evolution, the most parsimonious explanation is to consider a model in which a gene fission event occurred within the Insecta class. For the parameters used, see Material and Methods section.

[doi:10.1371/journal.pone.0113182.s002](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113182.s002) (DOCX)

Figure S3. The dAdd1 proteins localize at many chromatin regions in polytene chromosomes. Wild type polytene chromosome staining was performed with the pan-dAdd1 antibody (red). The dAdd1 proteins localize in heterochromatic regions such as the chromocenter and the fourth chromosome (inset, white arrow). Staining along the chromosomes arms and in euchromatic regions is also observed.

[doi:10.1371/journal.pone.0113182.s003](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113182.s003) (TIF)

Figure S4. Alleles *dadd1*^{NP1240} and *dadd1*^{NP0793} are hypomorphs.

Semiquantitative RT-PCR from wild type and mutant *dadd1* flies. *dadd1* mRNA level is lower in the *dadd1*^{NP1240} (upper panel) and *dadd1*^{NP0793} (lower panel) heterozygous flies than in the *dadd1* wild type flies (*w*¹¹¹⁸). In homozygous *dadd1*^{NP1240}/*dadd1*^{NP1240} (upper panel), *dadd1* is even lower than in the heterozygous condition. *rp49* transcript levels remained unchanged in the mutant alleles.

[doi:10.1371/journal.pone.0113182.s004](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113182.s004) (DOCX)

Figure S5. The dAdd1 proteins co-localize *in vivo* with dAtrx_I and HP1a in some chromatin regions. ChIP assay using total extracts from third instar salivary

glands (SG) prepared from wild-type larvae and S2R+ cells. Graphs represent the percentage of input precipitated using the different antibodies for the same regions. Note that in the rover region only dAtr_XL is enriched. Three independent biological replicates were performed.

[doi:10.1371/journal.pone.0113182.s005](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113182.s005) (TIF)

Acknowledgments

We would like to thank Dr. Sarah Elgin for kindly providing the BL1 reporter fly stock. Stocks obtained from the Bloomington Drosophila Stock Center (NIH P40OD018537) were used in this study. We also thank Carmen Muñoz and the Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (LNMA) of IBt, UNAM for technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MZ VVG. Performed the experiments: BLF SMN BHR AC DM VVG. Analyzed the data: ER MZ MV VVG. Contributed reagents/materials/analysis tools: AC ER. Wrote the paper: MZ MV VVG.

References

1. Gibbons RJ (2012) α -Thalassemia, Mental Retardation, and Myelodysplastic Syndrome. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2: pii: a011759.
2. Garrick D, Samara V, McDowell TL, Smith AJ, Dobbie L, et al. (2004) A conserved truncated isoform of the ATR-X syndrome protein lacking the SWI/SNF-homology domain. *Gene* 326: 23–34.
3. Dhayalan A, Tamas R, Bock I, Tattermusch A, Dimitrova E, et al. (2011) The ATRX-ADD domain binds to H3 tail peptides and reads the combined methylation state of K4 and K9. *Hum Mol Genet* 20: 2195–2203.
4. Eustermann S, Yang JC, Law MJ, Amos R, Chapman LM, et al. (2011) Combinatorial readout of histone H3 modifications specifies localization of ATRX to heterochromatin. *Nat Struct Mol Biol* 18: 777–782.
5. Mitson M, Kelley LA, Sternberg MJ, Higgs DR, Gibbons RJ (2011) Functional significance of mutations in the Snf2 domain of ATRX. *Hum Mol Genet* 20: 2603–2610.
6. Emelyanov AD, Konev YA, Vershilova E, Fyodorov DV (2010) Protein complex of *Drosophila* ATRX/XNP and HP1a is required for the formation of pericentric beta-heterochromatin in vivo. *J Biol Chem* 285: 15027–15037.
7. Gibbons RJ, Wada T, Fisher CA, Malik N, Mitson MJ, et al. (2008) Mutations in the chromatin-associated protein ATRX. *Hum Mutat* 29: 796–802.
8. Goldberg AD, Banaszynski LA, Noh KM, Lewis PW, Elsaesser SJ, et al. (2010) Distinct factors control histone variant H3.3 localization at specific genomic regions. *Cell* 140: 678–691.
9. Law MJ, Lower KM, Voon HP, Hughes JR, Garrick D, et al. (2010) ATR-X syndrome protein targets tandem repeats and influences allele-specific expression in a size dependent manner. *Cell* 143: 367–378.
10. Bassett AR, Cooper SE, Ragab A, Travers AA (2008) The chromatin remodelling factor dATRX is involved in heterochromatin formation. *PLoS ONE* 3(5):e2099.

11. **Alekseyenko AA, Gorchakov AA, Zee BM, Fuchs SM, Kharchenko PV, et al.** (2014) Heterochromatin-associated interactions of *Drosophila* HP1a with dADD1, HIP1, and repetitive RNAs. *Genes Dev* 28: 1445–60.
12. **Ren J, Longping W, Gao X, Jin C, Xue Y, et al.** (2009) DOG 1.0: Illustrator of protein domain structures. *Cell Res* 19: 271–273.
13. **Rambaldi D, Ciccarelli FD** (2009) FancyGene: dynamic visualization of gene structures and protein domain architectures on genomic loci. *Bioinformatics* 25: 2281–2282.
14. **Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, et al.** (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947–2948.
15. **Abascal F, Zardoya R, Posada D** (2005) ProtTest: Selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* 21: 2104–2105.
16. **Guindon S, Gascuel O** (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 52: 696–704
17. **Le SQ, Gascuel O** (2001) An Improved General Amino Acid Replacement Matrix. *Mol Biol Evol* 25: 1307–1320.
18. **Letunic I, Bork P** (2011) Interactive Tree Of Life v2: online annotation and display of phylogenetic trees made easy. *Nucleic Acids Res* 39: (Web Server issue): W475–8.
19. **De Castro E, Sigrist CJA, Gattiker A, Bulliard V, Langendijk-Genevaux PS, et al.** (2006) ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Res* 34 (Web server issue):W362–W365.
20. **Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T** (2006) The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 22: 195–201.
21. **Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, Arnold K, Studer G, et al.** (2014) SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res* 42:(Web server issue): W252–8.
22. **Iwase S, Xiang B, Ghosh S, Ren T, Lewis PW, et al.** (2011) ATRX ADD domain links an atypical histone methylation recognition mechanism to human mental-retardation syndrome. *Nat Struct Mol Biol* 18: 769–76.
23. **Eissenberg JC, Morris G, Reuter G, Hartnett T** (1992) The heterochromatin associated protein HP1 is an essential protein in *Drosophila* with dosage dependent effects on position effect variegation. *Genetics* 131: 345–352.
24. **Lu BY, Bishop CP, Eissenberg JC** (1996) Developmental timing and tissue specificity of heterochromatin-mediated silencing. *EMBO J* 15: 1323–1332
25. **Valadez-Graham V, Yoshioka Y, Velázquez O, Kawamori A, Vázquez M, et al.** (2012). XNP/dATRX interacts with DREF in the chromatin to regulate gene expression. *Nucleic Acids Res* 40: 1460–74.
26. **Herrera-Cruz M, Cruz G, Valadez-Graham V, Fregoso-Lomas M, Villicaña C, et al.** (2012) Physical and functional interactions between *Drosophila* homologue of Swc6/p18 Hamlet subunit of the SWR1/SRCAP chromatin-remodeling complex with the DNA repair/transcription factor TFIIH. *J Biol Chem* 287: 33567–33580.
27. **Kamakaka RT, Kadonaga JT** (1994) The soluble nuclear fraction, a highly efficient transcription extract from *Drosophila* embryos. *Methods Cell Biol* 44: 225–235.
28. **Leclerc V, Tassan JP, O'Farrell PH, Nigg EA, Leopold P** (1996) *Drosophila* Cdk8, a kinase partner of cyclin C that interacts with large subunit of RNA polymerase II. *Mol Biol Cell* 7: 505–513.
29. **Palomera-Sanchez Z, Bucio-Mendez A, Valadez-Graham V, Reynaud E, Zurita M** (2010) *Drosophila* p53 is required to increase the levels of the dKDM4B demethylase after UV induced DNA damage to demethylate histone H3-lysine 9. *J Biol Chem* 285: 31370–31379.
30. **Antão JM, Mason JM, Déjardin J, Kingston RE** (2012) Protein landscape at *Drosophila melanogaster* telomere-associated sequence repeats. *Mol Cell Biol* 32: 2170–82.
31. **Jimenez G, Ish-Horowicz D** (1997) A chimeric enhancer-of-split transcriptional activator drives neural development and achaete-scute expression. *Mol Cell Biol* 17: 4355–4362.

32. **Gu T, Elgin SC** (2013) Maternal depletion of Piwi, a component of the RNAi system, impacts heterochromatin formation in *Drosophila*. *PLoS Genet* 9: e1003780.
33. **Li Y, Li H** (2012) Many keys to push: diversifying the 'readership' of plant homeodomain fingers. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 44: 28–39.
34. **Wang W, Yu H, Long M** (2004) Duplication-degeneration as a mechanism of gene fission and the origin of new genes in *Drosophila* species. *Nat Genet* 36: 523–527.
35. **Chauhan C, Zraly CB, Parilla M, Diaz MO, and Dingwall AK** (2012) Histone recognition and nuclear receptor co-activator functions of *Drosophila* cara mitad, a homolog of the N-terminal portion of mammalian MLL2 and MLL3. *Development* 139: 1997–2008.
36. **Bhaskar V, Courey AJ** (2002) The MADF-BESS domain factor Dip3 potentiates synergistic activation by Dorsal and Twist. *Gene* 299: 173–84.
37. **St. Pierre SE, Ponting L, Stefancsik R, McQuilton P, FlyBase Consortium** (2014) FlyBase 102 - advanced approaches to interrogating FlyBase. *Nucleic Acids Res* 42(D1): D780–D788.
38. **Frydrychova RC, Mason JM, Archer TK** (2008) HP1 is distributed within distinct chromatin domains at *Drosophila* telomeres. *Genetics* 180: 121–31.
39. **Park DJ, Pask AJ, Huynh K, Renfree MB, Harley VR, et al.** (2004) Comparative analysis of ATRX, a chromatin remodeling protein. *Gene* 339: 39–48.
40. **Drané P, Ouararhni K, Depaux A, Shuaib M, Hamiche A** (2010) The death-associated protein DAXX is a novel histone chaperone involved in the replication-independent deposition of H3.3. *Genes Dev* 24: 1253–65.
41. **Lewis PW, Elsaesser SJ, Noh KM, Stadler SC, and Allis CD** (2010) Daxx is an H3.3-specific histone chaperone and cooperates with ATRX in replication-independent chromatin assembly at telomeres. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 14075–14080.
42. **Clynes D, Higgs DR, Gibbons RJ** (2013) The chromatin remodeller ATRX: a repeat offender in human disease. *Trends Biochem Sci* 38: 461–6.
43. **England BP, Admon A, Tjian R** (1992) Cloning of *Drosophila* transcription factor Adf-1 reveals homology to Myb oncoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 683–687.
44. **Casola C, Lawing AM, Betrán E, Feschotte C** (2007) PIF-like transposons are common in *Drosophila* and have been repeatedly domesticated to generate new host genes. *Mol Biol Evol* 24: 1872–1888.
45. **Maheshwari S, Wang J, Barbash DA** (2008) Recurrent positive selection of the *Drosophila* hybrid incompatibility gene Hmr. *Mol Biol Evol* 25: 2421–2430.
46. **Jung SH, Evans CJ, Uemura C, Banerjee U** (2005) The *Drosophila* lymph gland as a developmental model of hematopoiesis. *Development* 132: 2521–2533.
47. **Minakhina S, Steward R** (2006) Melanotic mutants in *Drosophila*: pathways and phenotypes. *Genetics* 174: 253–263.
48. **Minakhina S, Tan W, Steward R** (2011) JAK/STAT and the GATA factor Pannier control hemocyte maturation and differentiation in *Drosophila*. *Dev Biol* 352: 308–16.