

UCH-FC  
Doc- BMCN  
Z 945  
C 1



# **“Daxud1 es un regulador transcripcional de la respuesta a estrés térmico”**

Tesis entregada a la  
Universidad de Chile  
en cumplimiento parcial de los requisitos  
para optar al grado de

**Doctor en Ciencias con Mención en Biología Molecular, Celular y  
Neurociencias**

Facultad De Ciencias

Por

**Jorge Matías Zúñiga Hernández**

Agosto, 2017

Director de Tesis: Dr. Álvaro Glavic Maurer

Co-Director de Tesis. Dr Miguel Allende Connelly

**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**INFORME DE APROBACION**  
**TESIS DE DOCTORADO**

**Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato**

**Jorge Matías Zúñiga Hernández**

**Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias mención Biología Molecular, Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 12 de Julio de 2017.**

**Director de Tesis**

Dr. Álvaro Glavic Maurer

  
.....

**Co-Director de Tesis**

Dr. Miguel Allende Connelly

.....



**Comisión Evaluadora**

Dra. Victoria Guixé (Presidenta)

  
.....

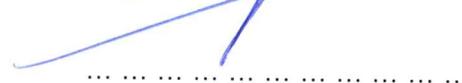
Dra. Verónica Cambiazo

  
.....

Dra. Verónica Palma

  
.....

Dra. Jimena Sierralta

  
.....

## BIOGRAFÍA



**Jorge Matías Zúñiga Hernández**

(AKA Perro Peri) Criado en Cauquenes hasta los 14 años, luego emigré a Santiago, donde cursé el resto de mi enseñanza media en el liceo A-52 (ex 7 de Ñuñoa). Estudié Bioquímica en la PUC para luego terminar el doctorado en ciencias en la Universidad de Chile.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar al profesor Dr. Álvaro Glavic por la confianza depositada para hacer este trabajo, también agradezco su ayuda y enseñanzas, como ver más allá de lo superficial en los resultados, potenciando buscar el significado completo de las cosas, mentalidad que es necesaria en todas las ciencias. También quiero agradecer al Dr. Miguel Allende por el apoyo inicial y disposición de herramientas para empezar este trabajo.

Siento un profundo agradecimiento por mis compañeros (amigos) del laboratorio de *Drosophila*, por su disposición a ayudar, a apoyar y en creer en el trabajo que realicé. Quiero mencionar a los primeros en estar presentes y que ya no están (Consuelo, Diego y Vicho). A los actuales por acompañarme en las últimas etapas, dando apoyo de diferentes formas: Emiliano, Fer, Fefi, Matías, Sandra, Claudia, Cristian, Debbie y Sergio. También a Don Floro, por mantener todo funcionando.

Junto al grupo de *Drosophila* siempre tuve el apoyo moral y teórico de los laboratorios de MA y VP. Siempre estuvieron conmigo Consu, Lucho, Andrea V, Arturo, Carlitos, Bárbara y Pablo Lois. Además del apoyo nutricional del *Fonopizza*.

Mis amigos del liceo siempre estuvieron ahí para compartirles mis experiencias buenas y malas del doctorado: Ed, Carlitos y Javier (SDI). Sumándose Gabriel, Mirta, Andrew.

Los amigos de la PUC merecen ser reconocidos por estar en el inicio y el presente de la carrera científica: Jhon, Naty, Francisco, Tomás y Lika. Especialmente Tomás por su ayuda desinteresada.

Finalmente, mi familia ha sido fundamental, a pesar de la distancia. Mi mamá, mi hermano Ronald, han sido y son apoyo fundamental para todo lo que hago. A mis tíos Jaime y Sergio, especialmente mi tío Sergio que me dio ánimo y apoyo para estudiar ciencias. Finalmente, quiero manifestar mis agradecimientos a mi abuelo (Tata Reinaldo), que siempre creyó en mí y me apoyó de todas las formas posibles para yo sea una persona decente y profesional. Creo que la mayoría de las cosas buenas que tengo y he logrado se las debo a él.



## Contenido

BIOGRAFÍA.....	iii
AGRADECIMIENTOS .....	iv
LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS.....	ix
Lista de tablas.....	xi
Lista de Figuras .....	xiii
RESUMEN .....	xvi
ABSTRACT .....	xvii
INTRODUCCIÓN .....	1
Estrés térmico.....	1
Modulación de expresión de Hsp70 .....	2
Otros elementos reguladores de la transcripción de hsp70.....	4
DAXud1 como posible regulador de respuesta a estrés.....	7
Antecedentes sobre el gen DAXud1 .....	8
Papel de Axud1 en procesos celulares del desarrollo animal .....	12
Resumen de antecedentes .....	13
HIPÓTESIS .....	15
Objetivo general .....	15
Objetivos específicos.....	15
Materiales y Métodos.....	16
Drosophila melanogaster, modelo de estudio.....	16
Nomenclatura de genotipos den Drosophila melanogaster .....	17
Reactivos, soluciones y otros materiales.....	20
Materiales biológicos .....	22
Soluciones.....	23
Protocolos experimentales para Drosophila.....	25
Condiciones de crecimiento de animales .....	25

Ensayos de sobrevivencia .....	25
Ensayos de pupación .....	25
Métodos de biología molecular .....	26
Transformación Bacteriana.....	26
Extracción de ADN plasmidial .....	26
Digestión con enzimas de restricción.....	26
Clonamiento convencional por ligación utilizando ligasa T4 .....	27
Extracción de ARN y transcripción reversa.....	27
qPCR.....	28
Inmunofluorescencia de cromosomas politénicos.....	29
DamID (TaDa-Seq) .....	31
Extracción y amplificación de ADN genómico .....	36
Preparación de librerías para secuenciación en Illumina.....	40
Análisis de datos de DamID-seq.....	40
Anotación de peaks.....	42
Extracción de secuencias de cada región enriquecida .....	42
Perfiles metagenómicos .....	43
Secuencias consenso.....	43
RESULTADOS .....	44
Objetivo específico 1: Evaluar si DAXud1 es necesario para la tolerancia a estrés térmico .....	46
Vinculación de DAXud1 a la respuesta de estrés térmico.....	46
Objetivo específico 2: Establecer si DAXud1 es un componente de la cromatina y si se localiza en loci vinculados a respuesta a estrés.....	52
Localización de DAXud1 en la cromatina.....	52
Relocalización cromosómica de DAXud1 durante estrés térmico.....	57
Objetivo específico 3: Generar un perfil de posicionamiento genómico de DAXud1 para establecer su rol regulatorio con respuesta global a estrés.....	59
Localización genómica de DAXud1.....	59
Anotación de peaks.....	62

Perfil general de localización o metagenómico .....	65
Motivos consenso derivadas del análisis de las secuencias en que se posiciona DAXud1 .....	72
DISCUSIÓN .....	75
1.- Rol de DAXud1 en la respuesta a estrés.....	76
1.1.- DAXud1 es un elemento de respuesta a estrés a través de genes hsp70 .....	77
1.2.- DAXud1 en la respuesta a estrés a corto y largo plazo. ....	79
2.- Función de DAXud1 como activador transcripcional .....	84
2.1.- ¿Es realmente DAXud1 un activador de la transcripción? .....	84
2.2 DAXud1 regularía su propia expresión durante estrés crónico .....	86
2.3.- DAXud1 se asocia a zonas genómicas con secuencias nucleotídicas vinculadas a promotores de estrés térmico .....	89
3.- Interacciones de DAXud1 con otros elementos de la cromatina .....	91
3.1.- Posible interacción de DAXud1 con Spt5, factor de elongación general .....	91
4.- DAXud1 interacciona física y genéticamente con Caudal .....	92
4.1.- DAXud1 tendría un rol sinérgico con Caudal en hematopoyesis temprana y expansión de neuroblastos .....	93
5.- Rol de DAXud1 en procesos diferentes a la respuesta a estrés.....	95
5.1.- Localización de DAXud1 sobre otros genes no relacionados con estrés.....	95
térmico .....	95
5.2.- DAXud1 como supresor de tumores .....	97
CONCLUSIONES.....	99
PROYECCIONES .....	100
BIBLIOGRAFÍA.....	101
ANEXOS.....	111
ANEXO 1: Análisis de secuenciaciones masivas, estadísticas y controles de calidad. ....	111
ANEXO 2: Datos y gráficos adicionales de DamID-seq .....	114
ANEXO 3: Interacción física y genética de DAXud1 con el factor de transcripción Caudal y otras proteínas nucleares. ....	117
Métodos Anexo 3 .....	124

Protocolo de Western Blot .....	124
Co-inmunoprecipitación de DAxud1 .....	125
ANEXO 4: ARN-seq.....	128
Genes diferencialmente expresados en pérdida de función.....	134
Correlación de datos de ARN-seq y qPCR .....	139
Genes cuya expresión de ARNm disminuyó en ganancia de función.....	151
ANEXO 5: pérdida de función de DAxud1 genera fenotipos de susceptibilidad frente a exposición a Paraquat, Peróxido de Hidrógeno y condiciones de ayuno .....	161
BIBLIOGRAFÍA ANEXOS .....	165

## LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>ARNi</b>	Ácido ribonucleico interferente
<b>Axud1</b>	Axin Up-regulated 1
<b>CSRNP</b>	Cysteine-Serine Rich Nuclear Protein
<b>CTD</b>	C-terminal repeat domain
<b>DamID</b>	DNA adenine methyltransferase identification
<b>DEPC</b>	Di-Etil Piro Carbonato
<b>DSIF</b>	DRB Sensitivity Inducing Factor
<b>FACT</b>	Facilitates Chromatin Transcription
<b>GFP</b>	Green Fluorescent Protein
<b>HSF</b>	Heat Shock Factor
<b>Hsp</b>	Heat Shock Protein
<b>JNK</b>	Jun N-terminal Kinase
<b>K.O</b>	Knock out
<b>PBS</b>	Phosphate Buffer Saline
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PFA</b>	Para-Formaldehído
<b>Pol</b>	Polimerasa
<b>Pol II</b>	Polimerasa II

<b>Pol Ilo</b>	Polimerasa II fosforilada en CTD
<b>PTefb</b>	Positive Transcription elongation factor b
<b>qPCR</b>	quantitative Polymerase Chain Reaction
<b>Spt</b>	Supressor of Ty
<b>TaDa-seq</b>	Targeted DamID sequencing
<b>UAS</b>	Upstream Activator Sequence

### Clave de nucleótidos según IUPAC

<b>A</b>	Adenina
<b>T</b>	Timina
<b>C</b>	Citosina
<b>G</b>	Guanina
<b>R</b>	A, G (purina)
<b>Y</b>	T, C (pirimidinas, en inglés <i>pyrimidine</i> )
<b>K</b>	G, T (ceto, en inglés <i>keto</i> )
<b>M</b>	A, C (amino)
<b>S</b>	G, C (enlaces fuertes, en inglés <i>strong</i> )
<b>W</b>	A, T (enlaces débiles, en inglés <i>weak</i> )
<b>B</b>	(cualquiera excepto A)
<b>D</b>	(cualquiera excepto C)
<b>H</b>	(cualquiera excepto G)
<b>V</b>	(cualquiera excepto T)
<b>N</b>	Cualquiera: A, G, C,T

## LISTA DE TABLAS

**Tabla 1:** Reactivos ordenados por fabricante.

**Tabla 2:** Descripción de cepas de *Drosophila melanogaster* utilizadas en el trabajo.

**Tabla 3:** Soluciones para biología molecular.

**Tabla 4:** Soluciones para otros métodos.

**Tabla 5:** Otros materiales y utensilios.

**Tabla 6:** Descripción de partidores para qPCR.

**Tabla 7:** Deciles de puntaje de calidad en datos brutos de secuenciaciones *masivas*.

**Tabla 8:** Agrupación de genes anotados que tuvieron posicionamiento significativo de DAXud1 en el experimento de DamID. La agrupación se realizó mediante la herramienta *Gene Ontology* (GO) de bases de datos en línea.

**Tabla 9:** Vías de señalización más enriquecidas de genes en que DAXud1 se posiciona (KEEG).

**Tabla 10:** Asociación de secuencias consenso a categorías de *Gene Ontology*, utilizando información de promotores anotados de *Drosophila melanogaster*.

**Tabla S1:** Principales proteínas identificadas por espectrometría de masa de co-inmunoprecipitación de DAXud1.

**Tabla S2:** Conteo en FPKM de isoformas de ARNm de DAXud1.

**Tabla S3:** Genes diferencialmente expresados en ganancia de función de DAXud1 respecto control.

**Tabla S4:** Genes diferencialmente expresados en condición de expresión de interferente de DAXud1 respecto al control.

**Tabla S5:** Genes que cambiaron en la misma dirección tanto en ganancia de función como en expresión de interferente en los experimentos de ARN-seq.

**Tabla S6:** GO de procesos biológicos en test de 2 réplicas de ARN-seq para los genes sobre-expresados en ganancia de función de DAXud1.

**Tabla S7:** Vías KEEG en genes sobre-expresados en el análisis de ARN-seq por 2 réplicas en ganancia de función de DAXud1.

**Tabla S8:** Categorías GO de Procesos Biológicos de genes sub-regulados en el análisis de ARN-seq por 2 réplicas en ganancia de función de DAXud1.

**Tabla S9:** Vías KEEG en genes sub-regulados en el análisis de ARN-seq por 2 réplicas en ganancia de función de DAXud1.

**Tabla S10:** Sumario de secuenciación de muestras de Dam-ID. Se expone la estadística de cada réplica de condiciones Control (Dam) y DAXud1.

**Tabla S11:** Sumario de secuenciación de muestras de ARN-seq. Se expone la estadística de cada réplica de condiciones Control, Ganancia de función (GOF) y pérdida de función (LOF).

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Expresión de proteínas Hsp se inducen por diferentes estímulos en células eucariontes
- Figura 2:** DAXud1 es un transcrito de componente materno y se expresa en tejidos con actividad mitótica.
- Figura 3:** Sobreexpresión de DAXud1 genera muerte celular.
- Figura 4:** El ciclo de vida de *D. melanogaster* y sus cromosomas.
- Figura 5:** Esquematación de órganos en larva y su posterior diferenciación a adulto.
- Figura 6:** Sistema TaDa de expresión de constructos Dam, basado en el sistema Gal4-UAS y el fenómeno de reiniciación de la traducción.
- Figura 7:** Plásmidos utilizados para generar los transgénicos en el experimento de Dam-ID/TAda-Seq.
- Figura 8:** Larvas con pérdida de función de DAXud1 muestran susceptibilidad al estrés térmico (ET).
- Figura 9:** Adultos con pérdida de función de DAXud1 presentan menor supervivencia frente a exposición continua a estrés térmico (ET).
- Figura 10:** Razones de cambio de expresión de ARNm por qPCR de genes *hsp* durante estrés térmico y pérdida de función de DAXud1.
- Figura 11:** DAXud1 se localiza en cromosomas politénicos en un patrón estereotipado característico.
- Figura 12:** La proteína GFP nuclear no se une a la cromatina en patrones como los observados en DAXud1::GFP.
- Figura 13:** DAXud1::GFP co-distribuye con ARN Polimerasa II transcripcionalmente activa.
- Figura 14:** DAXud1 relocaliza sobre *loci* que codifican genes Hsp70 durante estrés térmico.
- Figura 15:** Distribución genómica de los *peaks* significativos identificados por Dam-ID.
- Figura 16:** Distribución en intrones de los *peaks* significativos identificados por Dam-ID.
- Figura 17:** Perfil metagenómico de Dam::DAXud1 alrededor de los sitios de inicio de transcripción.

**Figura 18:** Perfil metagenómico sobre el cuerpo de los genes y agrupación de las señales.

**Figura 19:** Secuencias consenso encontradas a partir del alineamiento de las secuencias de los *peaks*.

**Figura 20:** Función propuesta para DAXud1 como regulador maestro de respuesta a estrés.

**Figura S1:** *Western blot* para inmunoprecipitaciones de DAXud1.

**Figura S2:** Inmunoprecipitación de DAXud1::GFP a partir de extractos proteicos de discos imaginales.

**Figura S3:** Co-expresión de ARN interferente de Caudal suprime fenotipo de ganancia de función de DAXud1.

**Figura S4:** Motivo identificado por DREME tiene similitud con el Motivo de unión a ADN de Caudal.

**Figura S5:** Alelo mutante de Spt5 rescata fenotipo de muescas en las alas producidas por sobreexpresión de DAXud1.

**Figura S6:** Resumen de datos de ARN-seq.

**Figura S7:** Relación entre genes que aumentaron su expresión génica en ganancia de función de DAXud1.

**Figura S8:** Expresión diferencial de variantes de *splicing* de DAXud1 en condiciones de pérdida y ganancia de función.

**Figura S9:** Interferente DAXud-IR26479 disminuye niveles de ARNm de DAXud1 y revierte fenotipo de ganancia de función.

**Figura S10:** Razones de cambio (transformadas a  $\text{Log}_2$ ) de genes diferencialmente expresados en ARN-seq analizada por qPCR.

**Figura S11:** Correlación de datos ARN-seq y qPCR.

**Figura S12:** Gráfico de *sashimi* que revela las variantes de *splicing* y el mapeo de los fragmentos secuenciados.

**Figura S13:** Constructos de ARNi de DAXud1 generan fenotipos diferentes en densidad celular y PH3.

**Figura S14:** Prueba de interferentes para genes que aumentaron su expresión en ganancia de función.

**Figura S15:** Diagramas de Venn de genes en común entre test de 2 réplicas (*Cuffdiff*) y genes con *peaks* positivos (*FindPeaks*).

**Figura S16:** Expresión específica de mCherry en discos imaginales y prueba de transgénico.

**Figura S17:** Mapa de posicionamiento de las secuencias DamID-seq.

**Figura S18:** Perfil metagenómico clusterizado desarrollado a partir del programa SICER.

**Figura S19:** Animales con pérdida de función de DAXud1 exhiben una mayor muerte celular en intestinos de animales alimentados con *Paraquat*.

**Figura S20:** Animales con pérdida de función de DAXud1 presentan un menor porcentaje de pupación que los animales control al crecer en medio con Peróxido de Hidrógeno.

**Figura S21:** Animales adultos con pérdida de función de DAXud1 son más sensibles a falta de nutrientes que la condición control.

**Figura S22:** Análisis de tamaño de muestras de Dam-ID post-fragmentación

**Figura S23:** Análisis de calidad de ARN, previo a la generación de librerías para ARN-seq.

## RESUMEN

La familia de proteínas CSRNPs esta conservada en animales y su ortólogo en *Drosophila melanogaster*, DAXud1, se ha vinculado con apoptosis y tolerancia a estrés. Además, se ha propuesto como posible factor de transcripción debido a su localización nuclear y su unión a secuencias nucleotídicas específicas en ensayos *in vitro*. Hasta ahora, no se han identificado genes blanco de DAXud1, ni la naturaleza de su función en el núcleo celular que lo vinculen con la respuesta a estrés. Por esto, en el presente trabajo se quiso establecer su posible rol en la respuesta transcripcional al estrés y apoptosis. En esta tesis, demostramos que DAXud1 es un componente de la cromatina, y durante el estrés térmico, la proteína es reclutada en gran cantidad en *loci* que codifican genes *hsp70*, proteínas chaperonas moleculares que impiden la agregación de las proteínas estructuralmente dañadas por los diferentes tipos de estrés abióticos. La pérdida de función de DAXud1 genera fenotipos de termosensibilidad, posiblemente debido a la menor expresión del ARNm *hsp70* observada en esta condición. Se estableció además que DAXud1 se mantiene de manera frecuente en regiones del genoma que tienen la secuencia nucleotídica RTACATAY, presente en todos los promotores de la familia de genes *hsp* de *Drosophila melanogaster*. Con esta información, determinamos que una de las funciones fisiológicas de DAXud1 es la de mantener una eficiente transcripción de genes *hsp70* en respuesta al estrés térmico.

## ABSTRACT

The CSRNP family of proteins, conserved only in animals and whose orthologous is DAXud1 in *Drosophila melanogaster*, has been linked with apoptosis and stress tolerance. In addition, it has been proposed as a possible transcription factor due to its nuclear localization and its binding to specific nucleotide sequences, verified by *in vitro* assays. There is no information about the real function in the cell nucleus, and if is linked to a physiological process. Therefore, in the present work it was wanted to relate this characteristic with its possible role in stress and apoptosis, through experiments related to the increase of temperature. In these studies, we demonstrated that DAXud1 is a component of the chromatin, and during thermal stress, the protein is highly recruited at *loci* encoding *hsp70* genes, whose coding protein is a molecular chaperone that prevents protein aggregation from damage. The loss of DAXud1 function generates thermosensitive phenotypes, as well as lower *hsp70* mRNA expression, presumed base of the phenotype already mentioned. It was further established that DAXud1 is frequently maintained in regions of the genome that have the nucleotide sequence RTACATAY, which is in all promoters of the *hsp* gene family of *Drosophila melanogaster*. With this information, we determined that one of the physiological functions of DAXud1 is to maintain an efficient transcription of *hsp70* genes under conditions of thermal stress.

## INTRODUCCIÓN

---

### **Estrés térmico**

En la naturaleza, los seres vivos deben mantener su homeostasis para subsistir y completar su ciclo como individuos. Sin embargo, este proceso usualmente puede ser perturbado por las condiciones bióticas y abióticas que se presentan en el medio ambiente y que pueden poner en peligro su existencia. Todos los organismos tienen mecanismos para censar estas variaciones y responder adecuadamente, modificando su comportamiento y activando respuestas específicas a nivel fisiológico y celular.

Una de estas condiciones ambientales es el cambio de temperatura fuera de rangos fisiológicos, que provoca alteraciones en los componentes básicos de la célula: en las proteínas usualmente produce denaturación, y eventualmente, agregación de las mismas, perturbando el metabolismo general y la estructura del citoesqueleto (Welch y cols., 1986). A nivel de lípidos, el aumento de temperatura afecta la fluidez de la membrana celular, produciendo desbalances en la osmolaridad y afectando la integridad celular (Coote y cols., 1991).

Dado que las fluctuaciones de temperatura son frecuentes en la naturaleza, todos los organismos poseen mecanismos moleculares de tolerancia al estrés térmico.

## **Mecanismos de tolerancia y respuesta**

En la célula, el mecanismo de respuesta y tolerancia mejor caracterizado es la síntesis inducible y rápida de una familia de proteínas HSPs (*Heat Shock Proteins, HSPs*), conservadas en todos los reinos (Hightower, 1991). En eucariontes, la familia se compone de las proteínas Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 y Hsp27. Hsp70, también conservada en todos los reinos, ha sido la proteína más estudiada en cuanto a estructura, síntesis y regulación, ya que fue la primera en ser descubierta (Hightower y cols., 1991; Mayer y cols., 2005).

La identificación de los genes que codifican las proteínas Hsp70 ocurrió por observaciones directas de cambios de condensación de los cromosomas politénicos de *Drosophila melanogaster* extraídos de tejidos expuestos a un aumento de temperatura o estrés térmico (37°C por 30 minutos). Específicamente, en este estudio se observó una descondensación de cromatina en los *loci* 87A y 87C (Ritossa, 1962). Posteriormente se estableció que en esos *loci* estaban localizados los genes que codifican para las proteínas Hsp70 (Ashburner y cols., 1979), incluyendo 5 parálogos: Hsp70Aa, Hsp70Ab, Hsp70Bb, Hsp70Bbb y Hsp70Bc. Estudios posteriores establecieron que estas proteínas son esenciales para la tolerancia al estrés térmico tanto agudo como crónico (Lindquist, 1986).

### **Modulación de expresión de Hsp70**

En *Drosophila melanogaster* la síntesis de ARNm y proteínas Hsp70 es relativamente rápida en todos los tejidos de la larva después de la exposición a un aumento de temperatura de 25° grados a 37°C ó 39°C. Así, los niveles de ARNm y

proteína de Hsp70 aumentan significativamente a los 15 minutos después de la exposición a esta condición de estrés (Gasch y cols., 2000; Kregel y cols., 2002; Lakhotia y cols., 2002).

En eucariontes, la inducción de síntesis de ARNm y proteínas Hsp70 no sólo es desencadenada por estrés térmico, siendo demostrado que su expresión aumenta fuertemente en tejidos de *Drosophila* durante estrés oxidativo (Ahamed y cols., 2010; Donati y cols., 1991; El Golli-Bennour, 2011), hipoxia (Azad y cols., 2011), exposición a metales pesados (Courgeon y cols., 1984), etanol (Michel y cols., 1986) y presión hidrostática en las células (Kaarniranta y cols., 1998).

Según el modelo universal de regulación de expresión de *hsp70*, el principal regulador transcripcional de la expresión de *hsp70* es el factor de transcripción HSF. Según el modelo propuesto de Kregel y cols., 2002, en condiciones fisiológicas este factor de transcripción se encuentra unido a Hsp70 e inactivo en el citoplasma. Mientras, bajo situaciones de estrés térmico, oxidativo, hipoxia, entre otros, la proteína HSF pierde afinidad por Hsp70, producto de cambios conformacionales inducidos por las condiciones de estrés (Kregel y cols., 2002). A partir de estos cambios, se forman homotrímeros de HSF, que corresponde a la configuración activa, que transloca al núcleo y activa la transcripción de *hsp70* entre otros genes (Morimoto y cols., 1998; Kregel y cols., 2005). A su vez, si las condiciones estresantes perduran, se establece un circuito de retroalimentación positiva y los niveles de ARNm de HSF aumentan (Tang y cols., 2015). Este mecanismo permite establecer una adaptación al estrés a largo plazo (Tang y cols., 2015).

También se ha demostrado que HSF se puede activar y unir en *loci* de genes *hsp70* por sí sola en condiciones que no generan aumento evidente en la cantidad de proteínas denaturadas, como son el aumento de calcio intracelular, antiinflamatorios y ácido salicílico (Bruce y cols., 1993; Housby y cols., 1999; Price y cols., 1999). De lo anterior y del mecanismo canónico de regulación de la expresión de las Hsp previamente presentado se desprende que posiblemente existen otros factores que favorecen la activación la transcripción de los genes *hsp* en conjunto de HSF, coordinando respuestas rápidas para responder a diferentes condiciones de estrés.

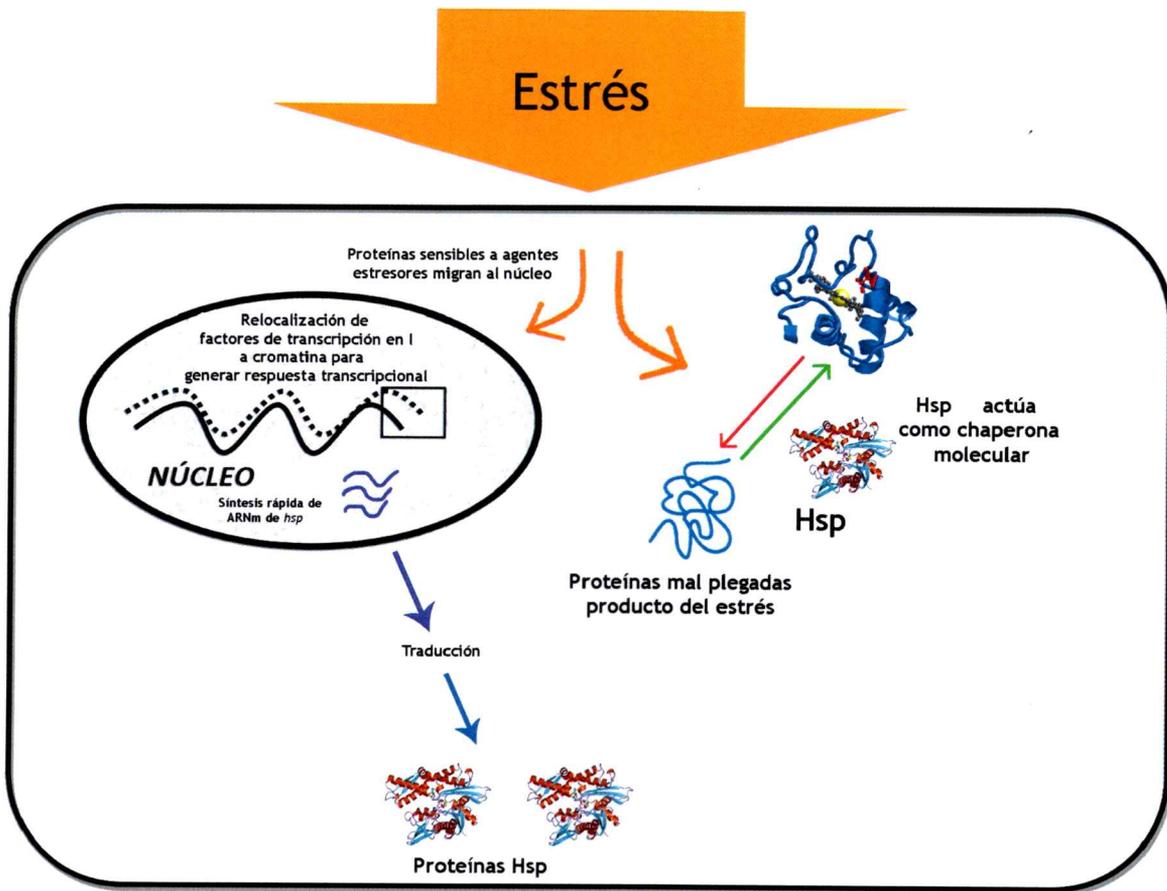
En este sentido, al someter a larvas de *Drosophila* a estrés oxidativo (presencia de concentraciones de oxidantes como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), HFS relocaliza al núcleo y acumula en los *loci* 87A-87C, aunque su efecto en el aumento de ARNm de *hsp70* no es tan pronunciado como el observado en situación de estrés térmico (Bruce y cols., 1993). Los transcritos y las proteínas Hsp70 aumentan durante el estrés oxidativo a corto, mediano y largo plazo (Ahamed y cols., 2010; Donati y cols., 1990; El Golli-Bennour, 2011), por lo que HSF sería uno de varios posibles factores que participan en esta respuesta al estrés y como mediadores de la tolerancia al estrés en términos generales.

### **Otros elementos reguladores de la transcripción de *hsp70***

Existen otros elementos reguladores que se posicionan en los promotores de genes *hsp70* durante los procesos de respuesta a estrés, promoviendo la elongación de la ARN Polimerasa II durante la transcripción y mejorando la eficiencia de la activación de la transcripción por apertura de la cromatina

(desplazamiento de nucleosomas y modificación de histonas). Es precisamente en los *loci* que codifican *hsp70* (87A-87C) donde se relocalizan factores de transcripción y elongación adicionales a HSF, siendo algunos de ellos los factores de Spt5 y Spt6. Estos forman parte de un complejo denominado DSIF, el cual favorece la tasa elongación de la transcripción (Missra y cols., 2010), definida como la velocidad con que la Polimerasa incorpora los nucleótidos a la hebra de RNA naciente por segundo.

En *Drosophila* el complejo DSIF se encuentra ampliamente distribuido en la cromatina, pero experimenta una marcada relocalización en los *loci* 87A y 87C durante estrés térmico (Andrulis y cols., 2000). Un fenómeno similar ocurre con las proteínas Ciclina-T y Cdk9, que forman parte de otro complejo que promueve y mantiene la fosforilación del dominio CTD de la ARN Polimerasa II, conservándola activa durante la transcripción (Lis y cols., 2000). Ambos complejos son esenciales para la transcripción eficiente de los genes *hsp70* frente a condiciones de estrés térmico. En consecuencia, la pérdida de función de alguno de los componentes da lugar a una disminución de la transcripción de genes *hsp70* y de la respuesta al estrés térmico (Lis y cols., 2000).



**Figura 2: Expresión de proteínas Hsp se inducen por diferentes estímulos en células eucariotes.** Agentes estresores como cambios de temperatura, radicales libres, presión, acidificación, entre otros generan mal plegamiento de las proteínas, generando perturbaciones en la homeostasis y viabilidad celular. Adicionalmente, en el núcleo se desencadena una respuesta transcripcional que deriva en un fuerte aumento en la síntesis de proteínas Hsps, que impiden en parte los efectos deletéreos del mal plegamiento en las proteínas y su agregación. Adaptado de Kregel, 2002.

También existen otros elementos de la cromatina, como los modificadores de histonas Spt16 y SSRP (Saunders y cols., 2003), que junto al co-activador MED13 (Lebedeva y cols., 2005), se relocalizan a los loci *hsp* del genoma durante el estrés térmico, manteniendo la cromatina en condiciones que favorecen la transcripción. Debido a la creciente cantidad de elementos que se han identificado como participantes en este tipo de respuesta, no se han descartado nuevos factores asociados a la cromatina que pudieran modular la activación de la transcripción de genes *hsp* y la respuesta al estrés celular.

### **DAXud1 como posible regulador de respuesta a estrés**

Si bien se han estudiado varios elementos que participan en la respuesta general a estrés, y en la regulación de los genes *hsp70* como uno de los principales efectores, persiste la búsqueda de nuevos elementos reguladores que permitan entender la diversa y sutil modulación de las respuestas frente a las diferentes condiciones de estrés celular. Dentro de la búsqueda de nuevos elementos implicados en la respuesta a estrés, se ha propuesto que las proteínas de la familia CSRNP (Cystein-Serine Rich Nuclear Proteins; DAXud1 en *Drosophila melanogaster*) actuarían como factores de transcripción (Gingras y cols., 2007).

Estas proteínas están conservadas en animales, y se le ha sugerido que tendrían roles en la supresión de tumores (Ishiguro y cols., 2001), respuesta a interleuquinas (Gingras y cols., 2007; McDermonntt y cols., 2012) y en general, a estrés de diferente naturaleza.

Sobre su función en estrés, existe una correlación recurrente entre aumento de los niveles de ARNm de los homólogos de DAXud1 y la exposición a estrés oxidativo (Yi y cols., 2006; Cheng y cols., 2013), respuesta inmune a patógenos (McDermont y cols., 2012) y presión (Diercke y cols., 2014). No se ha estudiado si se mantiene correlación con el estrés térmico, o si esta proteína es necesaria para la respuesta a los diferentes tipos de estrés. Estos estudios concuerdan en que DAXud1 aumenta su expresión de manera significativa frente a estrés crónico, que es similar a lo que ocurre con HSF frente a estrés térmico (Tang y cols., 2015). Por otra parte, los estímulos que aumentan los niveles de expresión de los homólogos de DAXud1 son similares a los que incrementan la expresión de las proteínas Hsp70.

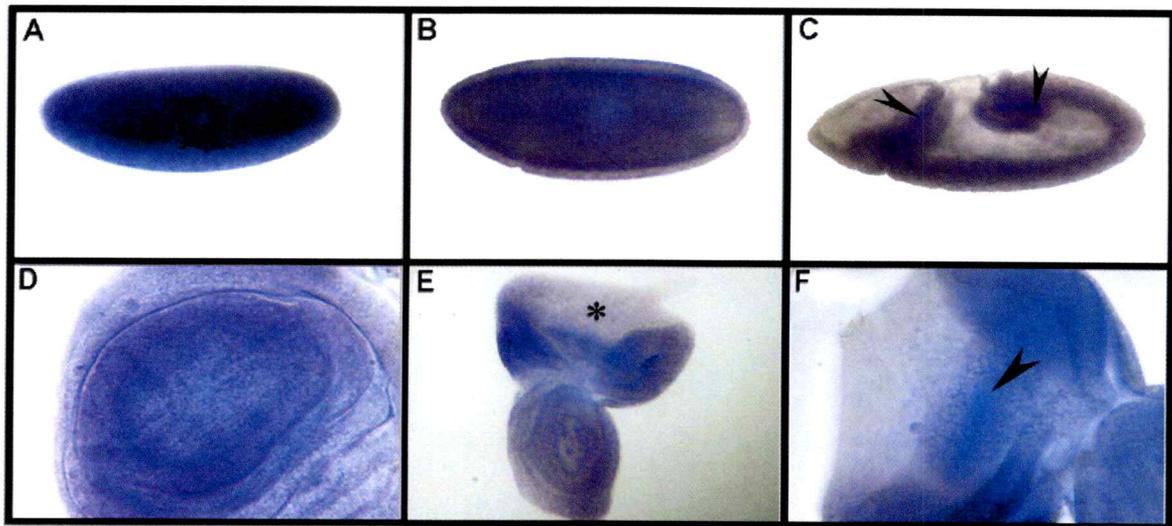
### **Antecedentes sobre el gen DAXud1**

El primer estudio de un homólogo de DAXud1 se realizó en un escaneo con microarreglo en cultivo de células de tumor de colon humano (Ishiguro y cols., 2001). Se demostró que, al comparar perfiles de expresión de células de cáncer de colon con células de epitelio sano, las células de cáncer tenían muy baja expresión de un gen de código A5900 (nombre de la sonda en el microarreglo que se utilizó, correspondiente a la de Axud1). Estas células además tenían una mutación en AXINA (elemento regulador negativo de la vía WNT), proteína constituyente del complejo que ubiquitina a la proteína Beta-Catenina, impidiendo que se acumule y que transloque al núcleo donde activa la expresión de genes blanco de la vía. En el mismo estudio se transfectaron esas células con un constructo que expresa AXINA, evidenciando que el gen homólogo de DAXud1

aumentaba su expresión de forma significativa; además el fenotipo de las células resultó en arresto del ciclo celular y apoptosis. Debido a lo anterior, el gen se conoció como AXUD1 (Acrónimo de AXin Up Regulated 1; DAXud1 en *Drosophila*) y se postuló como un posible gen pro-apoptótico y anti-mitogénico, respuestas típicas al estrés celular de diferente naturaleza (Redza-Dutordoir y cols., 2016). El grupo de Gingras y colaboradores (Gingras y cols., 2007) estudió los tres parálogos de ratón (*mus musculus*) (CSRNP-1, CSRNP-2, CSRNP-3), y descubrió que estas proteínas están conservadas desde *Drosophila* a Humano, llamando a este gen y sus ortólogos CSRNP (Cysteine-Serine Rich Nuclear Protein), debido a su composición aminoacídica y su localización nuclear. Además en el estudio se sugirió que estas proteínas serían factores de transcripción ya que mediante análisis SELEX<sup>1</sup> se identificó la secuencia de ADN AGAGTG a la cual se uniría. Por otro lado, un experimento de monohíbrido, donde se fusionó la proteína CSRNP-1 con el dominio de unión al DNA de la proteína Gal4, demostró que estas proteínas tienen un efecto transactivador de la transcripción del gen reportero.

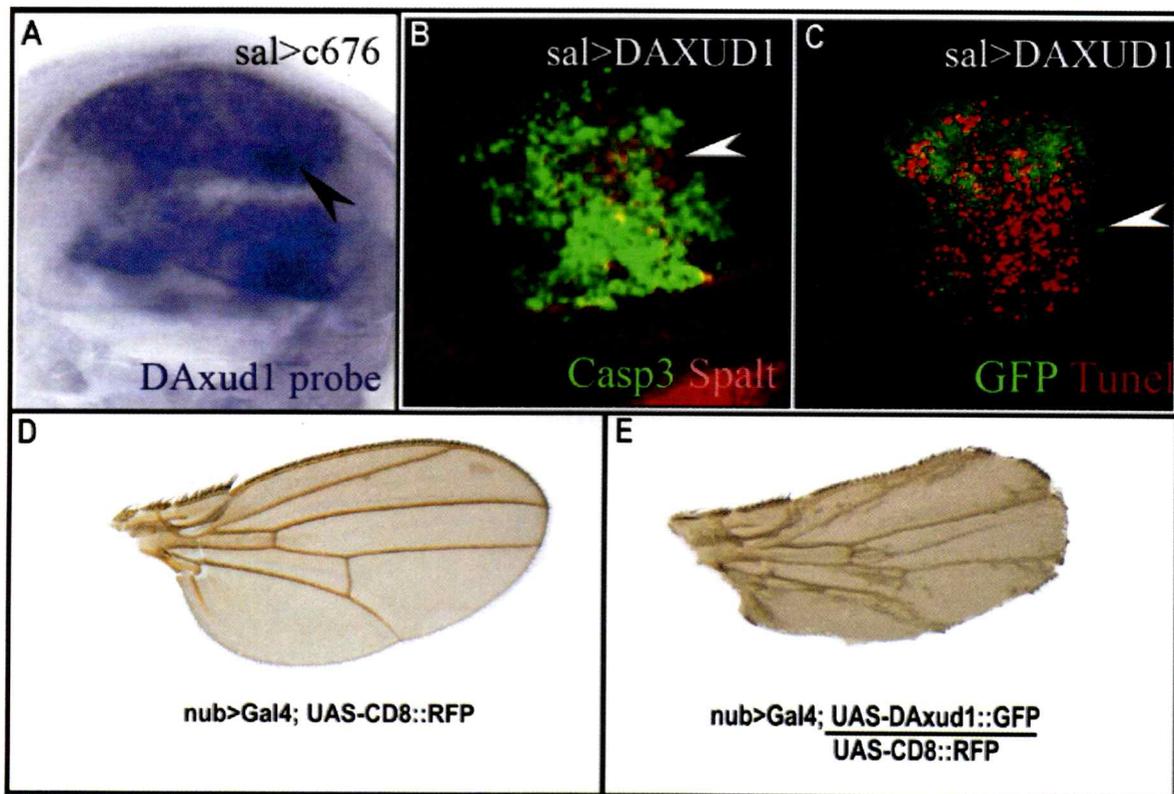
---

<sup>1</sup>SELEX: Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment. Traducción de Enriquecimiento exponencial de evolución de ligandos sistemática. Técnica que consiste en exponer la proteína recombinante de interés, unida a una matriz de forma covalente, a un medio con oligonucleótidos sintetizados artificial y aleatoreamente. Se basa en la unión selectiva de las secuencias, lavado para descartar los menos afines y amplificación de los que persistieron unidos después de los lavados. Se realizan varios ciclos y los oligos finales se secuencian (Djordjevic, 2007).



**Figura 2: DAXud1 es un transcrito de componente materno y que se expresa en tejidos con actividad mitótica.** Se muestran hibridaciones *in situ* realizadas para el transcrito de DAXud1. **A)** Embrión etapa 2 **B)** Blastodermo **C)** Embrión en etapa de elongación de banda germinal, en que se indica expresión en surco cefálico (flecha de la izquierda) y progenitores intestinales (derecha). **D)** Disco imaginal de ala, en que la expresión es mayor en el *pouch* **E)** Disco imaginal de ojo, en que se observa que la expresión tiene una marcada disminución en tejido anterior, en proceso de diferenciación a fotoreceptor, sin actividad proliferativa **F)** Acercamiento al disco de ojo de la imagen **E**, en que se observa con mejor definición la diferencia de expresión entre la zona proliferativa y en diferenciación, indicándose con flecha el surco morfogenético. Adaptado de Glavic y colaboradores (2009).

En un estudio previo de nuestro laboratorio en *Drosophila melanogaster* (Glavic y cols., 2009), se evidenció que DAXud1 presenta expresión de componente materno durante el desarrollo. Los mensajeros se distribuyen de manera relativamente ubicua en el embrión hasta la retracción de la banda germinal, estadio en que la expresión cigótica se restringe principalmente al primordio de intestino, cordón neural ventral y tejidos imaginales; todos tejidos con alta actividad mitótica (Figura 2).



**Figura 3: Sobreexpresión de DAXUD1 genera muerte celular.** En los recuadros superiores se muestran los efectos de la sobre-expresión de DAXUD1 en disco imaginal de ala de tercer estadio (A-C), siendo A) una hibridación *in situ* en que se observa el territorio de la sobreexpresión de un constructo de DAXUD1 (c676), mediante una expresión sitio dirigida mediante el sistema Gal4-UAS en la zona indicada por hibridación in situ para DAXUD1, B) Inmunofluorescencia de Caspasa 3 activada y C) Tinción TUNEL que revela células apoptóticas. D y E muestra los efectos de la muerte celular en el ala del adulto, exhibiendo: D) el Control y E) los efectos de la sobreexpresión DAXUD1, lo que demuestra el efecto de la muerte celular inducida por la ganancia de función. Figura adaptada de Glavic y colaboradores (2009).

También se demostró que la ganancia de función de D*Axud1* en *Drosophila melanogaster* produce muerte celular y arresto en la fase G2/M del ciclo celular en los discos imaginales (Figura 3). Este bloqueo en el ciclo celular induce apoptosis de las células de manera dependiente de la activación de la vía JNK (Glavic y cols., 2009; Diercke y cols., 2014; Korb y cols., 2016).

La expresión de las proteínas Hsp70 y la activación de la ruta JNK aumentan durante las respuestas a estrés celular (Gabai y cols., 1998), particularmente en el proceso de respuesta a estrés térmico, donde se requiere de ambos elementos para establecer una respuesta celular óptima (Gonda y cols., 2012). En consecuencia, D*Axud1* podría participar de la respuesta a estrés celular, como un modulador transcripcional influenciando el incremento y la activación de ambos elementos.

### **Papel de Axud1 en procesos celulares del desarrollo animal**

Además del potencial vínculo con la respuesta a estrés, se ha estudiado en pez cebra (*Danio rerio*) y en pollo (*Gallus gallus domesticus*) el rol de los ortólogos de D*Axud1* en el desarrollo de sistema nervioso central.

En pez cebra se analizaron sus dos ortólogos *Csrnp1a* y *Csrnp1b*. La inyección de un oligonucleótido morfolino contra *Csrnp1a*, que inhibe la producción de la proteína, en cigoto de pez cebra produce el desarrollo deficiente de cerebro y de linajes hematopoyéticos (Espina y cols., 2013); mientras que la inyección de morfolino contra *Csrnp1b* solo afecta el desarrollo de cerebro (Feijoo y cols., 2009). Esto se debe a que ambos parálogos se expresan y son requeridos en el

cerebro y la médula espinal en desarrollo, mientras que sólo Csrnp1a se expresa y sería necesario en la masa celular intermedia, región del embrión y larva de pez cebra de donde derivan las células hematopoyéticas.

Por otra parte el homólogo de DAXud1 en *Gallus gallus* se expresa en tubo neural en desarrollo, específicamente en las crestas neurales. La pérdida de función de esta proteína, generada por electroporación de un morfolino específico, impide la apropiada diferenciación y migración de las células de la cresta neural, precursores del sistema nervioso periférico del animal (Simoes-Costa y cols., 2015).

### **Resumen de antecedentes**

A continuación se resumen los principales antecedentes que dirigen la hipótesis y trabajo de esta tesis. 1) Los niveles de ARNm de DAXud1 aumentan fuertemente la exposición de los diferentes sistemas a una variedad de formas de estrés crónico, como son: estrés oxidativo, presión y patogenicidad; 2) se ha demostrado actividad pro-apoptótica, característica de un regulador terminal de la respuesta a estrés (Pietenpol y cols., 2002; Rossi y cols., 2015; Redza-Dutordoir y cols., 2016). 3) Gingras y colaboradores (2007) proponen que las proteínas CSRNP son reguladores transcripcionales. De lo anterior, podemos sugerir que los CSRNP podrían regular genes de la familia Hsp y otros durante la respuesta a diferentes tipos de estrés. En este trabajo nos propusimos analizar si DAXud1 se une a la cromatina y si esta propiedad está asociada a su capacidad de modular la activación de la transcripción de genes inducidos en respuesta a estrés general y térmico. Nos enfocamos en el estrés térmico debido a que la respuesta a esta



condición celular está ampliamente caracterizada comparte muchos elementos con otros tipos de estrés y es una condición experimental fácil de inducir donde se pueden investigar los cambios de expresión de los genes *hsp* y de otros a corto y largo plazo.

## HIPÓTESIS

“DAXud1 es un regulador transcripcional de genes de respuesta a estrés térmico”

### Objetivo general

“Establecer si DAXud1 es necesario para la respuesta a estrés térmico y definir su impacto en la regulación transcripcional de genes *hsp70*”

### Objetivos específicos

**Objetivo específico 1:** Evaluar si DAXud1 es necesario para la tolerancia a estrés térmico.

**Objetivo específico 2:** Establecer si DAXud1 es un componente de la cromatina y si se localiza en *loci* vinculados a la respuesta a estrés.

**Objetivo específico 3:** Generar un perfil de posicionamiento genómico de DAXud1 para establecer su potencial impacto regulatorio global en respuesta a estrés.

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

### ***Drosophila melanogaster*, modelo de estudio**

Dentro de la lista de ventajas del modelo, destaca el corto ciclo de vida, bajo costo de mantención de los individuos, gran progenie y además su proceso de desarrollo está bien estudiado. Su genoma está completamente secuenciado y anotado, siendo la última versión publicada en 2015 (Versión base *dm6*).

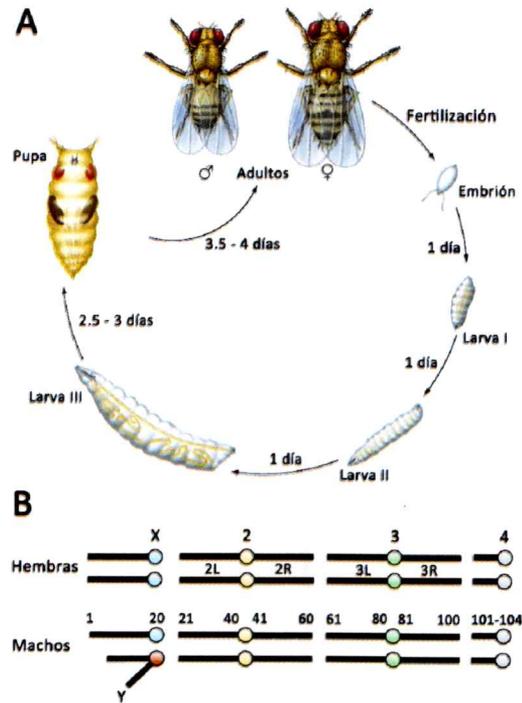
Un aspecto que permitió el desarrollo de *Drosophila* como un excelente modelo genético es la capacidad de mantener e identificar mutaciones y/o transgenes por generaciones. Mediante el uso de cromosomas balanceadores se puede mantener por generaciones un cromosoma modificado de interés por un número indefinido de generaciones. Éstos son cromosomas tienen inversiones y translocaciones, por lo que impide que la recombinación meiótica tenga lugar durante la ovogénesis (sólo las hembras recombinan). Cada balanceador posee un marcador de fenotipo dominante que es fácilmente reconocible. Existen balanceadores para los cromosomas X, 2 y 3, exceptuando los cromosomas 4 e Y debido a su tamaño.

## Nomenclatura de genotipos den *Drosophila melanogaster*

En este trabajo, se utilizó la nomenclatura simplificada. Para ilustrar de mejor forma la nomenclatura, revisamos un ejemplo:

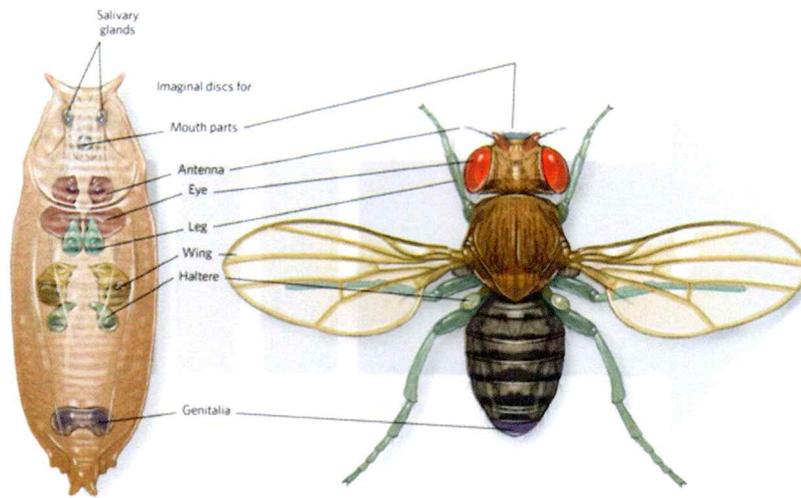
$y,w/w; +/UAS-GFP; hh>Gal4, UAS-RFP/Tb$

Los cromosomas se escriben en orden, partiendo por X, en la izquierda y hacia la derecha el resto, terminando con el cromosoma 3. Cromosomas 4 e Y no son indicados. Cada uno de ellos se separa por un signo ;. Los elementos que se encuentran en el mismo cromosoma son separados por , y los cromosomas homólogos de separan con /.



**Figura 4: El ciclo de vida de *D. melanogaster* y sus cromosomas.**

(A) Existen cuatro etapas en el ciclo de vida de este animal: embrión, larva, pupa y adulto o imago. Existen 3 estadios en la etapa larvaria, cada uno separado por períodos de muda. Luego de ellos, es en el pupario donde ocurre la metamorfosis. A una temperatura constante de 25°C se generarán nuevos adultos en aproximadamente 10 días. La vida del adulto puede durar varias semanas. (B) Se esquematiza los 4 pares de cromosomas que posee *D. melanogaster*. En la parte superior se indica la identidad del cromosoma (X, Y, 2, 3 ó 4). La leyenda inferior (2L, 2R, 3L y 3R) se refiere a la identidad de los brazos del cromosoma correspondiente, L para el izquierdo y R para el derecho. Los cromosomas X y 4 poseen un brazo izquierdo grande y casi no presentan el derecho. Los números sobre los cromosomas de los machos corresponden a las posiciones citológicas determinadas por la observación de cromosomas politénicos.



**Figura 5: Esquematización de órganos en larva y su posterior diferenciación a adulto.** Se esquematizan en larva, y en colores, los diferentes discos imaginales de *Drosophila melanogaster*, que darán origen a estructuras en adulto, transformación que ocurre durante el estado de pupación.

Las letras minúsculas representan mutaciones recesivas, y las mayúsculas hacen lo propio con las dominantes. Las secuencias bajo el control del promotor UAS se indican con un – (por ejemplo, UAS-GFP), mientras que los *drivers* de la expresión de Gal4 (factor de transcripción que activa promotores de UAS) se denotan con un signo > (*hh*>Gal4, por ejemplo). De tal forma, el ejemplo indica un animal hembra, que es mutante heterocigoto para el gen *yellow* (*y*), homocigoto para *white* (*w*) en el cromosoma x; uno de sus cromosomas 2 es silvestre, mientras que el homólogo posee una inserción UAS-GFP, uno de los cromosomas 3 tiene un *driver* que se indica *hh*>Gal4 y una inserción UAS-RFP y el homólogo la mutación dominante Tb. Estas combinaciones pueden realizarse a través de cruza, obteniendo animales con expresión específica de Gal4 y por lo tanto del elemento río debajo de UAS. El animal es homocigoto para un determinado cromosoma cuando se indica solamente el cromosoma.

### Reactivos, soluciones y otros materiales

Tabla 1: Reactivos ordenados por fabricante

Fabricante	Origen	Reactivo
Agilent	Santa Clara, EE.UU	Brilliant III SYBR® <i>qPCR</i>
AbCam	Cambridge, EE.UU	Anticuerpo Anti-ARN Polimerasa fosforilada monoclonal de ratón.
Becton Dickinson and Co.	Franklin Lakes, Nueva Jersey. EE.UU	Peptona, Bactotripton y extracto de bacto-levadura
Calbiochem	Darmstadt, Alemania	Anti-conejo IgG-HRP (DC03L) Anti-ratón IgG-HRP (DC02L) Tween-20

<b>Cell signaling</b>	Massachussets. EE.UU	Anti-GFP. Policlonal de conejo Anti-IGG, Conejo. Alexa-488 Anti-IGG, Ratón, Red-543
<b>Clontech/Takara</b>	Mountain View, EE.UU	Advantage HD, ARN Polimerasa
<b>Carolina</b>	Burlington. EE.UU	Medio de crecimiento Carolina Instant Blue 4-24
<b>Fermentas</b>	Glen-Burnie, Maryland. EE.UU	dNTP, MgCl <sub>2</sub> , marcador de peso preteñido para proteínas "Page Ruler Plus" (SM1811), agarosa grado analítico, tampón de carga 6X para ADN para electroforesis en agarosa
<b>Invitrogen</b>	Sao Paulo. Brasil	ADN polimerasa Taq  TRIzol
<b>Lefersa</b>	Santiago, Chile	Levadura fresca y congelada
<b>Merck</b>	Darmstadt, Alemania	Bromuro de etidio, glicerol, isopropanol, Tween-20, paraformaldehído, ácido acético, EDTA
<b>Mont Blanc</b>	Victoria, Chile	Harina de trigo sin polvos de hornear
<b>New England Bio-Labs</b>	Massachusetts, EE.UU	Enzimas de restricción: NotI, XhoI, Sau3IA, DpnI, DpnII  Kit de Ligasa T4
<b>Omega Bio-Tek</b>	Norcross, Georgia. EE.UU	Minipreps extracción plásmidos (E.Z.N.A.)
<b>Promega</b>	Madison, Wisconsin. EE.UU	Wizard SV Gel and PCR Clean-up (A1330), RT-PCR Improm II (A3800).
<b>Qiagen</b>	Hilden, Alemania	ADNeasy Blood & Tissue. Kit Extracción de ácidos nucleicos  PCR clean. Kit purificación de PCR

<b>Sanderson</b>	Santiago, Chile	Agua bidestilada libre de nucleasas
<b>Sigma</b>	St Louis, Missouri, EE.UU	Aceite Halocarbon 700, Triton X-100), Sigmacote®, Poli-L-Lisina.
<b>TCL</b>	Santiago, Chile	Algodón hidrofóbico
<b>Thermoscientific</b>	Waltham, MA EE.UU	Enzimas de restricción: Xbal, BgIII
<b>Vector Labs</b>	Burlingame, California, EEUU	Medio de montaje para fluorescencia (Vectashield)
<b>Watt's</b>	Santiago, Chile	Néctar de manzana y uva
<b>Winkler</b>	Santiago, Chile	Fenol, NaCl, CaCl <sub>2</sub> , ampicilina, mezcla acrilamida:bisacrilamida (29:1), albúmina de suero bovino (BSA), TEMED.

## Materiales biológicos

Se utilizaron cepas de *Drosophila* desarrolladas en el laboratorio y obtenidas desde distintas colecciones internacionales. Las cepas "Gal4>" y UAS- se detallan en la Tabla 2. Se presenta el genotipo, la procedencia (del laboratorio o centro de stocks de cepas) y comentarios.

**Tabla 2:** Descripción de cepas de *Drosophila melanogaster* utilizadas en el trabajo

<b>Genotipo</b>	<b>Procedencia</b>	<b>Comentarios</b>
<i>nub</i> >Gal4	Bloomington, Stock	Se localiza en el cromosoma X.
<i>nub</i> >Gal4;UAS-D <i>Axud1</i> ::GFP/CyO	Cruce de moscas en el laboratorio.	Ganancia de función de D <i>Axud1</i> en disco imaginal de ala.
Tub>Gal4/Tm6b	Bloomington	Permite expresión de Gal4 en todos los tejidos. Balanceado con TM6b. Localizado en cromosoma III.

Ubi-GFPnls	Bloomington	Expresión ubicua de GFPnls (nuclear). Cromosoma II
UAS-DAxud1::GFP	Diseñada y elaborada en el laboratorio	Permite sobreexpresión de DAxud1 fusionado a GFP por sistema Gal4-UAS. Cromosoma II.
UAS-IRv26479	VDRRC	Permite expresión de ARN para que sea procesado por Dicer y producir falta de función para DAxud1. Cromosoma II.
UAS-LT3mChe.Dam	Diseñada y elaborada en el laboratorio	Expresión de mCherry como ORF primario y proteína Dam como secundaria y en menor cantidad. Bajo el control de Gal4. Cromosoma III
UAS.LT3mChe.Dam::DAxud1	Diseñada y elaborada en el laboratorio	Expresión de mCherry como ORF primario y proteína de fusión Dam::DAxud1 como secundaria y en menor cantidad. Bajo el control de Gal4. Cromosoma III
P{y[+t7.7]=CaryP}attP2	Bloomington	Sitio attP2 para inserción de plásmido con attB en cromosoma III. Stock número 8622

## Soluciones

**Tabla 3:** Soluciones para biología molecular

<b>Solución</b>	<b>Composición y características</b>
<b>Medio Luria-Bertani</b>	Bacto-triptona 10 g/L, extracto de bacto-levadura 5 g/L, NaCl 5 g/L
<b>Agar Luria-Bertani</b>	Medio LB + agar-agar 15 g/L
<b>Medio SOC</b>	Bacto-triptona 20 g/L, extracto de bacto-levadura 5 g/L, 0.5 g/L NaCl, 1 g/L MgCl <sub>2</sub> anhidro, 3,6 g/L glucosa
<b>TAE 50X</b>	242 g/L Tris; 57,1 mL/L ácido acético concentrado; 200 mL/L EDTA 0,5M

**Tabla 4:** Soluciones para otros métodos

<b>Solución</b>	<b>Composición y características</b>
<b>PBS 10X</b>	(NaCl 1,3 M, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,07 M, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,03 M pH 7)
<b>Tampón de lisis de bacterias</b>	(Tris-HCl 50 mM pH 6,8, SDS 2%, glicerol 10%)
<b>Tampón de dilución/lavado nano-GFP</b>	10 mM Tris/Cl pH 7.5; 150 mM NaCl; 0.5 mM EDTA
<b>Tampón de transferencia</b>	Tris-HCl 48 mM pH 7,4, glicina 39 mM, metanol 20%
<b>TAE 10X</b>	Tris-Acetato 400 mM, EDTA 10 mM
<b>TBS 10X</b>	Tris-HCl 0,5 M pH 7,4, NaCl 1,5 M
<b>TTBS 0,1%</b>	TBS 1X, 0,1% Tween-20
<b>PFA 5X</b>	0.74 g de paraformaldehído en 4 mL de H <sub>2</sub> O bidestilada y 28 µl de KOH 1M. Se calienta 10 segundos en microondas y se agita.
<b>Solución de fijación 1 (cromosomas politénicos)</b>	500 µL PBS 10X, 50 µl Tritón X-100, 1 mL PFA 5X, 3.45 ml H <sub>2</sub> O bidestilada.
<b>Solución de fijación 2 (cromosomas politénicos)</b>	1.5 mL H <sub>2</sub> O bidestilada, 2.5 mL Ácido Acético glacial, 1 mL PFA 5X
<b>Solución lactoacética</b>	1 mL ácido láctico, 2 mL H <sub>2</sub> O bidestilada, 3 mL Ácido acético.

**Tabla 5:** Otros materiales y utensilios

<b>Material o utensilio</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Procedencia</b>
<b>Pinzas N°5 no magnéticas</b>	A. Dumont & Fils	Suiza
<b>Porta objetos 26x76mm 1mm de espesor.</b>	Delta Lab	Barcelona. España
<b>Placas plásticas de 96 pocillos</b>	Orange Scientific	Braine-Allaud. Bélgica
<b>Cubreobjetos 24x24mm.</b>	Marienfeld	Lauda-Königshofen, Alemania
<b>Esmalte de uñas transparente.</b>	Maybelline	New York. EEUU

## **Protocolos experimentales para *Drosophila***

### **Condiciones de crecimiento de animales**

A menos que se indique de otra forma, los animales utilizados en los experimentos se manejaron a 25°C, en viales plásticos con medio de cultivo sólido preparado con harina de trigo (50 g/L), levadura fresca (100 g/L), agar-agar (11 g/L), dextrosa monohidratada (80 g/L), ácido propiónico (6 mL/L) y Nipagin (1,56 g/L). A esta temperatura, el ciclo de vida de *D. melanogaster* dura alrededor de 10 días. El almacenamiento a largo plazo de las cepas se realizó a 17°C en las mismas condiciones.

### **Ensayos de sobrevida**

Para los experimentos de sobrevida, a partir de los cruces indicados en se separaron por sexo y se aislaron todas moscas adultas nacidas en un lapso menor a 48 horas. Se pusieron en viales separados de medio sólido indicado anteriormente, con al menos 40 animales. Los animales se cambiaron de vial cada dos días, contando y descartando los animales muertos.

### **Ensayos de pupación**

En estos experimentos, se ocuparon cámaras de puesta de huevos en medio de agar y levadura, en que los animales depositaban sus huevos en lapsos no mayores a 6 horas, en condiciones de oscuridad y a 25°C. A partir de 24 horas después de la puesta, se seleccionaron larvas en el estadio 1 ya eclosionadas del fenotipo correspondiente, y se agruparon en al menos 30 individuos para cada vial independiente. Se hicieron réplicas de al menos 3 viales por condición. Para los

experimentos de estrés térmico, en los viales se ocupó medio sólido común, descrito anteriormente. Para los experimentos de toxicidad química se ocupó medio Carolina Instant-Blue,4-24 suplementado con los agentes a testear.

## **Métodos de biología molecular**

### **Transformación Bacteriana**

Se agregó directamente a 50  $\mu$ L de bacterias quimiocompetentes descongeladas (*E. Coli* DH5 $\alpha$ ), resuspendidas en CaCl<sub>2</sub> (Winkler) 100 mM, 0,2 – 1  $\mu$ g del vector a transformar correspondiente. Se incubó 30 minutos en hielo y luego se realizó un shock térmico a 42°C durante 45 segundos. Las bacterias se recuperaron en medio LB a 37°C durante 60 minutos con agitación, luego se centrifugaron y plaquearon en agar Luria con antibiótico Ampicilina (Winkler). Se incubaron entre 12-16 horas a 37°C.

### **Extracción de ADN plasmidial**

Para la extracción de plásmidos se utilizó el sistema comercial E.Z.N.A. Plasmid Miniprep de Omega Bio-Tek (D6945), siguiendo el protocolo de los fabricantes.

### **Digestión con enzimas de restricción**

Para realizar digestiones enzimáticas se usaron 0,5-3  $\mu$ g de ADN plasmidial o genómico, 0,5-2  $\mu$ L de enzima(s) de restricción y la cantidad adecuada (10% del volumen total) de tampón correspondiente a la(s) enzima(s) en un volumen total

de 20-30  $\mu\text{L}$  completados con agua destilada. La reacción se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas. Luego, se confirmó la digestión mediante electroforesis de ADN en geles de agarosa.

#### **Clonamiento convencional por ligación utilizando ligasa T4**

Se digirieron 1  $\mu\text{g}$  de ADN (inserto o vector) con la combinación de enzimas de restricción correspondiente. Se purificaron los fragmentos tras su electroforesis en geles de agarosa. Los productos fueron mezclados en proporción 1:3 (vector:inserto) junto con ligasa T4 según las instrucciones del fabricante (New England BioLabs).

#### **Extracción de ARN y transcripción reversa**

Los tejidos a aislar se disectaron en PBS 1X, sobre hielo. Posteriormente se transfirieron a tubos *Eppendorf* de 1,7 mL en hielo, al que se le extrajo la solución PBS para ser reemplazado por 300  $\mu\text{L}$  de Trizol. El material resuspendido se homogenizó con puntas de polipropileno en hielo. El tubo con el homogenizado se sometió a centrifugación a 13000 rpm por 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante se mezcló con 60  $\mu\text{L}$  de cloroformo con posterior homogenización en *vortex* durante 30 segundos. La solución homogénea se centrifugó a 13000 rpm por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se extrajo cuidadosamente el sobrenadante transparente y se le añadió 60  $\mu\text{L}$  de isopropanol para incubarse a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. El tubo se centrifugó a 13000 rpm por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  para precipitar el ARNm, formando un precipitado blanco-transparente. Se extrajo el isopropanol para hacer un lavado del precipitado con 500  $\mu\text{L}$  de etanol 70%, se sometió a agitación fuerte y se

centrifugó a 13000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se extrajo el etanol y el precipitado se sometió a aireación por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se resuspendió en 30 µL de agua tratada con DEPC para luego medir concentración. Con la finalidad de medir integridad del ARN, se cargaron 500 ng de la muestra en gel de agarosa 1% en TAE, corrido por 20 minutos a 100V. Una muestra íntegra debe exhibir dos bandas definidas que corresponden a los ARN ribosomales.

Para las reacciones de transcripción reversa se utilizó el kit Improm® de Promega que se basa en utilizar partidores de oligos monohebra dT de ADN, transcribiendo sólo ARNm, siguiendo las indicaciones del fabricante.

### **qPCR**

Las reacciones de qPCR se realizaron a partir del ADNc diluído producto de la transcripción reversa mediante el uso del kit "Master mix SYBR-GREEN" provisto por *Stratagene*. Las amplificaciones y mediciones de fluorescencia de SYBR-GREEN se realizaron en el termociclador *StrataGene Mx3000p*. El programa para amplificar consistió en lo siguiente:

#### **1 ciclo:**

95°C, 10 minutos.

#### **Por 40 ciclos:**

95°C, 15 segundos.

60°C, 15 segundos.

72°C, 15 segundos.

#### **1 ciclo:**

72°C, 15 segundos.

**Tabla 6:** Partidores utilizados en los experimentos de qPCR.

Nombre	Fw Primer	Tm °C	Rv Primer	Tm °C	Amplificación (pb)
Actina42A	GCGTCGGTCAATTCAATCTT	60,8	AAGCTGCAACCTCTTCGTCA	60,0	138
DAxud1	AGGGGACCACCAGCCTAAC	62	GGTTCGCTCTGATTATCCTTGTG	61	85
hsp70Bb	TATCATAAGTTATTTAAGCAG	61	TTTATACTCCGGCGCTCTTTTC	60,5	156
hsp70Bbb	AATTGAGACCGCTGGAGGTG	60,03	GACAGATCGAAAGGTGCCCAA	60,03	180
hsp70Bc	AAGAACCTCAAGGGTGAGCG	59,96	CGAACAGAGATCCCTCGTCG	59,97	97
hsp27	ATGCCACGATCTGTTCCATC	62,2	GTACGGCGAATAACGACGAC	60,9	80
hsp67	GACTCCCGGACTCCATGTA	62,3	GACCCAGGGTGTGCAAATCAA	62,9	106

### **Inmunofluorescencia de cromosomas politénicos**

El protocolo se basó en el publicado por Johansen y colaboradores (2009). Se tomaron larvas en estadio tres, 96 +/- 6 horas post-puesta para disectar glándulas salivares. En cada ronda se extrajeron como máximo cinco pares de glándulas y se les retiró todo el tejido graso, en PBS 1X.

Posteriormente, se fijaron en una gota de solución de fijación 1 (Tabla 4) durante un minuto, luego se transfirieron a la solución de fijación 2 (Tabla 4) por dos minutos. Las glándulas se transfirieron a una gota de solución Lacto-Acética en un cubreobjeto tratado con SigmaCote® y luego se le dio vuelta hacia un portaobjeto con superficie de poli-Lisina. Con una goma de borrar, por el borde, se movió levemente el cubreobjetos, con movimiento circular hasta notar que las glándulas se deshicieron. Los portaobjetos se revisaron en un microscopio de campo claro, con aumento 40X para observar que los núcleos se rompieron y los cromosomas estaban dispersos, sin grandes roturas. Una vez visto eso, el

portaobjetos se envolvió con un papel filtro y se presionó con el dedo pulgar sobre el cubreobjetos con fuerza. Inmediatamente se desenvolvió y se bañó en nitrógeno líquido por diez segundos. Luego, con una hoja fina de bisturí o *gillette* se retiró rápidamente el cubreobjetos.

Todos los portaobjetos tratados posteriormente se reposaron en PBS 1X por media hora. Pasado ese tiempo se retiraron y con papel absorbente, por capilaridad se retiró el exceso de PBS 1X, para luego poner 40  $\mu$ l de PBS 1X con BSA 2% (solución de bloqueo), y sobre esta gota se posó una lámina de *parafilm* de similares dimensiones que el cubreobjetos, para dispersar la solución de bloqueo. Se incubó a temperatura ambiente y en una cámara húmeda por una hora para retirar la solución. Posteriormente se pusieron 40  $\mu$ l de solución PBS 1X- BSA 2% con anticuerpos (1:250 para anti GFP, 1:1000 para anti Pol Ilo) y se dejó 16 horas en una cámara húmeda a 4°C.

Pasado ese tiempo los cubreobjetos se lavaron tres veces por diez minutos cada evento en PBS Tritón x-100 0,3 %. Y luego, utilizando el mismo procedimiento para el bloqueo y la incubación de anticuerpos primarios, se incubaron en una cámara húmeda los anticuerpos secundarios (dilución 1:250) por dos horas. Los portaobjetos se lavaron nuevamente tres veces por diez minutos cada vez en PBS Tritón x-100 0,3 %, y en el segundo lavado se añadió la tinción DAPI diluida 1:15000 (diez minutos) y se limpió en el último lavado. Las muestras se sellaron con cubreobjetos sin tratar con SigmaCote®, cubiertas con VectaShield® y selladas con esmalte. Se guardaron a 4°C hasta su análisis en

microscopio confocal. El tiempo máximo de guardado sin disminución en la fluorescencia es de alrededor de tres semanas.

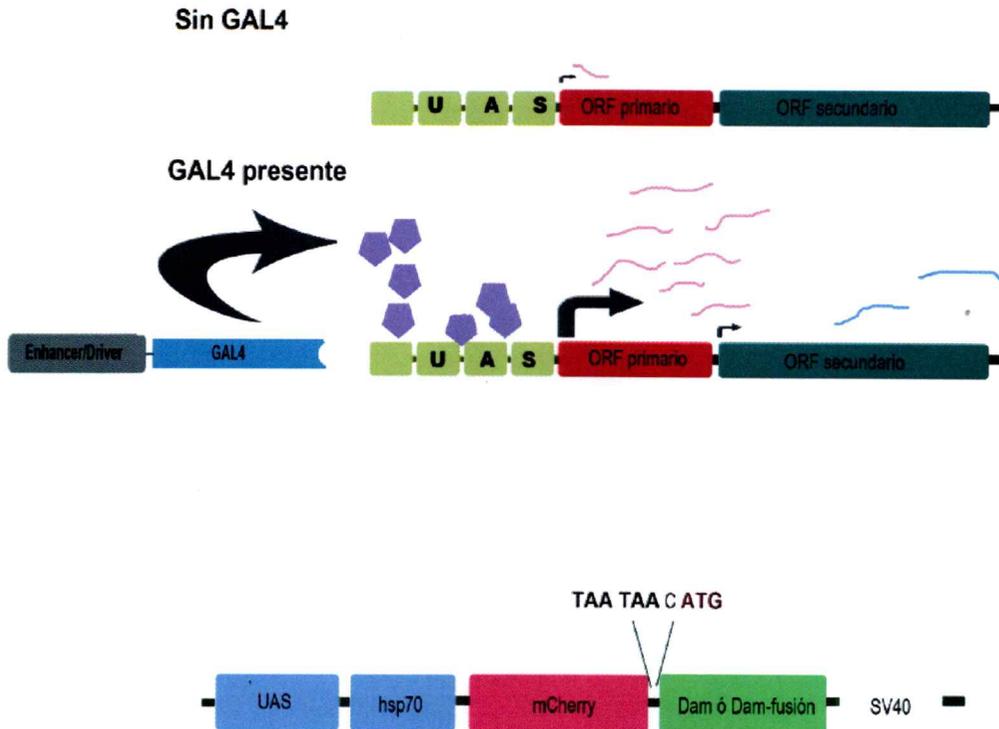
### **DamID (TaDa-Seq)**

La técnica consiste en utilizar un constructo Dam::DAXud1, Dam es una proteína que metila en la secuencia GATC, específicamente en la posición N<sup>6</sup> de la Adenina. El ADN genómico se extrae y se digiere con la enzima DpnI, que sólo corta en secuencias GATC metiladas. La ocurrencia de la secuencia GATC va desde 500-1000 pares de bases en el genoma de *Drosophila* (Van Steensen & Henikoff, 2000; Southall y cols., 2013). Esos fragmentos se aislaron, amplificaron y sonicaron, para su posterior secuenciación mediante el equipo Illumina HiSeq-2500. Los datos de la secuenciación fueron analizados mediante métodos computacionales.

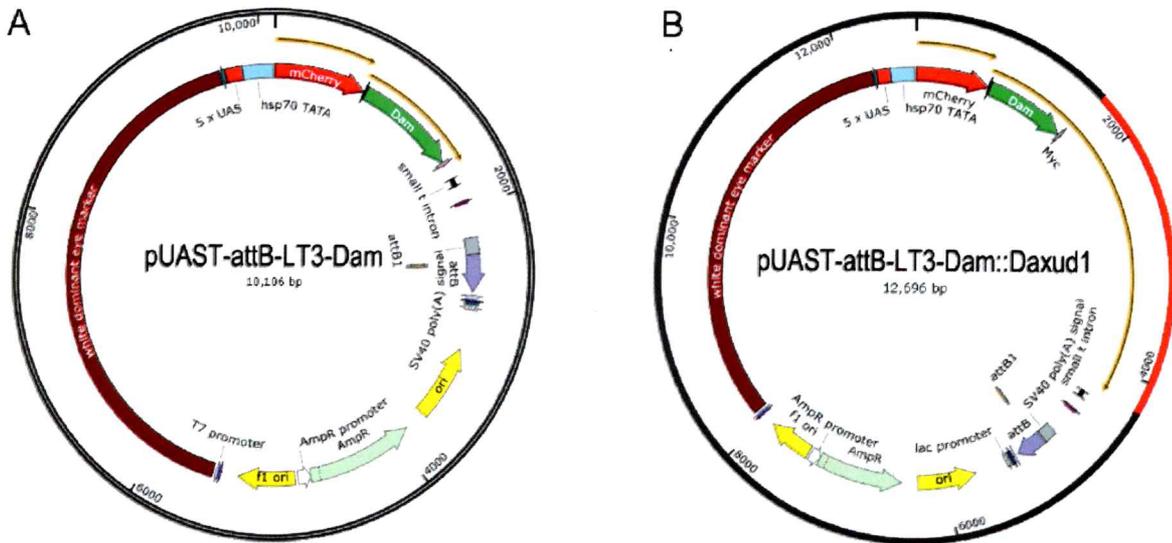
Utilizar un constructo UAS-Dam o UAS-Dam::DAXud1 es tóxico (debido al exceso de metilación en el genoma), por lo que se utilizó una modificación del protocolo original (TaDa system; Southall y cols., 2013), que consiste en expresar un constructo UAS bicistrónico. El primer marco de lectura expresa la proteína mCherry (permite identificar tejidos en los que se expresa) cuya traducción es en alto nivel. El segundo marco de lectura empieza con el codón ATG después de un nucleótido desde el codón de término de la secuencia codificante de mCherry, ya que en ese contexto el ribosoma puede reiniciar la traducción sobre el codón ATG en una probabilidad de 5% por evento (Luukkonen y cols., 1995), logrando una baja expresión de Dam y Dam::DAXud1 (según el constructo) en el tejido, esa baja expresión es suficiente para que metile en el genoma sin llegar a ser tóxico.

La generación de los transgénicos se realizó inyectando el plásmido pUAST-attB-LT3-Dam para la generación de moscas UAS-mCherry.Dam. Para la generación de las moscas UAS-mCherry.Dam::DAXud1 se utilizó el mismo plásmido pUAST-attB-LT3 sobre el cual se insertó el fragmento que codifica para DAXud1.





**Figura 6: Sistema TaDa de expresión de constructos Dam, basado en el sistema Gal4-UAS y el fenómeno de reiniciación de la traducción.** En la parte superior se ilustra el constructo en un contexto sin Gal4, contrastado con uno con Gal4 presente, en que se muestra que el marco de lectura secundario se traduce. En la ilustración inferior se muestra el contexto nucleotídico del constructo LT3 en que se basa el sistema TADA, en que al término de la traducción del primer marco de lectura, dado por dos codones de término, le sigue un nucleótido y luego un codón de inicio ATG, contexto necesario para tener una eficiencia de reiniciación de traducción de un 5% (Adaptado de Luukkonen y cols., 1995; Southall y cols., 2013).



**Figura 7: Plásmidos utilizados para generar los transgénicos en el experimento de Dam-ID/TAda-Seq.** En A se ilustra el plásmido utilizado para generar el transgénico UAS-mCherry.Dam. En B se ilustra el plásmido utilizado para generar los animales UAS-mCherry.Dam::DAXud1, en que se marca con rojo el fragmento de DAXud1 insertado para realizar la fusión con Dam. Los marcos de lectura se ilustran en flechas naranja con negro, sobre los diagramas de los elementos, todo ubicado hacia el interior del mapa con las bases.

El fragmento clonado provino del plásmido pUAST-DAxud1::GFP, cuya generación está descrita en el artículo de Glavic y cols. (2009). Los partidores utilizados fueron:

NotI-C-pUAST-DAxudGFP-Fw

5'-ACCAGCGGCCGCGATCTAGGGACCTCGACACGGATAGCATGT-3' (Sitio NotI y una base C para quedar en marco de lectura con DAM y hacer la fusión).

XbaI-pUAST-DAxudGFP-Rv

5'-ATATGGTCTAGATTATTAACCGGTGGATCCCGGGCCCGCGGGGAGG-3' el cual fue diseñado para amplificar sólo el ORF de DAxud1, sin GFP y con codones en fase.

La amplificación fue realizada con Polimerasa *PFU*, clonada en vector TOPO, cuyos clones fueron secuenciados (Macrogen, Corea del sur) para comprobar la identidad con la secuencia de DAxud1. Una vez confirmada la correcta clonación, se procedió a realizar la inserción en pUAST-attB-LT3-Dam para originar el vector pUAST-attB-LT3-Dam::DAxud1 utilizando los sitios NotI y XbaI. El plásmido base fue donado por el laboratorio de Andrea Brand (Univesidad de Cambridge, Gran Bretaña) y su mapa se ilustra en la Figura 7.

La inserción fue confirmada con digestión enzimática, para después realizar las inyecciones de generación de transgénicos sobre huevos de animales con sitio attP2 en el cromosoma III (stock Bloomington 8622, genotipo P{y[+t7.7]=CaryP}attP2) y utilizando el plásmido pBS130 (código Addgene), que codifica para la integrasa *phi-131*, necesaria para la inserción del plásmido en el

sitio attP2. De los transgénicos resultantes se realizaron cruces para generar homocigotos, en base al color de ojos por el fenotipo del gen *white*, variando la intensidad del rojo del ojo dependiendo si es heterocigoto u homocigoto, siendo más rojo para las moscas positivas homocigotas. Para los experimentos, de la línea homocigota resultante se tomaron los machos para aparearlos con moscas vírgenes *nub>Gal4* (localizado en el cromosoma X).

El experimento consistió en dos condiciones para el análisis de la ocupancia de Dam::Daxud1: Control (moscas que expresan sólo la proteína Dam, *nub>Gal4*; UAS-Dam) y la condición experimental (moscas que expresan el constructo Dam::Daxud1, *nub>Gal4*; UAS-Dam::Daxud1). Cada condición se analizó con 3 réplicas biológicas, de las cuales se requirieron 200 discos imaginales de ala por experimento.

### **Extracción y amplificación de ADN genómico**

Se hicieron réplicas biológicas, consistiendo en cruces vírgenes *nub>Gal4* x UAS::Dam (3 cruces) y vírgenes *nub>Gal4* x UAS-Dam::Daxud1 (3 cruces), para extraer discos imaginales. Para obtener una mayor expresión de Gal4, se extrajeron discos sólo de machos, debido a que la inserción de Gal4 en *nub* (*nub>Gal4*) está en el cromosoma X. Esto es porque las diferencias de expresión de genes del cromosoma X entre machos y hembras difieren, siendo incluso 1.5 veces mayor en machos, fenómeno llamado compensación de dosis (Baker y cols., 1983). Cada cruce se dejó 12 horas, a 25°C, depositando sus huevos en el medio y posteriormente se retiraron las moscas para poner los huevos a 17°C durante 8 días, al octavo día se dejó crecer a las larvas que estaban llegando al

estadio, a 29°C, durante 24 horas, favoreciendo la expresión del constructo. Al cumplirse ese ciclo, las larvas se disectaron para extraer discos imaginales, los que una vez extraídos, se almacenaron a temperatura de -80°C.

El material genético de los discos se aisló con el kit "Qiagen ADNeasy Blood & Tissue", del cual se extrajo un mínimo de 2 µg totales por muestra (total 6 muestras). Ese ADN se precipitó y precipitado de ADN se disolvió en 50 µL de la siguiente mezcla:

43,5 µL de Agua DEPC  
5 µL Buffer 10X  
1,5 µL de Solución de Enzima DpnI

La digestión se incubó a 37°C por 16 horas, pasado eso, se añadieron 0,5 µL a la solución para ser incubada 60 minutos. Posteriormente la enzima se inactivó a 65°C por 20 minutos. La solución se limpia con el kit "PCR clean" de Qiagen, y la elusión se realizó con 32 µL de agua DEPC. De ese volumen se guardaron 17 µL y el siguiente paso se llevó a cabo con 15 µL.

Ese volumen con ADN digerido se mezcló con 5 µL de solución de ligación (total 20 µL):

Mezcla de ligación de adaptadores:

2,0 µL de buffer de ligación 10X µL (NEB)  
0,8 µL de adaptadores nucleotídicos de doble hebra (AdRt + AdRb)  
1,2 µL Agua DEPC  
1,0 µL solución de Ligasa T4 (NEB)

La ligación se incubó a temperatura ambiente por 2 horas. Posteriormente la ligasa se inactivó incubando a 65°C por 10 minutos.

Los 20 µL de esa mezcla de ligación se mezclaron con la siguiente solución para digerir con DpnII (total 40 µL).

Mezcla de digestión DpnII:

4,0 µL de buffer DpnII 10X

1,0 µL Solución de enzima DpnII

15,0 µL Agua DEPC

La solución se dejó incubando a 37°C por 16 horas.

Amplificación por PCR:

La mezcla de 40 µL se combinó con la de PCR (120 µL), dando un total de 160 µL:

Mezcla para PCR

16 µL de buffer PCR Reaction mix, 10X (Clontech)

2,5 µL partidor AdR-PCR (Concentración del stock 50 µL)

3,2 µL de mezcla dNTPs (10 mM cada uno)

2 µL de solución de polimerasa "Advantage HD", de clontech

96,3 µL Agua DEPC

La mezcla de 160 µL se repartió en tubos PCR, con 40 µL cada uno y la reacción de PCR se realizó con la siguiente configuración de ciclos:

Pre-PCR 1

68°C por 10 minutos

94°C por 30 segundos

65°C por 5 minutos

68°C por 15 minutos

Pre-PCR 2 (3 ciclos):

94°C por 30 segundos

65°C por 1 minuto

68°C por 10 minutos

PCR (17 ciclos)

94°C por 30 segundos

65°C por 1 minuto

68°C por 2 minutos

Al terminar se puede dejar a 4°C

Concluida la reacción, se tomaron 3 µL de cada tubo y se analizaron en gel de agarosa 1% (corrida 30 minutos, 95V). El gel se tiñó con Bromuro de Etidio y se analizó en el trans-iluminador. Se debe ver una marca dispersa entre 500-2000 pares de bases.

El volumen de cada tubo se mezcló para tener 150 µL de ADN amplificado. Esa mezcla se limpió utilizando el kit "PCR clean" de Qiagen. Esos 150 µL se mezclaron con 750 µL de buffer PB para luego pasarlas por la columna y lavar (detalles en el kit). La elusión se realizó con 32 µL de agua DEPC, esa cantidad se diluyó a 100 µL de modo que se obtengan 2 µg dentro de ese volumen.

Finalmente, antes de los pasos de la secuenciación se realizó una última digestión con la enzima Sau3AI (adicionando 11,1 µL de buffer 10X de la enzima y

1  $\mu$ L de la solución con la enzima) por 16 horas. Después de la incubación la enzima se inactivó a 65°C por 20 minutos.

### Preparación de librerías para secuenciación en Illumina

El protocolo de librerías fue el indicado en el kit Illumina Truseq-LT.

### Análisis de datos de DamID-seq

La máquina Illumina Hiseq 2500 arroja datos en formato y extensión .fastQC, que es un archivo de texto que tiene información de todas las secuencias y de la calidad de cada base secuenciada, lo que permite hacer filtros a partir de la calidad. La calidad está en puntajes Q, cuyo rango va en deciles (Tabla 7).

**Tabla 7:** Deciles de puntaje de calidad en datos brutos de secuenciaciones masivas.

Puntaje de calidad Phred(Q)	Probabilidad que sea una base correcta
10	90%
20	99%
30	99,9%
40	99,99%
50	99,999%

A partir de ello se seleccionaron secuencias con un largo de lecturas de 50 bases y con  $>Q30$ , a su vez, y en el mismo paso, se generaron los archivos de las secuenciaciones pareadas. Este paso fue realizado con el software *Trimmomatic* (Indicaciones en Bolger y cols., 2014).

La información del paso anterior se generó en archivos de texto .fil. Lo siguiente fue realizar el mapeo de las lecturas al genoma de *Drosophila*. Para ello se utilizaron los *softwares* *Bowtie2* (Langmead & Salzberg, 2012) y *Samtools* (Li y

cols., 2009) de acuerdo a las indicaciones dadas por los programadores. Las lecturas se alinearon al genoma de *Drosophila* (*dm3*, 2006, r5.57. [ftp://ftp.flybase.net/genomes/dmel/dmel\\_r5.57\\_FB2014\\_03/](ftp://ftp.flybase.net/genomes/dmel/dmel_r5.57_FB2014_03/)). Ello dio origen a archivos de extensión .BAM, que tienen toda la información de alineamiento, la cual puede ser visualizada con el software IGV (Integrative Genomics Viewer, <https://www.broadinstitute.org/igv>) o ser convertida a otros formatos para análisis posteriores.

Antes de hacer los test estadísticos en que se compara la señal del Control (Dam) versus Dam::DAXud1, los datos se trataron con un *script* escrito en Perl, desarrollado por Owen y colaboradores, 2015 (disponible en [http://owenjm.github.io/damidseq\\_pipeline/](http://owenjm.github.io/damidseq_pipeline/)), el cual filtra la señal de las zonas con secuencias GATC para disminuirlas. Este proceso se realiza porque la proteína Dam tiende a tener contacto con el ADN en zonas de activa transcripción o en Eucromatina (Owen y cols., 2015) debido a que deja mayor accesibilidad a proteínas nucleares, dando origen a falsos negativos en el caso que se trate de una proteína que active la transcripción. Una vez que el software realiza el filtro, inmediatamente subtrae las señales de Dam a Dam::DAXud1. La substracción se realiza fraccionando el genoma en "ventanas" de 20 nucleótidos, en los que el software evalúa abundancia de lecturas alineadas, asignando un puntaje basado en cuantas veces una señal se opone a la otra, información que se arroja en formato *.bedgraph*, visible con el programa IGV ya mencionado.

Los *loci* en que hay diferencias significativas se identificaron con el *software* "FindPeaks" que realiza test estadísticos para determinar señales significativas en

base a intensidad, extensión y posibilidad aleatoriedad (Wolfram y cols., 2012). Se estableció en 0.05 el valor p de corte y 0.01 FDR (False Discovery Ratio) para identificar un *peak* significativo para dar cuenta de zonas enriquecidas. El formato generado por *Findpeaks* fue .gff, el cual tiene la información de los *peaks* de cada coordenada en el genoma, brazo cromosómico y valores estadísticos.

### **Anotación de *peaks***

Se utilizó el *software* HOMER (Heinz y cols., 2010), escrito y ejecutable en Perl. Se utilizó la información de las coordenadas e información de todos los transcritos anotados en *Drosophila melanogaster* en la versión r5.57 (archivo .gff), la cual se cruzó con el archivo de coordenadas de los *peaks* (.gff) originado por el *software* *FindPeaks*. El proceso arroja una lista de todos los genes, así como otra lista de categorías de *Gene Ontology*, todo el formato .txt (texto delimitado por tabulaciones), que se ordenó con el programa organizador de planillas Microsoft Excel.

### **Extracción de secuencias de cada región enriquecida**

Se utilizó la información del genoma completo, versión r5.57, que está en formato FASTA, con las coordenadas de cada nucleótido. Esta información fue cruzada con datos de los *peaks* en archivos de genoma anotado .gff, utilizando la herramienta *Bedtools* utilizando el comando -getfasta. El archivo resultante fue un archivo *multifasta*, con las secuencias de cada *peak*.

## **Perfiles metagenómicos**

Los perfiles metagenómicos, que son perfiles para visualizar patrones de posicionamiento de DAXud1 alrededor de todos los genes, se desarrollaron a partir de archivos de *peaks* significativos y no significativos. En ambos casos, se tomaron las regiones de todos los genes desde -1kb antes del inicio de la transcripción, el cuerpo del gen, y +1 kb después del término de la transcripción. Esta información se construyó utilizando el instructivo de la herramienta bioinformática *Deeptools*, disponible en la dirección <https://github.com/fidelram/deepTools/wiki/Visualizations>, en la cual se encuentra el código fuente para su utilización y las instrucciones de los comandos pertinentes para cada información de coordenadas que se necesite para construir los gráficos. Esta herramienta fue desarrollada por Ramírez y colaboradores (2016).

## **Secuencias consenso**

El archivo *multifasta* generado en el paso de extracción de secuencias fue utilizado para alineamientos múltiples, en búsqueda de secuencias consenso. Esto fue realizado con la herramienta disponible en internet DREME (<http://meme-suite.org>).

## RESULTADOS

---

Los primeros estudios sobre homólogos de DAXud1, realizados en humanos (Ishiguro y cols., 2001) y en *Drosophila* (Glavic y cols., 2009), indicaban que esta proteína correspondía a un supresor de tumores, promoviendo el arresto del ciclo celular en la etapa G2/M. Este rol sería ejercido por medio de su putativa capacidad de regulador transcripcional (Gingras y cols., 2007). No obstante, hasta el momento no se ha definido un rol fisiológico para DAXud1, que integre las evidencias que sugieren que es un regulador transcripcional y que involucren genes blanco mediante los cuales ejerce sus funciones en la fisiología celular. Para abordar esta problemática a nivel del organismo y obtener claves respecto de la función de esta proteína se realizaron análisis a nivel proteómico y transcriptómico.

En las aproximaciones proteómicas, se realizaron estudios por espectrometría de masa de las proteínas que co-precipitan con DAXud1 para identificar factores que interactúan físicamente con DAXud1 (Anexo3), información útil para sugerir relaciones moleculares de la proteína en estudio en procesos mecanísticamente ya definidos. Por otra parte, los análisis transcripcionales se realizaron mediante experimentos de secuenciación masiva de ARN-seq (Anexo 1), que dieron información sobre los cambios de expresión globales de ARNm al inducir la ganancia de función de DAXud1. Ambos estudios se realizaron en disco imaginal de ala, tejido con actividad mitótica y precursor del ala adulta, en que se pueden estudiar procesos como división celular, apoptosis, fenómenos de

adhesión y diferenciación (Aldaz & Escudero, 2010; Jennings y cols., 2011) y que es el tejido en el que se realizaron los análisis de función de DAXud1 previamente (Glavic y cols., 2009).

La búsqueda de interacciones físicas de DAXud1 con otras proteínas dieron como resultado una posible interacción directa con el factor de transcripción Caudal (ANEXO 1, Figuras S1 y S2, Tabla S1). Esta interacción además es genética, ya que el fenotipo de ganancia de función de DAXud1 es revertido al co-expresarse un ARN interferente de Caudal (Figura S3), pudiendo tratarse de una interacción cooperativa entre ambas proteínas en un contexto de desarrollo y organización de tejidos.

El análisis de ARN-seq de la condición de ganancia de función de DAXud1 detectó sobreexpresión de genes relacionados con respuesta a estrés generalizado. Estos genes pertenecían a la categoría de peptidasas y en la ruta síntesis de quitina (ANEXO 2, Figura S7, Tablas S3 y S5), grupos de genes que aumentan su expresión durante estrés generalizado (Contrino y cols., 2011; Kuraishi y cols., 2011; De Oliveira y cols., 2013). También se detectó una significativa sobreexpresión de *hsp70*, indicando que DAXud1 estaría implicado con la respuesta a estrés favoreciendo la expresión de este gen, por lo que los experimentos se orientaron en primer término a testear la importancia de DAXud1 en la respuesta a aumentos de temperatura. Esta condición se eligió como modelo experimental de estrés celular ya que es fácil de inducir y las fluctuaciones de ARNm de genes *hsps* son detectables a los 15 minutos (Sorger y cols., 1991; Richter y cols., 2010). De este modo, se diseñaron experimentos para establecer que DAXud1 actúa

como un regulador transcripcional de la respuesta a estrés mediante su interacción con regiones específicas de la cromatina y de este modo modula la tolerancia al estrés térmico.

**Objetivo específico 1:** Evaluar si DAxud1 es necesario para la tolerancia a estrés térmico

### **Vinculación de DAxud1 a la respuesta de estrés térmico**

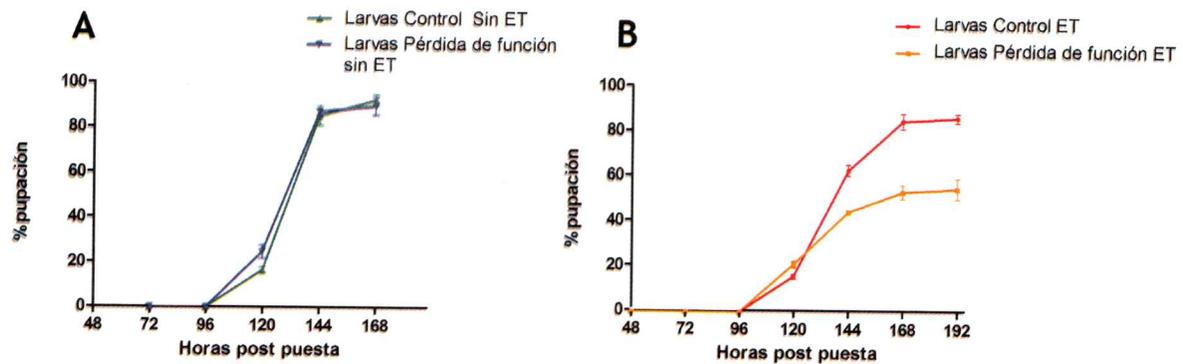
Para responder la interrogante de si DAxud1 es requerido en la respuesta a estrés térmico, se realizaron experimentos para investigar la tolerancia a este tipo de estrés en condiciones de pérdida de función de DAxud1 en el animal completo. Esto se realizó expresando mediante el sistema Gal4-UAS un ARN interferente contra el mensajero de DAxud1 en todos los tejidos del animal en desarrollo. Los animales control fueron de genotipo Tub-Gal4/+, que sólo expresan el factor de transcripción Gal4 de manera ubicua. Los animales con pérdida de función de DAxud1 fueron de genotipo UAS-IRDAxud1/+;Tub-Gal4/+, lo que permite expresar el RNA interferente de forma generalizada. Previamente, mediante qPCR se analizó la eficiencia de silenciamiento del constructo utilizado, la que alcanzó niveles de transcrito en >50%. Este nivel de interferencia no generó fenotipos durante el desarrollo o identificables en el animal adulto (Figura S14).

En primer lugar se observó que los animales Tub-Gal4/+ y UAS-IRDAxud1/+;TubGal4/+ crecidos a 29°C y sin exposición a estrés no presentaron diferencias en el porcentaje ni tiempo de pupación.

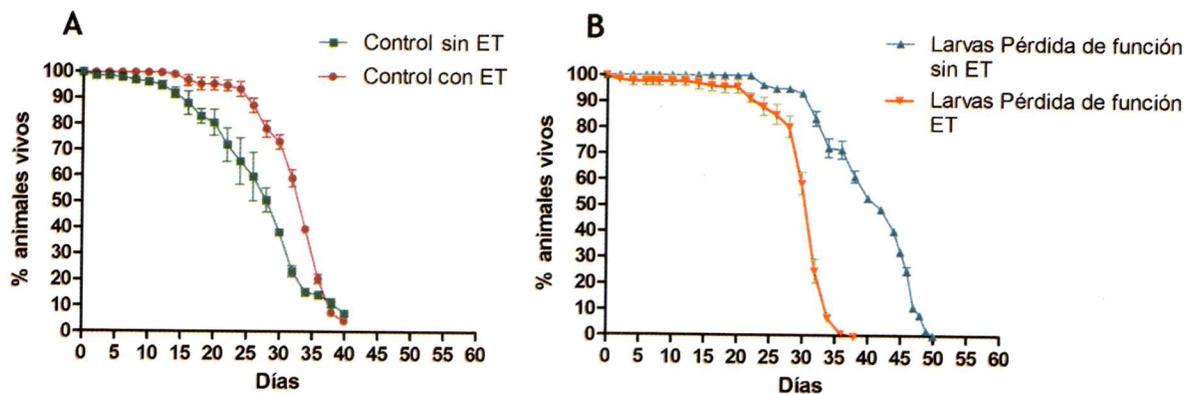
La tolerancia a estrés térmico se probó exponiendo las larvas control y experimentales a tres eventos de estrés térmico agudo durante su desarrollo que consistieron en exposiciones a 37°C durante 1 hora a las 24, 48 y 96 hrs. post puesta del embrión. Este procedimiento se realizó con 3 grupos de 40 larvas para cada condición, con al análisis de estos animales se calculó el porcentaje de pupación a partir del número inicial de larvas a través del tiempo.

Al exponer a ambos grupos a condiciones de estrés térmico, los animales con pérdida de función de DAXud1 tuvieron un menor porcentaje de pupación y sin un aparente retraso en el proceso (Figura 8B). Así, DAXud1 parece favorecer la tolerancia a estrés térmico agudo. Se observó un resultado similar, aunque en menor magnitud, al crecer las larvas en condiciones de estrés oxidativo mediante un medio de crecimiento comercial (Carolina Instant Blue 4-24), suplementado con 0.5% de Peróxido de Hidrógeno (Figura S22).

Lo siguiente fue estudiar la sobrevida de animales adultos con y sin pérdida de función de DAXud1, frente a condiciones normales y de estrés térmico diario mediante pulsos de 2 horas a 37°C. En la Figura 9, se puede apreciar que al exponer a los animales Control a estrés térmico diario tuvieron un incremento en la sobrevida (Figura 9A), mientras que los grupos con pérdida de función de DAXud1 disminuyeron drásticamente la suya (Figura 9B), siendo más sensibles a este tratamiento, posiblemente por una menor capacidad de respuesta al estrés.



**Figura 8: Larvas con pérdida de función de DAXud1 muestran susceptibilidad al estrés térmico (ET).** **A)** Se grafican los tiempos de pupación para larvas control (+/+; TubGal4/+) y con pérdida de función de DAXud1 (UAS-IRDaxud1/+; Tub-Gal4/+) en condiciones no estresantes (29°C). **B)** Se grafican los tiempos de pupación de larvas expuestas a estrés térmico (exposición 37°C durante 1 hora, a 24, 48 y 96 horas post-puesta de embriones, condición "ET"). Tres grupos por condición, de 40 embriones, de los que se calculó el porcentaje de pupación.

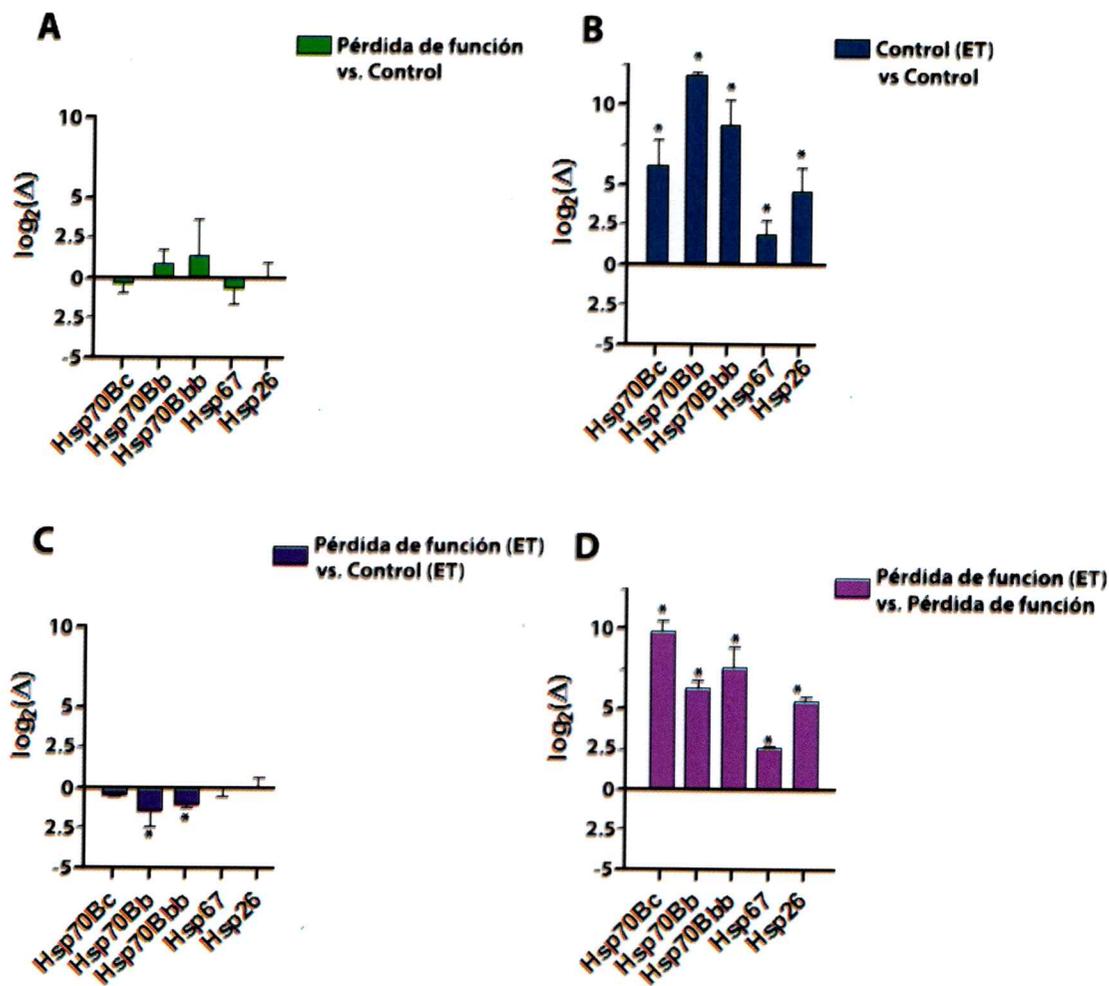


**Figura 9: Adultos con pérdida de función de DAXud1 presentan menor sobrevivencia frente a exposición continua a estrés térmico (ET).** **A)** Curvas de sobrevivencia para animales Control (genotipo +/+; TubGal4/+), con y sin ET. **B)** Curvas de sobrevivencia para animales con pérdida de función de DAXud1 (genotipo UAS-IRDaxud1/+; Tub-Gal4/+), con y sin ET. Se colectaron animales eclosionados en un lapso de 24 horas, en 3 grupos de 70 individuos por cada condición, con conteos de animales vivos y muertos para cada grupo. El estrés térmico (ET) consistió en exponer a los animales a pulsos diarios por dos horas a 37°C.

Una posibilidad para explicar la susceptibilidad de los animales a la disminución de la expresión de DAXud1, es que estos presenten menor transcripción de los genes *hsp*, cuyas proteínas codificadas son esenciales para la tolerancia a estrés térmico y oxidativo (Kregel y cols., 2002). Esto se corresponde con el incremento en la expresión de genes de respuesta a estrés identificado en el estudio transcriptómico de la condición de ganancia de función de DAXud1. A partir de este supuesto se investigó si DAXud1 es requerido para la expresión de genes *hsp70* (parálogos *hsp70Bb*, *hsp70Bbb* y *hsp70Bc*), de *hsp67* y *hsp26*, tanto en condiciones control como durante estrés térmico. La Figura 10 grafica los resultados obtenidos por qPCR, a partir de ARNm extraído de larvas Control y con pérdida de función de DAXud1, sometidas a estrés térmico agudo. Se presentan las razones de cambio de expresión de genes *hsp* a partir de diferentes comparaciones. Comparando la condición de pérdida de función vs. Control, sin estrés, se observa que los niveles de mensajero de los *hsps* no varían a partir de la pérdida de función de DAXud1 (Figura 10A).

Por otra parte y de acuerdo con los antecedentes encontrados en literatura (Hightower y cols., 1991; Mayer y cols., 2005), los niveles de todos los genes *hsp* testeados aumentaron su expresión en decenas de veces en las larvas control sometidas a estrés térmico agudo (ET: 37°C por 20 minutos; Figura 10B). Ahora, si comparamos los niveles de estos ARNm entre la condición de pérdida de función vs. Control (Figura 10C), en la misma condición de estrés del experimento de la Figura 10B, observamos que los niveles de expresión de tres genes *hsp70* testeados son menores. Esto muestra que en la condición de pérdida de función

de DAXud1 hay una menor inducción de genes *hsp* que en los animales Control. Esta diferencia es particularmente notoria y significativa para los parálogos *hsp70Bb* y *hsp70Bbb*, mientras que se observa una tendencia a menor expresión en los otros genes analizados.



**Figura 10: Razones de cambio de expresión de ARNm por qPCR de genes *hsp* durante estrés térmico y pérdida de función de DAXud1.** El término "ET" significa "Estrés Térmico", indicando que en esa condición se expusieron larvas en tercer estadio a 37°C por 30 minutos, cuyo ARN fue aislado inmediatamente al cumplirse ese tiempo. Se utilizaron grupos con los mismos genotipos que los experimentos de pupación. **A)** Corresponde a los cambios de genes *hsp* al comparar la condición de pérdida de función versus animales control, sin estrés térmico; **B)** Grafica los cambios de genes *hsp* en animales control, pero comparando condición de estrés térmico (ET) versus condiciones normales; **C)** Es una comparación de pérdida de función versus animales control, ambos en condiciones de estrés térmico, pudiendo comparar si hay diferencias en la respuesta transcripcional; **D)** Es la comparación de pérdida de función con estrés térmico versus animales control en condiciones normales. Se definen condiciones normales 29°C. Significancia valor  $p < 0.05$ , test  $t$  a partir de valores  $2^{-Ct}$  según método de Livak y cols., (2001).

**Objetivo específico 2:** Establecer si DAXud1 es un componente de la cromatina y si se localiza en *loci* vinculados a respuesta a estrés

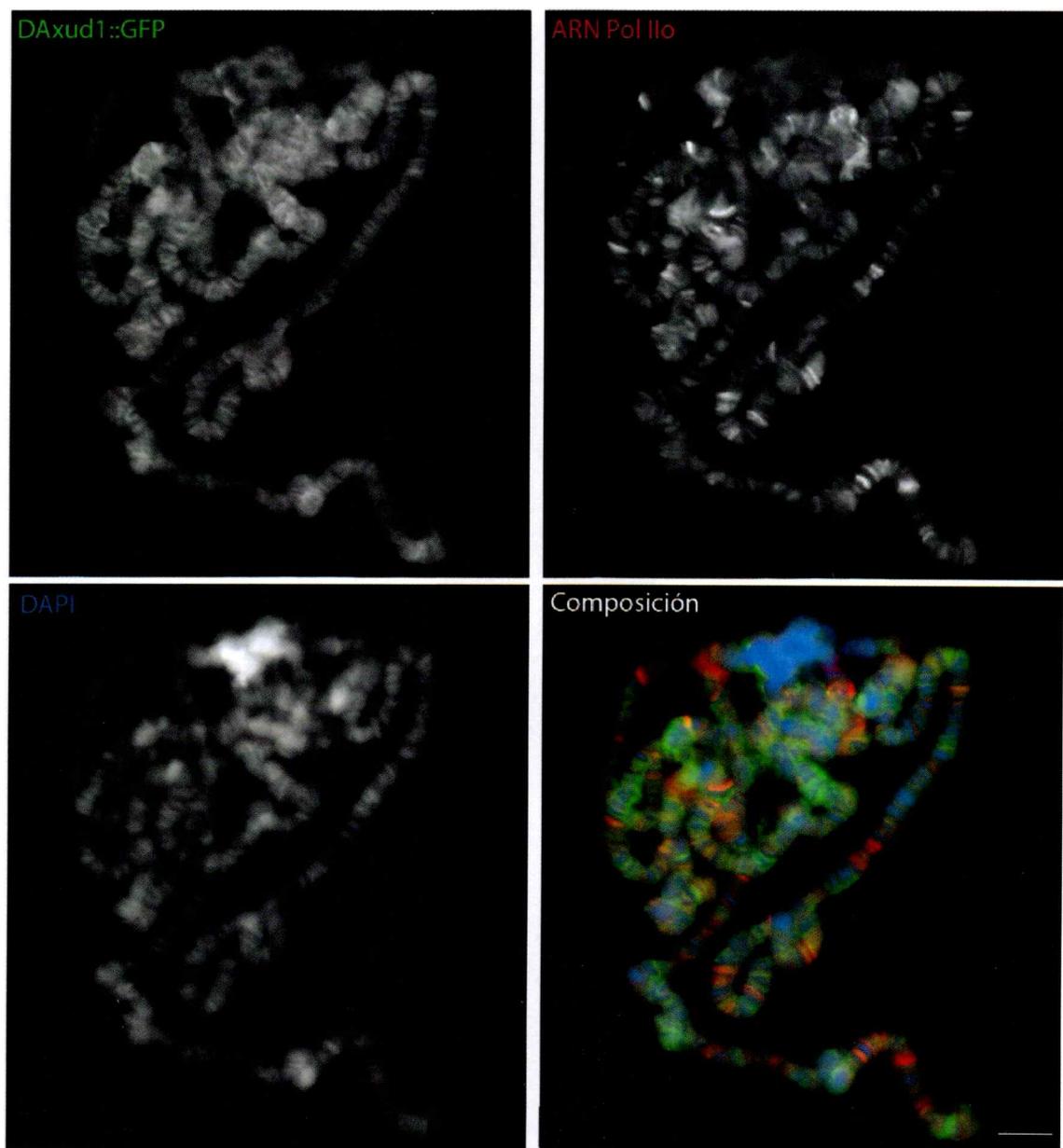
### **Localización de DAXud1 en la cromatina**

Los animales con pérdida de función de DAXud1 son termosensibles, posiblemente por un menor aumento en la expresión de los genes *hsp70* durante el estrés térmico. Por lo que DAXud1 sería necesario para promover la transcripción de estos genes, a partir de su posible rol como regulador transcripcional (Gingras y cols., 2007). Para comprobar si DAXud1 tiene esta propiedad de regulador transcripcional, se quiso evaluar, mediante inmunofluorescencias contra una proteína de fusión DAXud1-GFP en cromosomas politénicos de larvas de *Drosophila*, si DAXud1 co-distribuye con la cromatina. Los más grandes cromosomas politénicos se encuentran en núcleos de glándulas salivares y se generan producto de endo-replicación del material genético (Zhimulev y cols., 2004). En términos prácticos esto significa que estos cromosomas pueden ser visibles con microscopios convencionales desde 10X de aumento y con contraste de fases.

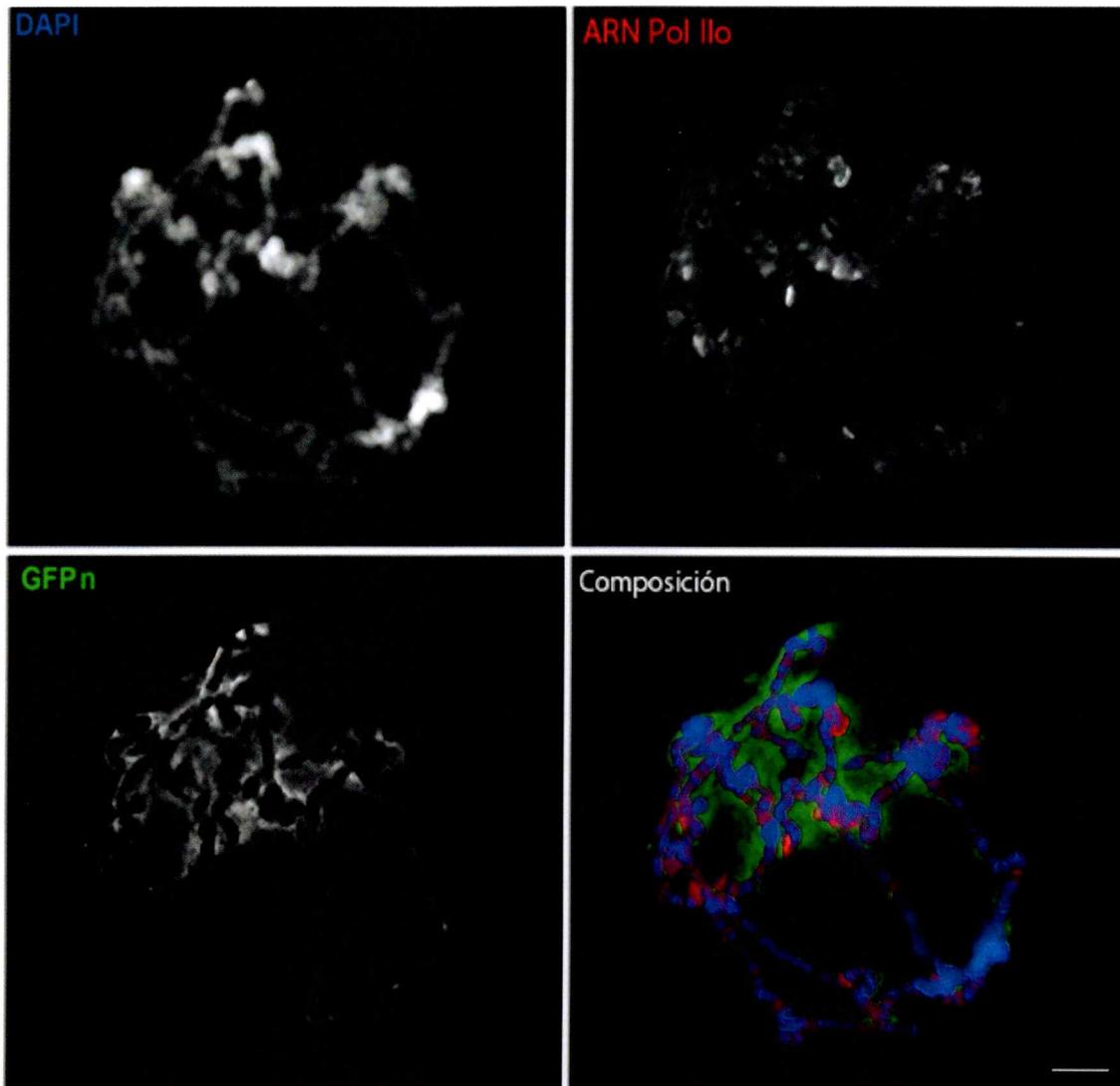
Se realizaron inmunofluorescencias contra el constructo DAXud1::GFP debido a que no se dispone de un anticuerpo anti-DAXud1. El constructo se expresó en tejido de disco imaginal de ala y glándulas salivares utilizando el sistema Gal4-UAS mediante la cruce de animales *nub-Gal4* con UAS-DAXud1::GFP. En conjunto con la inmunofluorescencia contra GFP (DAXud1::GFP), se realizó inmunofluorescencia contra la ARN Polimerasa Ilo

(dominio CTD fosforilado, Polimerasa transcripcionalmente activa), que marca *loci* transcripcionalmente activos.

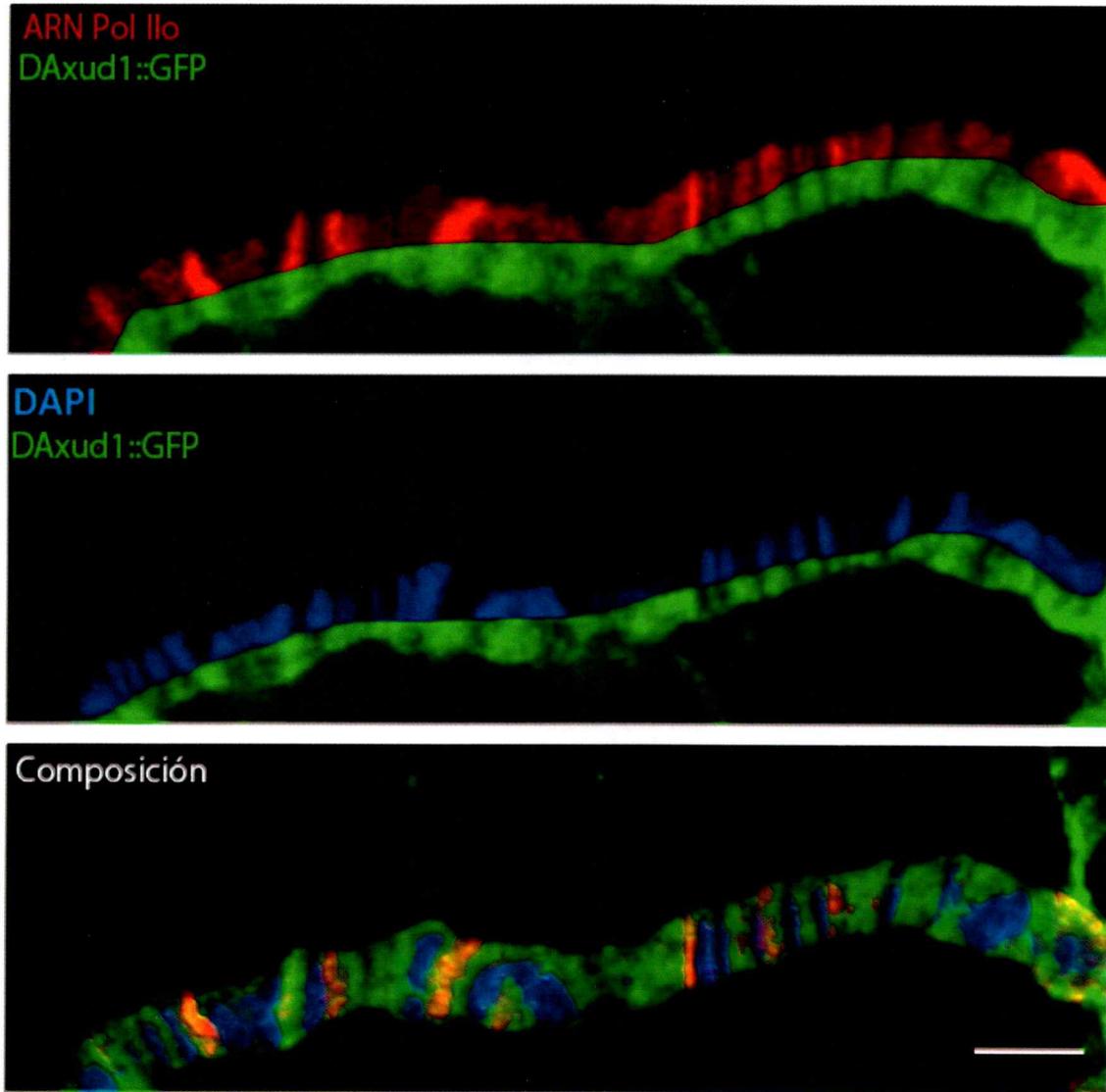
Los resultados de estos análisis muestran que DAXud1::GFP está en la cromatina, donde se aprecia un patrón de bandeo extenso pero definido (Figura 11), lo que es típico de elementos constituyente de la cromatina (Jamrich y cols., 1977; Johansen y cols., 2009). Ello apoya la posibilidad de que DAXud1 esté implicado directamente con la respuesta transcripcional durante el estrés térmico, modulando la transcripción de los genes *hsp*. En la Figura 13 se puede observar que este patrón de localización de DAXud1::GFP co-distribuye frecuentemente con el de la ARN Polimerasa II, lo que sugiere que DAXud1 puede tener un rol activador de la transcripción. Adicionalmente, se realizaron preparaciones de cromosomas a partir de animales de genotipo *Ubi-GFPnl*s, que expresan GFP en el núcleo de las células de todos los tejidos del animal. Con ello se confirmó que la proteína GFP por sí sola, utilizada para la inmunofluorescencia contra DAXud1::GFP, no presenta asociación con la cromatina (Figura 12). Se descartó de este modo un sesgo en el patrón de distribución de la señal por unión inespecífica del anticuerpo o por asociación inespecífica de GFP en regiones particulares de los cromosomas.



**Figura 11: DAXud1 se localiza en cromosomas politénicos en un patrón estereotipado característico.** Se realizaron preparaciones de inmunofluorescencias para GFP y ARN Pol Ilo en cromosomas politénicos de animales *nub>Gal4; UAS-DAXud1::GFP*. Se observa que DAXud1 se sitúa en la cromatina, en un patrón de bandeo similar, aunque más tenue, que ARN Pol Ilo. Barra 20  $\mu$ m.



**Figura 12: La proteína GFP nuclear no se une a la cromatina en patrones como los observados en DAXud1::GFP.** Utilizando el mismo procedimiento que el experimento con DAXud1::GFP, se realizó una inmunofluorescencia para GFP nuclear (GFPn) y para ARN Polimerasa II fosforilada (ARN Pol II). Barra 20  $\mu$ m.

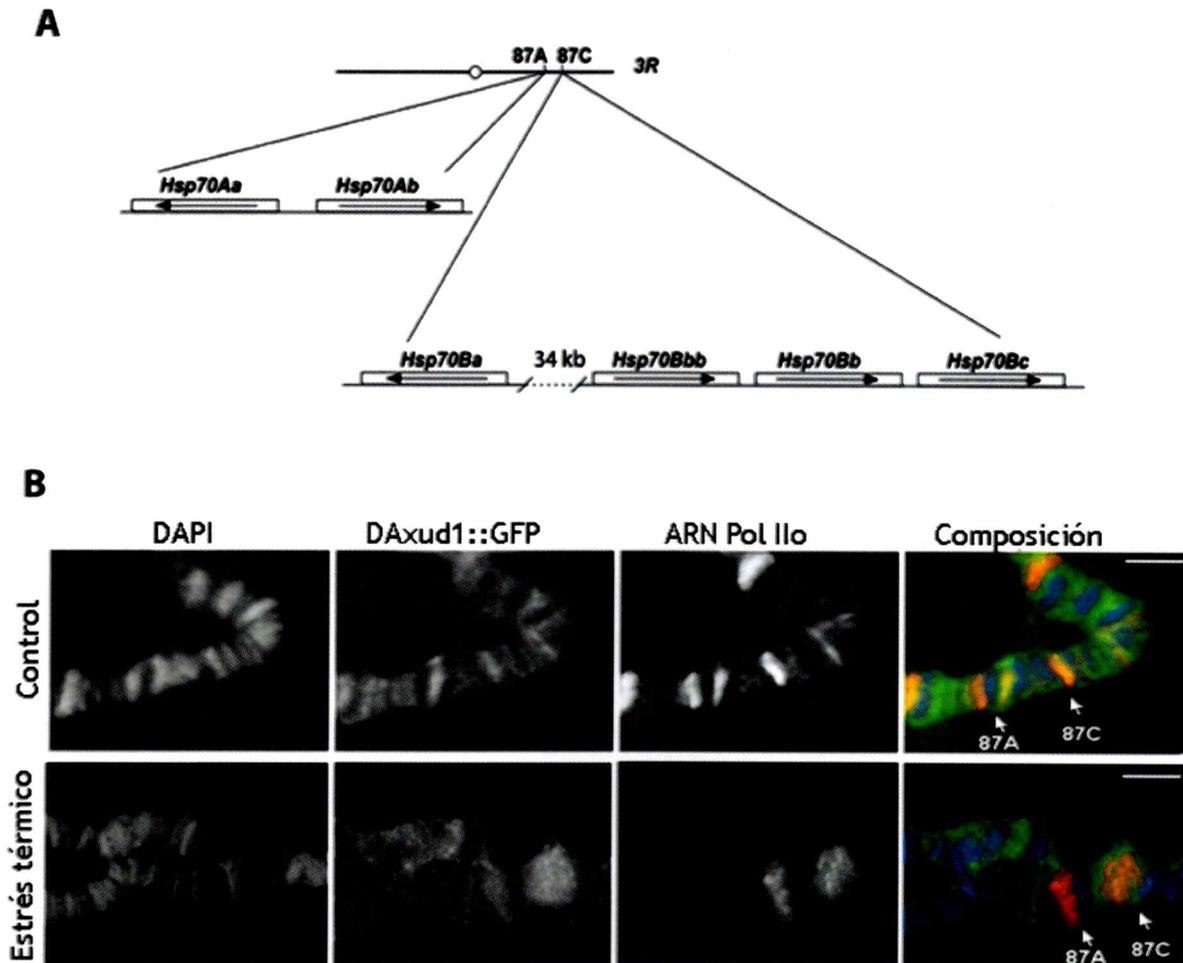


**Figura 13: DAXud1::GFP co-distribuye con ARN Polimerasa Ilo transcripcionalmente activa.** En la composición de los canales se observa una correlación entre la distribución de las señales de DAXud1::GFP y ARN Polimerasa activa (ARN Pol Ilo), dando cuenta que DAXud1::GFP se localiza principalmente en Eucromatina. Fotografía tomada a 60X con acercamiento digital. Barra 5  $\mu$ m.

## Relocalización cromosómica de DAXud1 durante estrés térmico

Si bien DAXud1 se encuentra en la cromatina en condiciones de crecimiento estándar (25°C), no se observó enriquecimiento en *loci* que codifiquen genes de la familia *hsp*. Según se ha investigado, durante estrés térmico es posible observar relocalización de proteínas en *loci* que codifican genes *hsp*, como por ejemplo HSF (Kregel y cols., 2002), Spt5 y Spt6 (Andrulis y cols., 2002), pTEFb (Ni y cols., 2004) y otros modificadores de estructura de cromatina (Saunders y cols., 2003; Lebedeva y cols., 2005). La relocalización de estos elementos es visible en cromosomas politénicos a los 20 minutos después de exponer las larvas de tercer estadio a estrés térmico agudo (37°C). Así, cabe la posibilidad de que DAXud1 forme parte de este conjunto de proteínas y su señal pueda ser apreciable en los *loci hsp* en preparaciones de cromosomas politénicos durante estrés térmico en las regiones señaladas en la Figura 14A.

Según se aprecia en la Figura 14B, DAXud1 experimenta una redistribución de su patrón de distribución en los *loci* 87A y 87C, cuya señal coincide altamente con la de ARN Pol Ilo, transcripcionalmente activa. Lo anterior sugiere que, similar a otros elementos ya mencionados, DAXud1 sería uno de los factores reclutados durante la activación de la transcripción de genes *hsp70*. Cabe destacar que en el *locus* 87C están los genes *hsp70Bbb* y *hsp70Bb*, cuyo aumento en estrés térmico se ve disminuido en los animales con pérdida de función de DAXud1. Por otra parte, en el *locus* 67B, en que se localizan *hsp26* y *hsp67*, no se aprecian cambios en la redistribución de DAXud1, consistente con el menor efecto en la expresión de estos genes al manipular los niveles de DAXud1.



**Figura 14: DAXud1 relocaliza sobre *loci* que codifican genes Hsp70 durante estrés térmico. A)** Esquema que grafica las posiciones citológicas 87A y 87C en el cromosoma 3R de *Drosophila melanogaster*. Se aprecian los genes que hay en cada *locus*, indicando todos los parálogos *hsp70* y la dirección de la transcripción. (Figura adaptada de Gong y cols, 2004). **B)** Inmunofluorescencia de cromosomas politénicos donde se observa la reestructuración de los patrones de bandeo de los diferentes elementos analizados al someter larvas de tercer estadio a estrés térmico (37°C por 20 minutos). Barra 5 µm.

**Objetivo específico 3:** Generar un perfil de posicionamiento genómico de DAXud1 para establecer su rol regulatorio con respuesta global a estrés

### **Localización genómica de DAXud1**

Los resultados de los objetivos anteriores han permitido determinar que DAXud1 es una proteína nuclear asociada a la cromatina, que durante estrés térmico DAXud1 se recluta en *loci* de genes *hsp70*, y que su disminución de expresión genera fenotipos de reducida termotolerancia posiblemente producto de una activación transcripcional deficiente de parálogos *hsp70*.

La distribución de DAXud1 es extensa en la cromatina en condiciones sin estrés térmico (Figuras 11 y 13), por lo que es posible que regule la transcripción de genes que participen en procesos no relacionados con estrés, permita mantener niveles de transcripción basales de otros genes *hsps* o de genes relacionados con estrés. Dado que las observaciones en cromosomas politénicos no proveen resolución suficiente para determinar posicionamiento de DAXud1 en unidades transcripcionales particulares o específicamente en las regiones regulatorias, se optó por una estrategia que pudiera responder estas preguntas.

Se seleccionó la estrategia de secuenciación masiva, DamID-seq, en particular su variante TaDa-seq (que permite combinar el DamID-seq con el sistema UAS-Gal4). Con este sistema podemos expresar la proteína de fusión Dam::DAXud1 de forma tejido y tiempo específico. En este experimento, la expresión y aislamiento de material se realizó a partir de discos imaginales de ala, ya que se trata de un tejido en proliferación, diploide y donde se habían realizado los estudios previos respecto de la función de DAXud1.

Respecto a la naturaleza de la técnica, esta se basa en la propiedad de la proteína Dam de *E. coli*, capaz de metilar las adeninas de las secuencias GATC del ADN próximas a los sitios de unión de la proteína de fusión; en este caso DAXud1. De esta forma, es posible marcar covalentemente (mediante metilación) y aislar las secuencias de ADN flanqueadas por estas metilaciones para ser posteriormente secuenciadas. Otra ventaja de la técnica es que no requiere anticuerpos específicos y además requiere una menor cantidad de material que la técnica CHIP-seq, por lo que se consideró una buena estrategia para, a través de su perfil de posicionamiento en el genoma, entender la función regulatoria de la expresión de DAXud1 en la cromatina. Hay que destacar que esta aproximación experimental tampoco requiere aislar el tejido del cual se extraerá el ADN, lo cual simplifica enormemente la obtención del material a analizar.

Como ya se señaló se obtuvo ADN a partir de discos imaginales de ala cada una de las 3 réplicas experimentales realizadas para cada condición, las que fueron secuenciadas en el equipo Illumina HiSeq-2500 (Macrogen, Corea del Sur). Las secuencias arrojaron estándares de calidad aceptables para posteriores análisis, obteniéndose para todas las muestras 90% de lecturas con calidad Q >20, mientras que el mismo índice Q fue sobre 30 en el 80% de las muestras y que corresponden a las seleccionadas para análisis posteriores (Tabla S10). De los pares de lecturas generados, todas las muestras tuvieron un alineamiento sobre 73% sobre el genoma de *Drosophila melanogaster*. Considerando la réplica con menores lecturas mapeadas, 16.392.179 lecturas (Tabla S10), se calculó la cobertura mínima del experimento que llegó a 27X en el genoma de *Drosophila*

*melanogaster* (Utilizando la fórmula Cobertura=(tamaño de lecturas x Cantidad de lecturas mapeadas)/Tamaño del genoma haploide).

No existen estándares publicados sobre la cobertura de experimentos de Dam-ID, pero como referencia, para un Chip-seq (técnica con finalidad y estrategia similar) la cobertura mínima de secuenciaciones sobre los genomas para hacer análisis posteriores fue de 10X (Jhonsons y cols., 2007; Sims y cols., 2014), por lo que nuestros experimentos contaron con cobertura y calidad suficientes.

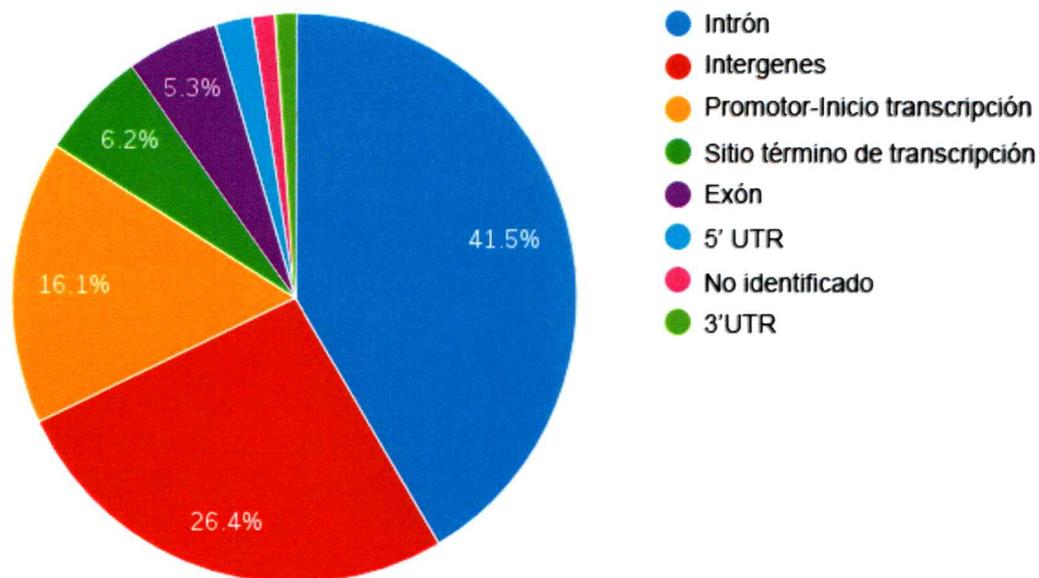
Esencialmente, la información de la secuenciación de DamID-seq es similar al de Chip-seq, aunque los experimentos de DamID-seq tienen un sesgo de lecturas hacia zonas GATC, las que pueden tener un conteo relativamente alto en las muestras Dam control, ya que la proteína Dam por sí sola puede metilar en zonas descompactadas de la cromatina. Esto genera falsos negativos en el caso de factores de transcripción activadores y falsos positivos en el caso de represores transcripcionales (Owen & Brand, 2015). Debido a estos sesgos, fue necesario realizar un filtro especial para las lecturas de modo de lograr una normalización adecuada de la señal Dam. Esto se corrigió con el *script* en Perl generado por Owen y Brand (2015), descrito en Materiales y Métodos.

A partir de la información del mapeo de secuencias, se procedió a identificar zonas en que las lecturas de Dam::DAXud1 eran significativamente mayores a la del control Dam, para ello se utilizó el programa *FindPeaks* (Owen y Brand 2015), que compara las señales del control con la de la condición experimental (Dam::DAXud1), e identifica las zonas que tienen señal significativamente mayor y estables entre réplicas. A partir de ello, se identificaron 1589 *peaks* significativos,

donde Dam::DAXud1 se posiciona con mayor frecuencia en el genoma. De estos 1589 sitios, 301 corresponden al cromosoma X, 276 al cromosoma 2L, 279 a 2R, 369 a 3L, 327 a 3R, 9 a cromosoma 4 y 6 a heterocromatina constitutiva. La distribución genómica de los *peaks* fue mayoritariamente intrónica, sobre un 40% (Figura 15), siendo un 26,4% de elementos intergénicos y un 16,1% de elementos en promotores (considerando presencia del *peak* en -1000 río arriba del sitio de inicio de transcripción para *Drosophila melanogaster*). Esta distribución no sería producto del azar ya que en el genoma de *Drosophila* los intrones corresponden a un 9% del genoma y en promedio, los genes se constituyen de 4,67 intrones (datos [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)). A partir de esto, se debe recalcar que más de un 50% de estos sitios se localizan en el primer intrón (Figura 16).

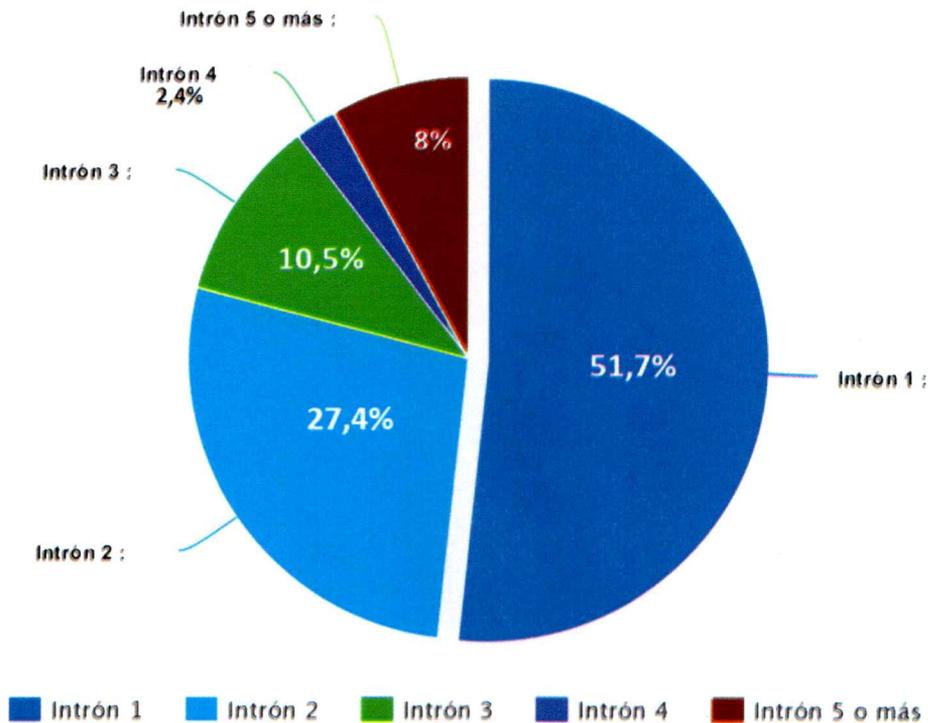
### **Anotación de *peaks***

Para ejercer un control regulatorio sobre un proceso específico, generalmente un factor de transcripción debe localizarse en las cercanías o dentro de la región que codifica un gen implicado en dicho proceso. Con el fin de asociar genes puntuales con los *peaks* identificados, se utilizó el programa HOMER (Salk Institute, Heinz y cols., 2010), que asocia *peaks* dentro de genes y en región del promotor (Criterio -1000 a +200 bases desde el inicio transcripción para *D. melanogaster*).



**Figura 15: Distribución genómica de los *peaks* significativos identificados por DamID.**

La localización de los *peaks* se asoció con genes según el criterio descrito anteriormente. Bajo este análisis, 5 genes *hsp* marcaron positivo, todos en la región promotora: *hsp60B*, *hsp70Bc*, *hsp70Bb*, *hsp70Bbb*, *hsp67C*; y 2 proteínas “Heat Shock cognate”, chaperonas moleculares con alta similitud a Hsp70, codificadas por los genes *hsc70-3* y *hsc70-C*. Estas proteínas Hsc tienen un rol de chaperona en estados no estresados y son de expresión basal (Lawrence y cols., 1991).



**Figura 16: Distribución en intrones de los *peaks* significativos identificados por DamID.**

Agrupando los genes en categorías funcionales utilizando la plataforma en línea STRING (Tablas 8 y 9), no destacó el grupo de genes relacionados con el proceso de tolerancia estrés térmico, probablemente por no ser suficiente el número de ellos para marcar significancia para esa categoría (Mi y cols., 2013). Sin embargo, se observan categorías como morfogénesis y desarrollo neural de *Drosophila*, consistentes con el posible rol de los genes homólogos a DAXud1 durante el desarrollo neural en pez cebra (Feijoó y cols., 2009) y para la estructuración del epitelio en *Drosophila* durante el desarrollo embrionario y discos imaginales (Glavic y cols., 2009; Figura 2).

## Perfil general de localización o metagenómico

Para tener una mejor idea de cómo el posicionamiento de DAXud1 regula la transcripción de sus posibles genes blanco, se elaboraron perfiles de ocupación global, utilizando la señal de Dam::DAXud1 alrededor de zonas de interés como sitio de inicio de transcripción (IT) y los genes totales (en escala a 1000 bases). Esto utiliza la señal promedio (eje Y) en cada localización computada en el eje X del gráfico. A partir de esta información se generaron perfiles alrededor del sitio de inicio de transcripción (Figura 17) y en genes a escala, con y sin *peaks* significativos (Figura 18).

En la Figura 17 se puede apreciar que a nivel genómico la señal de Dam::DAXud1 tiene tendencia a distribuir alrededor de los sitios de inicio de transcripción, con dos *peaks* alrededor de este punto. Un análisis más resolutivo que consideró sólo los genes con *peaks* significativos demostró que Dam::DAXud1 tiene una fuerte tendencia a localizarse en zonas promotoras y no en el sitio de inicio de transcripción

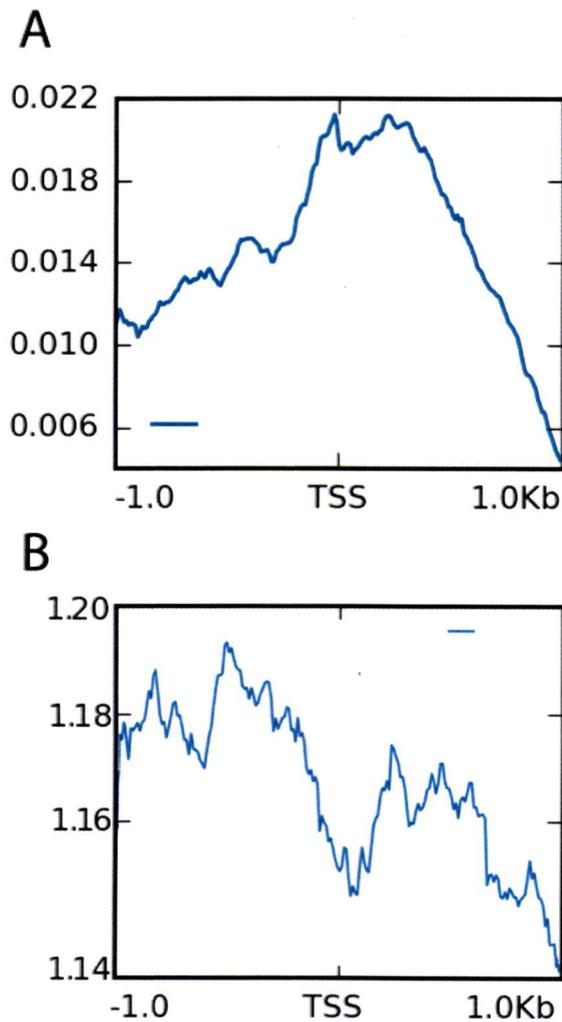
**Tabla 8:** Agrupación de genes anotados que tuvieron posicionamiento significativo de DAXud1 en el experimento de DamID para procesos biológicos generales. La agrupación se realizó mediante la herramienta *Gene Ontology* (GO) de bases de datos en línea.

Proceso Biológico	Genes identificados	Nombre de los genes
Generación de neuronas	69	slp2,pyd,esg,E2f1,klar,mfas,futsch,if,scrb,Ten-a,N,gukh,XNP,sbb,smt3,emc,CG10431,Imp,hh,robo2,tutl,Int6,NijA,RhoGAP93B,boi,nkd,drl,Lar,babos,gt,jing,Ptp10D,unc-5,ovo,grh,esn,cdi,stan,en,hth,Kank,Src42A,RhoGAP100F,kibra,fj,CG8668,trh,tai,Nckx30C,chn,baz,dnc,kni,tinc,LpR2,Raf,wor,Ecr,bun,trn,inv,slow,aop,aos,salm,dlp,CG31871,fruity
Morfogénesis	101	bab1,if,Pld,Cerk,futsch,gukh,rdx,vn,N,scrb,tio,E2f1,esg,pyd,slp2,qsm,18w,mfas,Stat92E,klar,boi,RhoGAP93B,NijA,Int6,Myo10A,tutl,Shroom,jing,gt,CG43427,drl,Lar,zfh2,Dll,CG10431,emc,CG43658,Pgk,smt3,XNP,sbb,robo2,hh,lme4,Hr39,sr,fj,kibra,RhoGAP100F,Src42A,Kank,rols,Hph,baz,chn,kirre,T48,CG34460,Nckx30C,tai,trh,mbc,lbk,unc-5,ovo,Ptp10D,Myo61F,C15,Cyp18a1,en,hth,stan,heph,awd,grh,siz,Ecr,bun,Phk-3,verm,fru,sty,CG31871,dlp,salm,aos,aop,slow,inv,cpb,trn,rt,lnx3,kni,dnc,grim,opa,cort,Raf,wor,LpR2
Morfogénesis de epitelio	57	en,hth,heph,stan,18w,grh,awd,Stat92E,ovo,E2f1,Myo61F,esg,C15,pyd,Cyp18a1,baz,vn,rdx,N,CG34460,scrb,tio,trh,mbc,fj,bab1,if,Src42A,Hph,Cerk,Raf,hh,lme4,lnx3,emc,CG43658,opa,sbb,jing,Shroom,fru,sty,dlp,CG43427,aos,salm,aop,slow,inv,Dll,trn,zfh2,boi,bun,Ecr,siz,Myo10A
Morfogénesis de tejido	57	CG43658,sbb,opa,lnx3,emc,lme4,hh,Raf,Myo10A,boi,siz,bun,Ecr,slow,aos,salm,aop,Dll,zfh2,trn,inv,sty,fru,jing,Shroom,CG43427,dlp,C15,Myo61F,esg,pyd,Cyp18a1,E2f1,ovo,grh,awd,Stat92E,heph,stan,hth,en,18w,Cerk,Hph,if,fj,bab1,Src42A,scrb,CG34460,N,mbc,tio,trh,baz,vn,rdx
Movimiento celular	53	Raf,robo2,hh,CG14838,opa,XNP,sbb,kni,dlp,gt,jing,Shroom,fru,Lar,drl,trn,cpb,salm,aos,aop,bun,Ecr,NijA,RhoGAP93B,tutl,18w,en,stan,klar,Stat92E,awd,inaC,unc5,Ptp10D,slp2,esg,gukh,vn,bbg,baz,mbc,N,scrb,tai,RhoGAP100F,Src42A,sr,if,kibra,futsch,Cycb,rols,Cerk
Locomoción	52	kni,XNP,sbb,opa,emc,hh,robo2,Raf,tutl,RhoGAP93B,NijA,Ecr,bun,aos,aop,salm,trn,cpb,Lar,drl,fru,Shroom,jing,gt,dlp,esg,slp2,Ptp10D,unc5,awd,inaC,klar,Stat92E,stan,en,18w,Cerk,rols,if,kibra,sr,Src42A,RhoGAP100F,Ten-a,scrb,tai,N,mbc,baz,bbg,vn,gukh
Diferenciación neural	60	fru,jing,dlp,CG31871,gt,slow,aop,salm,aos,trn,Lar,drl,boi,RhoGAP93B,NijA,Ecr,bun,Int6,tutl,hh,wor,robo2,LpR2,Imp,emc,CG10431,kni,XNP,sbb,dnc,smt3,baz,chn,gukh,scrb,tai,Ten-a,N,Nckx30C,trh,if,fj,CG8668,Src42A,RhoGAP100F,Kank,futsch,stan,en,hth,esn,mfas,grh,klar,E2f1,Ptp10D,unc-5,ovo,slp2,pyd
Desarrollo de órganos	83	Kdm2,en,hth,heph,stan,grh,ovo,unc-5,lbk,Cyp18a1,Myo61F,C15,kirre,chn,baz,trh,mbc,CG34460,Nckx30C,RhoGAP100F,Src42A,pxb,sr,fj,kibra,rols,Hph,Raf,wor,rt,opa,toe,kni,dlp,sty,fru,inv,cpb,trn,aop,aos,salm,slow,bun,Ecr,siz,verm,18w,Notum,klar,Stat92E,inaC,E2f1,pyd,esg,rdx,vn,bbg,tio,N,tara,Ten-a,scrb,bab1,if,futsch,msi,Cerk,robo2,hh,Hr39,emc,sbb,CG43658,gt,CG43427,jing,drl,Lar,zfh2,Dll,boi,tut
Desarrollo de sistemas	113	boi,RhoGAP93B,NijA,Int6,tutl,jing,CG43427,gt,babos,Dll,zfh2,nkd,CG17683,Lar,drl,emc,CG10431,CG43658,XNP,sbb,smt3,hh,robo2,Imp,Hr39,if,bab1,Cerk,msi,futsch,bbg,vn,rdx,gukh,Ten-a,mtg,scrb,N,tara,Mdr65,tio,eg,E2f1,esg,pyd,slp2,Notum,mfas,18w,inaC,klar,Stat92E,siz,Ecr,bun,verm,fru,sty,CG31871,dlp,slow,salm,aop,aos,trn,cpb,inv,rt,kni,toe,grim,dnc,opa,wor,Raf,CG5326,LpR2,tinc,kibra,sr,fj,CG8668,pxb,Src42A,RhoGAP100F,rols,CG12007,Hph,Kank,baz,chn,kirre,tai,CG34460,Nckx30C,mbc,trh,Ptp10D,unc-5,lbk,ovo,C15,Myo61F,Cyp18a1,cdi,stan,heph,hth,en,esn,Kdm2,grh,awd

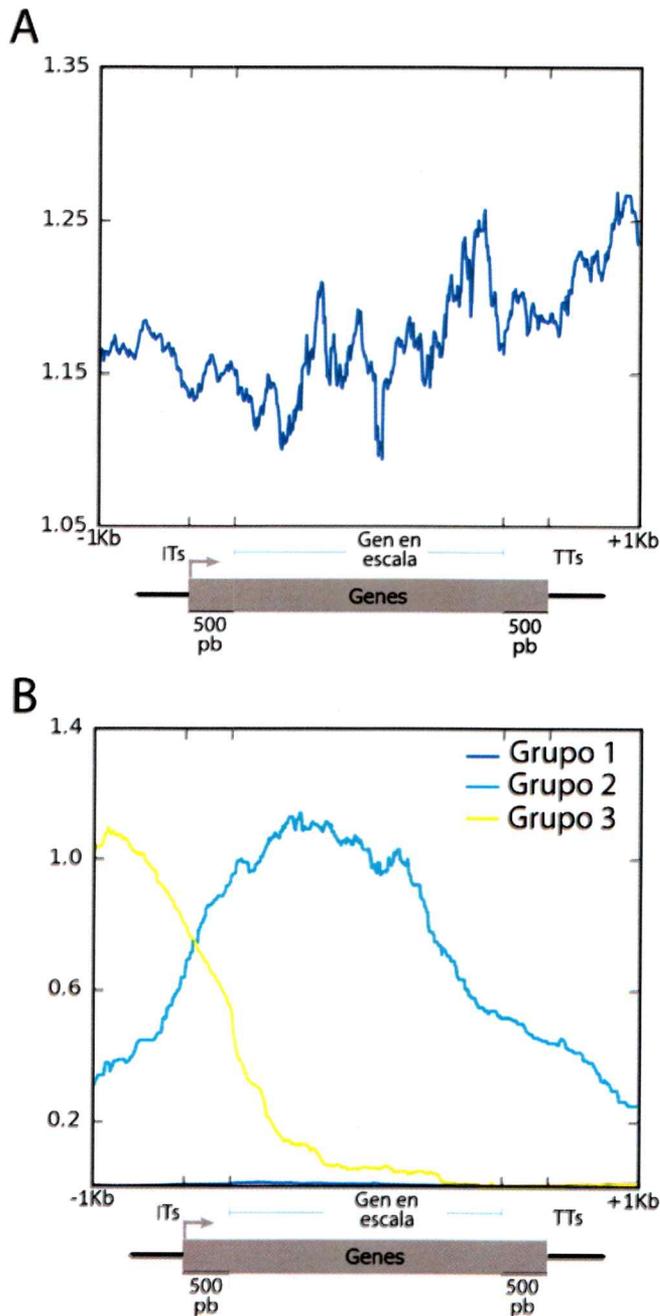
**Tabla 9:** Vías de señalización más enriquecidas a partir de la lista de genes en cuyo *locus* se posiciona DAXud1. La información se generó a partir de la información de vías de la iniciativa Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) que tiene la información de vías metabólicas y de señalización, junto con la herramienta para identificar vías posiblemente intervenidas a partir de listas de genes como la generada a partir del análisis de posicionamiento de *peaks* de DAXud1. Esto da información de que vía estaría intervenida o regulada por DAXud1 de manera más probable.

Ruta	Genes de la ruta	Genes identificados en el análisis	Nombre de los genes
Biosíntesis de ácidos grasos	13	4	AcCoAS,PCB,ACC,Acsl
Beta-Oxidación de ácidos grasos	18	4	CG31871,AcCoAS,Mtpalpha,Acsl
Beta-Oxidación Meta MAPP	23	4	Acsl,Mtpalpha,AcCoAS,CG31871
Señalización TGF-Beta	13	3	Fs,Mad,wg
Señalización Hedgehog	10	2	CycB,ptc
Ciclo celular	49	5	grp,CycD,sgg,CycB,Cdk4
Ciclo de Krebs	23	3	PCB,SdhA,Nc73EF

En la Figura 18B se observa el perfil metagenómico agrupado para los genes con señal significativa. Esta agrupación de los genes ofrece una mejor resolución y agrupa los genes según una señal similar de acuerdo a las coordenadas establecidas para el cómputo (sitios de inicio de transcripción o genes escalados). Se diferenciaron 3 tipos de señales positivas que corresponden a las 3 formas en que DAXud1 se distribuye en de los genes. Se puede observar que existe una mayoría de genes donde DAXud1 se localiza en zonas intragénicas (Grupo 2, señal celeste) y en promotores (Grupo 3, señal amarilla), habiendo una minoría de *peaks* con muy baja señal, pero significativa, dentro del cuerpo de los genes (Grupo 1, señal azul). Este patrón puede asociarse con factores de transcripción que se localizan preferentemente en promotores (Grupo 3), y es posible que la señal intragénica (Grupo 2) corresponde que resulta de la distribución de DAXud1 en intrones, ya que estos representan un 41.5% de los *peaks*. Los grupos de genes identificados por las distintas distribuciones no se asocian a ningún tipo de proceso específico como estrés o apoptosis.



**Figura 17: Perfil metagenómico de Dam::DAXud1 alrededor de los sitios de inicio de transcripción.** Mediante el programa *Deeptools* se generaron perfiles de ocupación genómica a partir de los genes con *peaks* significativos, realizado a partir de los perfiles totales de posicionamiento (Figura S17). Aquí se grafica el sitio de inicio de transcripción alineado de todos los genes anotados para la versión dm3 del genoma de *Drosophila* (eje X) con la señal del experimento de Dam (escala logarítmica promedio de enriquecimiento de señal). Se realizaron perfiles para todo el genoma, considerando señales de Dam::DAXud1 significativas y no significativas (A) y perfil sólo para los genes con señal significativa (B).



**Figura 18: Perfil metagenómico sobre el cuerpo de los genes y agrupación de las señales.** Todos los genes fueron escalados a 1000 bases, dejando sin escalar 500 bases después del inicio de transcripción (ITs) y 500 bases antes del término de transcripción (TTs). También quedaron sin escalar las zonas -1kb río arriba del gen y +1kb después del término de transcripción. **A)** Perfil para todos los genes con señal significativa de Dam::DAXud1. **B)** Misma información que en A, pero en grupos de genes con patrón de posicionamiento similar. Se aprecian 3 grupos, de los cuales el 2 y el 3 dos son de alta señal, mientras que el grupo 1 es de señal baja repartida por todo el gen.

Motivo	Logo	Logo reverso	E-valor	Recurrencia
1.-RTACATAY			1.2e-175	1118
2.-ATAWATAW			4.9e-145	1360
3.-ACACACDY			2.7e-143	1177
4.-CAVCARCA			3.7e-107	1349
5.-CCTCSBCC			3.9e-088	841
6.-ARMGAGAG			2.2e-067	780
7.-CCVCCRCC			5.6e-066	702
8.-TGTATMTR			4.7e-044	674
9.-AAATATWT			2.3e-042	775

**Figura 19: Secuencias consenso encontradas a partir del alineamiento de las secuencias de los *peaks*.** Se ilustran las secuencias consenso principales encontradas utilizando el programa DREME, introduciendo las 1589 secuencias. Se ordenaron en base a E-valor y a recurrencia en las secuencias, siendo el E-valor un valor estadístico desarrollado para alineamientos de secuencias, análogo a p-valor de test estadísticos de valores numéricos (Bailey, 2011).

## Motivos consenso derivadas del análisis de las secuencias en que se posiciona DAXud1

El largo de las secuencias de los *peaks* significativos, utilizando el programa *FindPeaks* fue de entre 50-5000, las secuencias de los 1589 *peaks* se extrajeron y se alinearon con el programa DREME (Bailey, 2011). Este programa realiza alineamientos múltiples de las secuencias ingresadas, buscando secuencias consenso recurrentes, a la vez que realiza *test* estadísticos de probabilidad de que esas secuencias sean encontradas al azar tanto en el genoma de *Drosophila* como en las secuencias analizadas (Bailey, 2011). Los resultados de los alineamientos se muestran en la Figura 19.

No necesariamente los primeros motivos en la jerarquía se corresponderían con una posible secuencia de unión de DAXud1, ya que pueden ser indicadores de motivos recurrentes en promotores de genes vinculados con algún proceso biológico particular, o a contextos genómicos específicos. Para obtener esta información se utilizó el programa GOMO (Algoritmo y base de datos descritas en Bode y cols., 2008), que asocia los motivos encontrados por DREME a promotores conocidos y caracterizados en el genoma de *Drosophila melanogaster*. El programa GOMO busca la secuencia ingresada en los promotores de todos los genes de la especie seleccionada (definidos en -1000 a +200 desde el inicio de transcripción) y los asocia con rol funcional de las bases de *Gene Ontology* (GO), en el que se hace una corrección adicional (que origina al valor p) en cuán probable sería el mismo resultado si las secuencias de promotores estuviesen asignados a genes aleatoriamente (Bode y cols., 2008). El resultado de este

análisis se resume en la Tabla 10, en que la secuencia nucleotídica más recurrente fue identificada como RTACATAY (abreviaturas y siglas para clave de nucleótidos, página V) está presente en promotores de genes de respuesta a estrés térmico e hipoxia. Esto refuerza la idea que DAxud1 participaría en respuesta a estrés térmico, a través de la unión a una secuencia consenso particular. El segundo motivo (ATAWATAW) se ha vinculado a promotores de genes de respuesta a patógenos, otro tipo de estrés. Un tercer motivo es que ACACADY tiene recurrencia en promotores de genes de desarrollo de cordón neural ventral en *Drosophila*.

**Tabla 10:** Asociación de secuencias consenso a categorías de *Gene Ontology*, utilizando información de promotores anotados de *Drosophila melanogaster*.

	Procesos Biológicos			Función Molecular		
	Clave GO	p-valor	Nombre categoría	Clave GO	p-valor	Nombre categoría
RTACATAY	GO:0035080	8,80E-05	Respuesta a estrés térmico mediante <i>puffs</i> cromosómicos	GO:0005388	5,47e-05	Transporte de Calcio mediado por ATP
	GO:0001666	1,68E-02	Respuesta a hipoxia			
	GO:0030239	9,16E-02	Ensamblaje de miofibras			
ATAWATAW	GO:0050829	1,52E-01	Respuesta a bacterias Gram-Negativas	GO:0030533	1,42E-04	ARNt
	GO:0006333	2,45E-02	Ensamblaje de cromatina			
	GO:0006412	1,02E-02	Traducción			
ACACADY	GO:0007419	2,84E-04	Desarrollo de Cordón Neural Ventral	GO:0003700	1,42E-04	Factor transcripcional
	GO:0007476	1,42E-03	Morfogénesis de disco imaginal de ala	GO:0005509	1,42E-04	Unión de calcio
	GO:0007400	4,98E-03	Diferenciación de neuroblastos			
	GO:0030707	2,35E-02	Desarrollo celular de folículo de ovariole			
	GO:0007179	2,62E-02	Vía TGF-beta			
CAVCARCA	GO:0035075	1,54E-01	Respuesta a ecdisona	GO:0003700	1,42E-04	Factor transcripcional
ARMGAGAG	GO:0007422	1,42E-04	Desarrollo de sistema nervioso periférico	GO:0003700	1,42E-05	Factor transcripcional
	GO:0048867	1,42E-04	Diferenciación de células troncales			
CCTCSBCC	GO:0034470	5,69E-04	Síntesis de ARNr			
	GO:0016072	7,03E-02	Síntesis de ARNnc			

## DISCUSIÓN

---

En este trabajo se llevaron a cabo experimentos que permiten proponer que DAXud1 modula la respuesta a estrés térmico en *Drosophila melanogaster*, ésto a través de la activación transcripcional de genes *hsp70*. Cabe destacar, que existen pocos estudios que den información precisa e integrada sobre la función fisiológica y molecular de DAXud1 y sus ortólogos. Concluimos que, durante estrés térmico, DAXud1 relocaliza sobre *loci* que codifican genes *hsp70*, con la función de promover de manera eficiente la transcripción de estos genes en condiciones de estrés celular. Lo anterior explica por qué los animales con pérdida de función de DAXud1 son sensibles al estrés térmico y reducen su sobrevivencia al ser desafiados con este tipo de estrés.

Lo anterior también fue apoyado por la información de perfiles de posicionamiento genómico de DAXud1, en que se observó que no sólo se posiciona sobre algunos genes *hsp70*, sino que las secuencias identificadas por el análisis de secuencias de distribución de DAXud1 sugieren que esta proteína se localiza frecuentemente cercano al motivo nucleotídico RTACATAY, presente en todos los promotores de genes de la familia *hsp* en *Drosophila melanogaster*. Este motivo puede servir para guiar a DAXud1 en el genoma, o bien puede servir de unión para un complejo mayor, del cual DAXud1 forma parte y así podría no unirse directamente al ADN.

Los genes *hsp* son necesarios no sólo para la tolerancia a estrés térmico, también se ha demostrado que forman parte de un mecanismo citoprotectivo conservado universalmente y cuya regulación transcripcional podría depender en animales de DAxud1.

### **1.- Rol de DAxud1 en la respuesta a estrés**

Se ha observado que DAxud1 aumenta considerablemente durante diferentes formas de estrés crónico. Lo anterior incluye resultados para la exposición a: doxorubicina, en que el ortólogo de ratón (AXUD1/CSRNP1) aumenta más de 2 veces en cardiomiocitos expuestos por 10 semanas a este químico (Yi y cols., 2006); para estrés oxidativo inducido durante 3 meses por nanopartículas de Cerio en tejido hipocampal de ratón (Cheng y cols., 2013); para estrés por baja temperatura (12°C), en células de retina humana expuestas a frío por seis días presentan un aumento de DAxud1 más de 3 veces (Pasovic y cols., 2016); para estrés por presión, en cementoblastos humanos expuestos a presión de 30 g/cm<sup>2</sup> por más de seis horas, presentan un aumento significativo al cabo de este tiempo (Diercke y cols., 2014). Con estos antecedentes y otros señalados en la introducción de esta tesis, se decidió estudiar si DAxud1 es necesario para la respuesta a estrés térmico ya que es una respuesta de estrés generalizada, fácil de inducir y el mecanismo celular para su tolerancia es similar a los otros tipos de estrés donde se analizaron los cambios de expresión de los homólogos de DAxud1. El mecanismo de tolerancia que opera para todas las formas de estrés celular se basa en la rápida transcripción de genes *hsps* y su posterior traducción (Kregel y cols., 2002; Richter y cols., 2010).

### 1.1.- DAXud1 es un elemento de respuesta a estrés a través de genes *hsp70*

Los antecedentes de DAXud1 coinciden con tipos de estrés en que este gen, junto con los de la familia *hsp*, aumentan en condiciones como estrés oxidativo (Bruce y cols., 1993; Ahamed y cols., 2010), baja temperatura (King y cols., 2015) y presión hidrostática (Kaarniranta y cols., 1998). Si bien DAXud1 no es el único elemento necesario para la transcripción de genes *hsp* (Lis y cols., 2001; Kregel y cols., 2002; Richter y cols., 2010), se observó que la pérdida de función disminuye la eficiencia de transcripción durante estrés térmico agudo de al menos dos genes parálogos *hsp70* en el *locus 87C*, que son *hsp70Bb* y *hsp70Bbb* (Figura 9C). En condiciones de estrés térmico, la transcripción de genes *hsp70Bb* y *hsp70Bbb* fue significativamente menor, en al menos un 30%, en animales en los que DAXud1 fue silenciado, lo que explica la mayor sensibilidad de los animales a las condiciones de estrés térmico ensayadas (Figura 8A), y la reducción en la sobrevivencia de los adultos deficientes en DAXud1 expuestos a incrementos diarios de la temperatura ambiente (Figura 9B). Un resultado similar, en cuanto a pupación, se obtuvo al crecer las larvas deficientes en DAXud1 en medio con 0.5% de Peróxido de Hidrógeno (Figura S20). Ambos procesos de tolerancia a estrés térmico y oxidativo tienen en común las proteínas Hsp70 como efectores (Kregel y cols., 2002), siendo más necesarias en condiciones de estrés térmico, ya que la respuesta a peróxido tiene otros elementos que operan en las primeras etapas del estrés, como glutatión y catalasas, que son utilizados a modo de respuesta rápida (Ma y cols., 2010). Así, durante condiciones de estrés oxidativo sostenido la expresión de diferentes Hsps se hace fundamental (Bruce y

cols., 1993; Ahamed y cols., 2010). De lo anterior se infiere que DAXud1 tendría un rol importante, a través de la transcripción de los genes *hsp70*, también en la respuesta a estrés oxidativo crónico. Lo que se correspondería con el aumento de su expresión previamente descrita en otros sistemas (Yi y cols., 2006; Cheng y cols., 2013).

La eficiente activación de la transcripción de los genes *hsp* se debería en gran medida al posicionamiento de DAXud1 sobre *loci* que codifican genes *hsp70*. Nuestros resultados muestran que durante el estrés térmico agudo (exposición a 37°C por 20 minutos), DAXud1 se redistribuye abundantemente sobre los *loci* 87A y 87C de cromosomas politénicos de glándulas salivales, similar a lo descrito para la ARN Polimerasa Ilo (transcripcionalmente activa) en las mismas condiciones experimentales (Ni y cols., 2004). Este fenómeno de redistribución ocurre con varios elementos de la cromatina que son necesarios para la transcripción de los genes *hsp70* en condiciones de estrés, como son: HSF (Sorger, 1991), remodeladores de cromatina (Saunders y cols., 2003), el complejo de elongación DSIF (Missra y cols., 2010) y el complejo Cdk9/Ciclina T (Lis y cols., 2000). Así, DAXud1 correspondería a otro elemento que modula la respuesta a estrés térmico agudo, y posiblemente otras respuestas a estrés como oxidativo, hipoxia, entre otros (Kregel y cols., 2002).

Por otra parte, en tejidos en proliferación y sin exposición a estrés térmico, como el disco imaginal de ala, DAXud1 se posiciona frecuentemente en zonas del genoma con una secuencia específica (RTACATAY) que se encuentra en todos los promotores de los parálogos de *hsp70*, e incluso de los otros genes de la

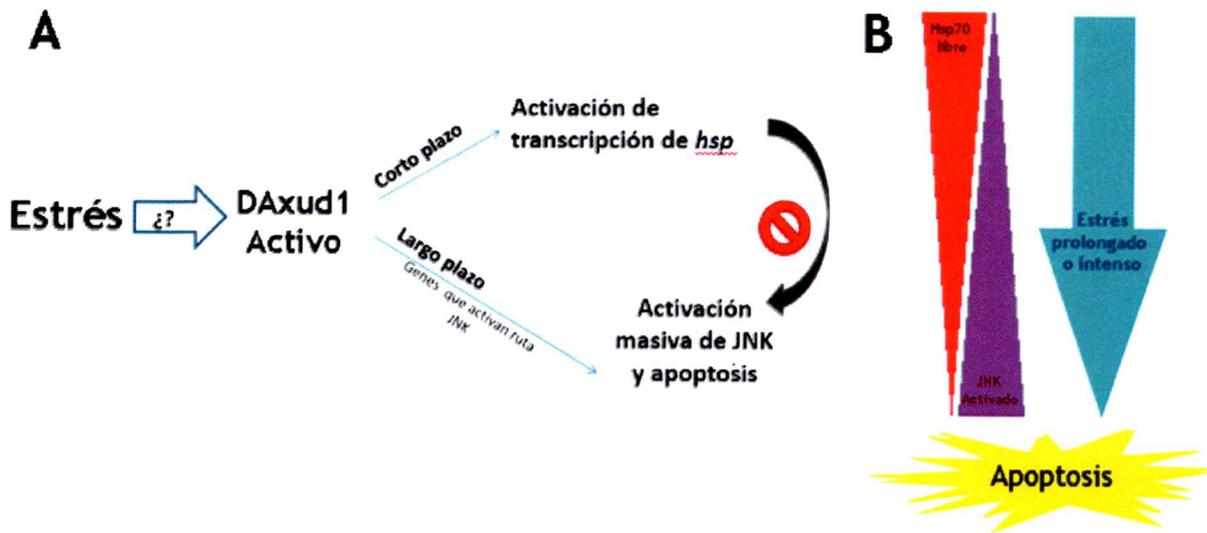
familia *hsp*. Esto concuerda con las observaciones de los experimentos descritos, validando la propuesta que DAXud1 actuaría como un elemento de la cromatina necesario para la expresión de genes *hsp70* durante estrés térmico.

### **1.2.- DAXud1 en la respuesta a estrés a corto y largo plazo.**

Concordante como un controlador transcripcional durante respuesta a estrés, el aumento de la expresión de DAXud1 durante exposición a largo-mediano plazo está vinculado a la vía JNK que activa la apoptosis, lo que se ha confirmado en cementoblastos humanos (Korb y cols., 2016) y en tejidos imaginales de *Drosophila* (Glavic y cols., 2009). En estos estudios se vinculó a DAXud1 con un rol pro-apoptótico, tanto por el fenotipo de apoptosis propiamente tal (Glavic y cols., 2009), como por observación de activación de la vía JNK (Glavic y cols., 2009; Korb y cols., 2016). Siendo la activación de la vía JNK un evento común a la activación de la apoptosis, proceso homeostático vinculado a la protección del tejido frente a agresiones de distinta naturaleza (Redza-Dutordoir y cols., 2016).

Con estos precedentes se propone que DAXud1 operaría como un elemento de respuesta a estrés tanto al inicio de la respuesta, favoreciendo la expresión de genes *hsp70*, como en el proceso terminal del estrés, donde la pérdida de homeostasis celular llevaría a la activación de JNK e inducción de la apoptosis. Esta proposición es apoyada por los datos de DamID, donde se hallaron cinco genes vinculados con la activación de JNK/Bsk: *cdc42*, *aop*, *src42A*, *msn* y *wengen*. Los primeros cuatro vinculados directamente con la activación de la vía JNK en contexto de desarrollo embrionario (Su y cols., 1998; Noselli y cols., 2000; Tateno y cols., 2000), mientras que *wengen* activa la vía JNK a través de la

señalización TNF/Egger (Moreno y cols., 2000). De este modo la ganancia de función de DAXud1 podrían estimular la transcripción de estos genes y a través de ellos establecer las conductas celulares ya descritas. Dicha situación de regulación transcripcional deberá confirmarse con experimentos futuros. Un resumen gráfico de esta propuesta se puede apreciar en la Figura 20.



**Figura 20: Modelo de función de DAXud1 como regulador maestro de respuesta a estrés.** A) Según lo estudiado en esta tesis, DAXud1 estaría implicado en la respuesta a estrés a corto plazo, a través de la transcripción de genes *hsps* y estos en una primera etapa de exposición al estrés impedirían la activación de la vía JNK mediante unión directa. Este estado de supresión de la apoptosis activada por JNK que mantendría a la célula viva operaría en la medida que las proteínas Hsp70 sean abundantes y capaces de mantener íntegra la conformación de las proteínas desplegadas por los agentes estresores. A largo plazo, DAXud1 seguiría activo promoviendo la transcripción tanto de genes *hsps* como de activadores de JNK, permitiendo mantener el equilibrio que conserva a la célula viva. Sin embargo, este equilibrio puede romperse si la cantidad de Hsp70 libre disminuye debido a la gran cantidad de proteínas mal plegadas, no pudiendo sostener el bloqueo a la activación de la vía JNK y desencadenando la muerte celular programada como proceso final frente al estresor (B).

En la etapa inicial del estrés DAXud1 experimentaría relocalizaciones sobre los *loci* de genes *hsp70*, activando su transcripción y posiblemente induciendo la fosforilación y activación de JNK de manera leve. Esta activación de la vía JNK incrementaría en función del tiempo del estímulo estresor. Se ha descrito además que esta activación de la ruta JNK es necesaria para la respuesta a estrés térmico a mediano y largo plazo (Gonda y cols., 2012), y conforme va aumentando el nivel de activación de JNK/Bsk se llega a un punto en el cual se induce eventualmente la apoptosis. Sin embargo, hasta ahora no se conocen los mecanismos exactos que regulan la activación JNK durante estrés agudo sin los efectos pro-apoptóticas (Gonda y cols., 2012).

Como se constata en la bibliografía, tanto Hsp70 como JNK tienen en común que aumentan su expresión durante condiciones de estrés en las que también se observa que DAXud1 aumenta su expresión a largo plazo (Gabai y cols., 1998; Nagata y cols., 1999; Yi y cols., 2006; Ahamed y cols., 2010; Cheng y cols., 2013). De este antecedente y de nuestras observaciones experimentales se desprende la posibilidad de que DAXud1 sea un modulador transcripcional de ambos elementos, con consecuencias diferentes a corto y a largo plazo. A corto plazo, en equilibrio funcional entre los niveles de Hsp70 y la activación de JNK, donde se preserva la sobrevivencia celular o bien a largo plazo, donde el equilibrio se rompe y el estrés sobrepasa los mecanismos adaptativos, y la activación de JNK desencadena la apoptosis. A nivel molecular este balance se basa en la interacción física entre Hsp70 y JNK activado (Basket en *Drosophila*), evitando que la señal mediada por la quinasa JNK y que gatilla la apoptosis se propague

(Gabai y cols., 1997; Gabai y cols., 1998). A partir de los estudios de Gabai y colaboradores (1997, 1998), los autores formularon un modelo de equilibrio entre JNK/Hsp70 que reside en que durante el estrés térmico y oxidativo, JNK fosforilado aumenta progresivamente junto a la síntesis de proteínas Hsp70, la que bloquea la acción pro-apoptótica de JNK activado. Si la cantidad de proteínas denaturadas aumenta considerablemente, las proteínas Hsp70 tendrán menos probabilidad de interactuar con JNK activado, favoreciendo la señal pro-apoptótica si es que ésta se mantiene a largo plazo (Gabai y cols., 1997; Gabai y cols., 1998). Debido a que ambos elementos dependerían de DAXud1, éste podría tratarse de un modulador central o primario de este mecanismo homeostático, en el que inicialmente se impulsaría la síntesis de Hsp70 mediante la transcripción y eventualmente se favorecería la activación de JNK, la que a largo plazo y dependiendo el contexto celular, tendría un efecto pro-apoptótico. Esto se sustenta en que la expresión prolongada de DAXud1 en discos imaginales de ala resulta en la activación de la apoptosis dependiente de la activación de la vía JNK (Glavic y cols., 2009). La cantidad de DAXud1 expresado en las células parece ser gravitante en los procesos de protección celular y de apoptosis. La expresión elevada de DAXud1 inducida mediante el sistema UAS-Gal4 (que genera un aumento de 29 veces en DAXud1, Figura S8) genera un fenotipo de apoptosis y arresto de ciclo celular (Glavic y cols., 2009), mientras que un aumento moderado (de 6,5 veces) no produce tal efecto (Figura S8B, Figura S13). Por otra parte, reducciones en los niveles de DAXud1 producidos por expresión de un ARN interferente sensibilizan a los tejidos y animales a las condiciones de estrés ensayadas (Figuras 8 y 9; Figuras S19, S20 y S21).

## 2.- Función de DAxud1 como activador transcripcional

### 2.1.- ¿Es realmente DAxud1 un activador de la transcripción?

Considerando la información obtenida en este trabajo, se ha observado que DAxud1 participaría en la respuesta a estrés térmico a nivel de activación de la transcripción, ya que durante esta condición ocurre una relocalización de DAxud1::GFP en *loci* que alberga genes de respuesta a estrés (parálogos *hsp70*), adicional al fenotipo de susceptibilidad de animales deficientes en DAxud1 frente a estrés térmico (Figura 8). En las imágenes expuestas en la Figura 13, fue evidente notar que DAxud1::GFP se localiza preferentemente en bandas donde también lo está localizada la ARN Pol Ilo, y usualmente se excluye de bandas teñidas por DAPI. Estas últimas corresponden a *loci* con menor síntesis de ARN, ya que corresponden a cromatina más compactada, cuya mayor densidad de ácido nucleico resulta en un mayor depósito del fluoróforo (Zink y cols., 2003) y por el contrario, los genes activos presentan escasa tinción de DAPI debido a una menor compactación del ADN.

Esta co-distribución de DAxud1 con ARN Polimerasa activa es bastante extensa sobre todos los cromosomas (Figuras 11 y 13), lo que en estas primeras observaciones sugiere que DAxud1 sería una proteína que interviene en la activación de la transcripción de manera generalizada y cuya capacidad de activación dependería tanto del contexto de la cromatina como también posiblemente de modificaciones post-traduccionales de DAxud1. Esta posibilidad de que DAxud1 sea un activador transcripcional, concuerda con los estudios del

ortólogo de ratón de DAXud1 (CSRNP), en que se confirmó mediante ensayos de monohíbrido GAL4-CSRNP que esta proteína de fusión tiene propiedades activadoras de la transcripción del gen reportero luciferasa (Gingras y cols., 2007). Por otra parte, entre los genes que aumentaron su expresión en el análisis transcriptómico (Tabla S3) se encuentra *hsp70Bb*, que también se encuentra en el *locus* 87C en que DAXud1 se relocaliza durante estrés térmico. Esto concuerda con la hipótesis de que DAXud1 correspondería a un activador transcripcional.

Según los datos de DamID, se observó que DAXud1 se localiza en intrones en un 40,1% de los sitios significativamente ocupados, de los cuales un 51,7% se localiza en el primer intrón, lo que no es resultado del azar ya que en *D. melanogaster* el promedio de intrones por gen es de 4,67 (datos de [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)). Un 16,6% de las regiones metiladas por Dam::DAXud1 corresponden a sitios de inicio de transcripción y promotores (+500 y -1000pb desde el sitio de inicio) y un 26,4% a zonas intergénicas, más lejanas a -1000pb desde el inicio de transcripción. Frecuentemente, los intrones albergan sitios de unión para factores de transcripción de tipo activador en genomas eucariontes (Hernández-García y cols., 2014; Bong & Choi, 2015), por lo que esta localización en los genes puede ser un indicador de esta característica, apoyando así el resto de las evidencias presentadas.

Cabe destacar, observando los perfiles metagenómicos, que si bien la mayoría de los *peaks* está dentro de los intrones (40,1%), los *peaks* que están en zonas promotoras e intergénicas presentaron un mayor enriquecimiento de la señal Dam::DAXud1 basado en los valores  $\text{Log}_2(\text{Dam::DAXud1}/\text{Dam})$ . Esto ocurre

porque la señal entre zonas promotoras y zonas intragénicas son de similar magnitud (Figuras 15 y 16). Esto quiere decir que la probabilidad de que la proteína esté en mayor cantidad o tiempo es menor en regiones intrónicas que en zonas intergénicas o promotoras, pero siguen dando un valor estadísticamente significativo.

El perfil metagenómico también sustenta el posible rol de DAXud1 como factor de transcripción por unión en la zona promotora (Figuras 17 y 18), ya que existe una fuerte señal río arriba del inicio de transcripción de los genes. Este perfil fue construido a partir del diagrama de la Figura S4, que grafica el enriquecimiento de Dam::DAXud1 para cada gen, y a partir de estos se realizaron agrupaciones de genes con un patrón similar, lo que se grafica en la Figura 18. Los perfiles muestran que el enriquecimiento de la señal es particularmente alto en zonas río arriba del inicio de transcripción de los genes (promotores), así como una señal de similar magnitud que predomina dentro de los genes. La Figura 17B muestra que Dam::DAXud1 se localiza con una frecuencia inferior en el sitio de inicio de transcripción, lo que sugiere que no formaría parte del complejo de iniciación de la transcripción. La señal en el inicio de transcripción no es cero ni extremadamente baja, pero probablemente se debe a que la técnica de DamID produce señales amplias de poca resolución al comparar con otras técnicas como CHIP-seq y CHIP, pero con la ventaja de no requerir de anticuerpos, ni del aislamiento de tejidos específico para extraer la cromatina (Southall y cols., 2013).

## **2.2 DAXud1 regularía su propia expresión durante estrés crónico**

Se ha observado en mamíferos que los niveles de ARN de los homólogos de DAXud1 no aumentan inmediatamente frente a condiciones de estrés, sino que lo hace a más largo plazo, contrario a lo que ocurre con *hsp70* (Kregel y cols. 2002). La razón de este aumento a largo plazo puede radicar en un mecanismo de auto-regulación positiva mediado por la proteína DAXud1 sobre la transcripción de su gen, aumentando progresivamente a medida que el estímulo estresor se mantiene. Esta inferencia surge de dos observaciones: 1) En el experimento de DamID, se observó que DAXud1 se posiciona de manera significativa en el primer intrón de su gen, y 2) Durante el estrés térmico, a los 20 minutos, DAXud1 sufre relocalizaciones sobre genes de respuesta a estrés sobre genes *hsp70* (Figura 14), posiblemente a raíz de un cambio post-traducciona. Se debe mencionar que no fue posible detectar relocalización de DAXud1 en cromosomas politénicos sobre su mismo *locus* codificante (22E), situación diferente a los *loci hsp70* (87A-87C), en que no sólo hay relocalización de DAXud1, sino también de muchos otros factores que favorecen la síntesis de ARN (Lebedeva y cols., 2005). Además, los genes *hsp70* están en tándem (Figura 14A) lo que favorece la detección de la señal.

Es posible que la falta de detección de DAXud1 en su gen en este tipo de ensayos resulte de la cantidad de proteína reclutada, de la temporalidad del estímulo en este ensayo, o bien de los altos niveles de DAXud1 presentes en el sistema.

La relocalización de DAXud1 durante estrés térmico puede deberse a cambios en su estructura terciaria debido a modificaciones post-traduccionales. En

un primer análisis de la secuencia primaria de DAXud1 de *Drosophila*, se identificó que DAXud1 posee motivos de fosforilación para serina-treonina kinasas (Glavic y cols., 2009). Fosforilaciones en estos sitios podrían ocasionar cambios de afinidad por proteínas o sobre secuencias de ADN específicas. Otra alternativa reside en el hecho de que la secuencia aminoacídica de DAXud1 y también la de sus homólogos en diferentes especies es rica en cisteínas (Ishiguro y cols., 2001; Gingras y cols., 2007). Las proteínas que poseen alta cantidad de cisteínas agrupadas en segmentos definidos son conocidas por ser sensores de estrés, como es el caso de MTF-1 en *Drosophila*, factor de transcripción necesario para la respuesta a estrés de metales pesados, hipoxia y estrés oxidativo, en el cual el motivo **CQCQCAC** actúa como sensor de activación, el que modifica su conformación en condiciones de estrés permitiendo su interacción con los factores de transcripción basales (Günther y cols., 2012), y gatillando la expresión de metalotioneínas y glutatión entre otros (Lichtlen y cols., 2001).

DAXud1 también tiene un grupo en que 6 de las 17 cisteínas de su secuencia de 852 aminoácidos están en la serie **CGCSCREFCDPETCAC**, con un patrón similar al de MTF-1. Es posible que estudiando las modificaciones en esta secuencia se pueda obtener más información sobre un potencial mecanismo de regulación por cambio conformacional de DAXud1 y cómo éste determina las interacciones de DAXud1 en estrés agudo, pudiendo proponer así una explicación para los fenómenos de relocalización observados. Es necesario mencionar que el factor HSF, que también relocaliza en los *loci* de *hsp70* durante estrés térmico, también posee cisteínas que se oxidan tanto en estrés oxidativo como térmico, y estos eventos son necesarios para que relocalice sobre los genes blanco en el

genoma y realice su función de activador de la transcripción (McDuffee y cols., 1997; Ahn & Thiele, 2003).

### **2.3.- DAXud1 se asocia a zonas genómicas con secuencias nucleotídicas vinculadas a promotores de estrés térmico**

En un estudio mencionado previamente (Gingras y cols., 2007), se encontró mediante la técnica *in vitro* SELEX la secuencia consenso AGAGTG como posible motivo de unión de CSRNP. Sin embargo, en las 10 primeras secuencias consenso identificadas por la técnica de DamID (Figura 19), no se halló ninguna secuencia similar. Esta discrepancia puede deberse a que ambas secuencias se obtuvieron por métodos diferentes, siendo SELEX una técnica *in vitro* y de ensayo directo de la interacción ADN-Proteína, mientras que con la técnica DamID se identificaron las regiones genómicas que más frecuenta DAXud1 en el contexto de la cromatina. Estas discrepancias se han reportado para varios factores de transcripción, los cuales *in vivo* conservan su propiedad de unión a una cadena con determinada secuencia nucleotídica, pero debido a otras proteínas de la cromatina pueden unir otras secuencias nucleotídicas no detectables por técnicas *in vitro* (Jolma y cols., 2015). Por otra parte, en eucariontes se han identificado factores de transcripción que se unen a más de una secuencia nucleotídica, lo que amplía tanto las posibilidades de activación de genes como de confusión para los algoritmos de identificación de motivos (Bailey, 2011; Mathelier y cols., 2014; Jolma y cols., 2015).

La técnica DamID no facilita la identificación de motivos nucleotídicos de unión de factores de transcripción ya que impone una dificultad para los algoritmos debido a que las secuencias obtenidas pueden superar las 3 kilobases (van Steensel y cols., 2000). Esto depende tanto de las secuencias GATC adyacentes (que pueden alcanzar separaciones de más de 3 kb), como del empaquetamiento de la cromatina que puede interferir en la metilación de la adenina, y por lo tanto, ampliar las zonas de posible posicionamiento (Li y cols., 2015). Por otra parte, en el contexto nuclear, los factores de transcripción pueden sufrir modificaciones post-traduccionales de manera localizada, provocando cambios en su conformación. Esto es producto de la combinación de señalizaciones dentro de la célula, con la consecuencia de variar la afinidad por determinadas secuencias de ADN (Badis y cols., 2009).

Respecto a las secuencias nucleotídicas encontradas, como se mencionó anteriormente, la secuencia RTACATAY fue la más recurrente (Figura 19). En la búsqueda en bases de datos de secuencias génicas en *Drosophila* (programa en línea GOMO) esta secuencia se encuentra en los promotores de genes relacionados con la respuesta a estrés térmico (Tabla 10), reforzando los datos obtenidos de cromosomas politénicos y los fenotipos relacionados con estrés térmico. Esta secuencia también fue encontrada por la herramienta de alineamiento de HOMER (Heinz y cols., 2010), pero el algoritmo de este programa la identificó con una pequeña variación (AYATACATAY).

La segunda secuencia más recurrente fue ATAWATAW, que tiene recurrencia en promotores de genes relacionados con respuesta a patógenos

según el análisis de GOMO. Se ha reportado que uno de los parálogos de DAXud1 en ratón, CSRNP1, aumenta su expresión en macrófagos frente a la activación de la vía Toll-like, sugiriendo que tiene participación en inmunidad innata (McDermott y cols., 2012).

La última secuencia consenso, ACACACDY, está muy representada en promotores de genes que intervienen en el desarrollo del cordón ventral neural, tejido que expresa DAXud1 durante su formación (Figura 2). También se ha descrito en pez cebra que sus ortólogos *Csrnp1a* y *Csrnp1b* se expresan en zonas progenitoras del sistema nervioso central del embrión, restringiéndose al cerebro en estadio larvario (Feijoo y cols., 2009).

Si bien existen más secuencias identificadas mediante los análisis de los resultados DamID (Figura 17), sería necesario un experimento de EMSA con la proteína DAXud1 recombinante y oligonucleótidos de estas secuencias candidatas para determinar si ocurre una interacción directa preferente o bien un ensayo de gen reportero con estas potenciales secuencias regulatorias incorporadas en el promotor para evaluar sus efectos directos sobre la transcripción *in vivo*.

### **3.- Interacciones de DAXud1 con otros elementos de la cromatina**

#### **3.1.- Posible interacción de DAXud1 con Spt5, factor de elongación general**

La condición de estrés térmico induce una respuesta transcripcional rápida para sintetizar proteínas chaperonas Hsp (Kregel y cols., 2002). Esta respuesta es visible en cromosomas politénicos a través de inmunofluorescencias para ciertos

factores de transcripción y remodeladores de cromatina (Lis y cols., 2000; Zhimulev y cols., 2004; Levedeba y cols., 2005). Una proteína con la que podría interactuar directamente y que a la vez da luces sobre el rol de DAXud1 en la transcripción, es Spt5. Esta proteína forma parte del complejo de elongación DSIF (Hartzog y cols., 2013), el cual experimenta relocalización sobre los *loci* 87A y 87C (Andrulis y cols., 2000; Missra y cols., 2010) durante estrés térmico, del mismo modo que lo hace DAXud1 (Figura 13). Esta posibilidad de interacción está adicionalmente reforzada por información en bases de datos de experimentos de interacciones proteicas, hechas a gran escala ([www.thebiogrid.org](http://www.thebiogrid.org)) a partir de experimentos de doble híbrido (Chatr-Aryamontri., y cols., 2015) y también debido a que el fenotipo de ganancia de función de DAXud1 se suprime en animales mutantes heterocigotos para *spt5* (*spt5*<sup>+/-</sup>; Figura S5).

Una posibilidad sobre cómo se podría dar esta interacción física y funcional es que DAXud1 se posicione en la región promotora o en una secuencia *enhancer* de algún gen blanco, requiriendo reclutar a Spt5 y a otros elementos a la ARN Polimerasa Ilo para su eficiente activación. Este fenómeno en que Spt5 necesita de la interacción con factores de transcripción para poder situarse en la región promotora y en el inicio de transcripción de un determinado gen se ha documentado a partir de observaciones en *Drosophila* (Zhu y cols., 2007).

#### **4.- DAXud1 interacciona física y genéticamente con Caudal**

Para avanzar en comprender la función de DAXud1 en las células en proliferación del disco imaginal se buscaron nuevas interacciones con otras

proteínas en este contexto. La inmunoprecipitación, y aislamiento de bandas de proteínas para posterior estudio por espectrometría de masa fue un ensayo de utilidad (Figura S1), ya que se encontraron el factor de transcripción Caudal y las proteínas CG8003 y 14-3-3z (Tabla S1). No se logró identificar a Spt5 entre las bandas que podría corresponder a su tamaño (117 KD); pero dados los antecedentes arrojados en el presente trabajo, es posible que esta interacción sea detectable durante estrés térmico o bien sea muy transitoria.

Caudal, es un factor de transcripción que en el desarrollo temprano del embrión de *Drosophila* participa en la definición del eje antero-posterior del mismo (Mlodzik & Gehring, 1987). La interacción entre Caudal y DAXud1 identificada por el estudio de espectrometría de masa también se observó a nivel funcional, ya que el fenotipo de ala aberrante inducido en la condición de ganancia de función de DAXud1 es suprimido al co-expresar un interferente contra Caudal (Figura S3).

Con la información de la posible interacción con Caudal, se buscaron dentro de las secuencias en que se localiza DAXud1 secuencias similares a los motivos de unión de Caudal. Se encontró una secuencia (Figura S4), que se encuentra en 775 de las 1589 secuencias de *peaks* para DAXud1 analizadas (Figura 19). El resultado de este análisis refuerza la hipótesis de que DAXud1 y Caudal podrían interactuar en la cromatina para regular la expresión génica de manera conjunta y sinérgica.

#### **4.1.- DAXud1 tendría un rol sinérgico con Caudal en hematopoyesis temprana y expansión de neuroblastos**

Respecto a la posibilidad de que DAXud1 y Caudal actúen en conjunto, estudios en pez cebra han demostrado que tanto la pérdida de función de *csrpn1a* (ortólogo de DAXud1) como de *cdx4* (ortólogo de Caudal), inducida por morfolinós, generan un fenotipo de disminución de células hematopoyéticas como resultado de una baja tasa de proliferación de los progenitores por reducida expresión de *gata1* (Espina y cols., 2013; Paik y cols., 2010). Esta concurrencia de fenotipos en el mismo proceso, junto a la evidencia de interacciones mencionada anteriormente, refuerzan la posibilidad de que ambas proteínas actúen de manera conjunta en este proceso en vertebrados, posibilitando a que esta interacción esté conservada en la evolución. Aunque, no hay evidencia que ambos factores de transcripción sean activadores de la transcripción de *gata1* en *Drosophila melanogaster*.

Bajo el contexto de diferenciación celular, se ha demostrado que tanto Axud1 (Simoés-Costa y cols., 2015), como Caudal (Revisado en Lengerke y cols., 2012) presentan una mayor expresión en desarrollo de cresta y tubo neural en vertebrados al estar activa la señalización Wnt. Cabe destacar que ambos genes tienen alta expresión en el centro del disco imaginal de ala (Glavic y cols., 2009; Graveley y cols., 2011), pudiendo ambas proteínas participar en procesos de morfogénesis y diferenciación en tejidos en desarrollo. Los estudios en animales que revelaron un rol en el desarrollo de linaje neural se realizaron en pez cebra, en desarrollo de cerebro (Feijoó y cols., 2009) y en pollo, donde se observó un rol fundamental en diferenciación y migración de las células de la cresta neural (Simoés-Costa, 2015). Consistente con lo anterior el experimento de DamID arrojó genes que pudieron ser agrupados en la categoría funcional desarrollo neural

(Tabla 8); y otros que forman parte de rutas de señalización que son esenciales para el desarrollo de linajes neurales del sistema nervioso central en animales y en el cordón ventral de *Drosophila* como Wg, Hh y TGF-Beta (Bossing y cols., 2006). Esto último es concordante con un análisis de ARN-seq realizado para la ganancia de función de DAxud1, en que las vías de señalización de Wg y TGF-beta están representadas en los genes que aumentaron su expresión en ganancia de función de DAxud1 (Tablas S6 y S7). Aún no hay estudios de Caudal que den información genómica a partir de secuenciación masiva, pero si los hubiese, esa información puede ser cruzada para postular a los genes más probables de ser regulados en conjunto por DAxud1 y Caudal.

## **5.- Rol de DAxud1 en procesos diferentes a la respuesta a estrés**

### **5.1.- Localización de DAxud1 sobre otros genes no relacionados con estrés térmico**

Si bien hasta ahora, DAxud1 se ha vinculado con un proceso fisiológico puntual, que es la activación de transcripción de genes necesarios para la respuesta a estrés térmico, posiblemente DAxud1 sea necesario en la transcripción de otros genes y la regulación de otros procesos fisiológicos como lo evidencia su extensa distribución en los cromosomas politénicos (Figura 10).

El programa HOMER tiene la opción de tomar las coordenadas de cada *peak* y asociarlo con genes considerando su promotor (-1kb y su secuencia de transcrito). De ahí se generó una lista de genes que fueron ingresados a la base de datos STRING, que relaciona los genes en grupos de funcionalidad biológica

(Gene Ontology, GO). Particularmente, se hizo énfasis en procesos biológicos y en vías de señalización que revelen también un rol fisiológico (Tablas 8 y 9).

Las categorías con que más se asociaron los genes anotados fueron las relacionadas con neurogénesis y morfogénesis de epitelio (Tabla 8), siendo la más interesante la que está vinculada a la generación de neuronas, ya que el tercer motivo con mayor incidencia en los *peaks* está vinculado a genes que participan en el desarrollo de cordón ventral neural. Además de ello, también se observó que DAXud1 se expresa en el cordón ventral neural durante su desarrollo (Figura 2). Esto también está en concordancia con lo observado en vertebrados, ya que se expresa en el SNC durante su desarrollo aportando posiblemente a la expansión y diferenciación de progenitores neurales tanto en cerebro como en la cresta neural (Feijoo y cols., 2009; Simoes-Costa y cols., 2015).

Al analizar rutas de señalización celular en las que participan los genes identificados por cercanía de la unión de DAXud1, se obtuvo como resultado rutas de oxidación de ácidos grasos y TGF-beta (Dpp en *Drosophila*), ésta última también se relaciona con neurogénesis, y definición de cordón neural ventral (Staebling-Hampton y cols., 1994; Rusten y cols., 2002). Además, la activación de la vía dpp/TGF-Beta, también activa la apoptosis, mediante la vía p38, que en situaciones de estrés también es activada (Adachi-Yamada y cols., 1999).

Esta relación de DAXud1 con TGF-beta también se ha observado en mamíferos, ya que se determinó que los niveles de los ortólogos de DAXud1 (CSRNPs) aumentan su expresión frente a estimulación de la vía TGF-beta en cultivos de células humanas A549 (Fang y cols., 2013). Esto sugiere que CSRNPs

pueden corresponder a efectores de la vía, y que las proteínas Axud1 producen un *feed-back* positivo de la vía TGF-beta (Fang y cols., 2013). Cabe destacar que estas asociaciones con apoptosis apoyan la idea inicial de que DAXud1 es un gen con actividad supresora de tumores (Glavic y cols., 2009).

## **5.2.- DAXud1 como supresor de tumores**

El primer estudio sobre el ortólogo de humanos de DAXud1 (AXUD1), muestra que este gen presenta una menor expresión en tumores respecto al tejido sano (Ishiguro y cols., 2001). Es posible que el potencial rol de AXUD1 como supresor de tumores este asociado a su capacidad de activar la vía JNK en otros modelos (Glavic y cols., 2009; Korb y cols., 2016), señalización conocida por activar la apoptosis durante el desarrollo de tejidos (Willsey y cols., 2016) y en condiciones de estrés celular de diferente tipo (Wu y cols., 2009). Durante este trabajo, obtuvimos evidencia que DAXud1 activa la transcripción de genes *hsp*, necesarios para la tolerancia de la célula a diferentes tipos de agresiones abióticas, por lo que DAXud1 tendría un rol inicial adaptativo.

Según el estudio de Ishiguro y colaboradores (2001), muchos tumores humanos tienen una delección en la región cromosómica 3p22, sector en que se encuentra el ortólogo humano de DAXud1, y que además presentan una disminución significativa del ARNm de este gen. Adicionalmente, se encontró que aumentar la expresión de AXUD1 mediante transfección en células de cáncer de colon, estas disminuyen su tasa proliferativa y entran en apoptosis (Ishiguro y cols., 2001). Por tanto, se postuló como un gen supresor de tumores con una

implicación directa sobre el ciclo celular. Sin embargo, los resultados presentados en esta tesis muestran que posiblemente su rol en la homeostasis de los tejidos no sería directamente ejercido por una capacidad de suprimir el ciclo celular, sino que actuaría como un factor central de respuesta a estrés modulando la expresión de chaperonas y solo durante estrés crónico activaría la señalización pro-apoptótica JNK que bloquean la progresión del ciclo celular e induciría la apoptosis.

## CONCLUSIONES

- 1.- La deficiencia de DAXud1 produce fenotipos de sensibilidad a estrés térmico y oxidativo.
- 2.- DAXud1 es una proteína que se encuentra en el núcleo asociado a la cromatina, en un patrón de bandeado que tiene tendencia a co-distribuir con ARN-Polimerasa II activada en cromosomas politénicos de glándula salival.
- 3.- Durante el estrés térmico DAXud1 relocaliza a los *loci* 87A y 87C, que albergan genes parálogos de *hsp70*.
- 4.- DAXud1 se posiciona frecuentemente en zonas del genoma con función regulatoria de la expresión génica, y enriquecidas en la secuencia RTACATAY, secuencia que se encuentra presente en todos los genes *hsp70*.

## PROYECCIONES

Durante el presente trabajo de tesis se demostró que DAXud1 tiene un rol esencial en la tolerancia a estrés, al ser uno de los mediadores de la transcripción rápida de genes Hsp70. Debido a que las proteínas Hsp70 ejercen un rol fundamental en la tolerancia a variados tipos de estrés, será necesario evaluar varios tipos de estrés para posicionar a DAXud1 como un regulador central de la respuesta transcripcional al estrés celular de forma general. A su vez, será necesario realizar inmunoprecipitaciones de cromatina en secuencias específicas del genoma, información que estará guiada por los datos obtenidos del experimento de DamID.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ahamed, M., Posgai, R., Gorey, T. J., Nielsen, M., Hussain, S. M., & Rowe, J. J. 2010. Silver nanoparticles induced heat shock protein 70, oxidative stress and apoptosis in *Drosophila melanogaster*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 242(3), 263–269.
- Ahn, S., & Thiele, D. 2003. Redox regulation of mammalian heat shock factor 1 is essential for Hsp gene activation and protection from stress. *Genes & Development*, 516–528.
- Aldaz, S., & Escudero, L. M. 2010. Imaginal discs. *Current Biology*, 20(10), 429–431.
- Andrulis ED, Guzman E, Doring P, Werner J, Lis JT. 2000. High-resolution localization of *Drosophila* Spt5 and Spt6 at heat shock genes in vivo: Roles in promoter proximal pausing and transcription elongation. *Genes Dev* 14:2635–2649.
- Ashburner, M., & Bonner, J.J. 1979. The induction of gene activity in *Drosophila* by heat shock. *Cell* 17, 241–254.
- Azad, P., Ryu, J., & Haddad, G. G. 2011. Distinct role of Hsp70 in *Drosophila* hemocytes during severe hypoxia. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(2), 530–538.
- Badis, G., Berger, M. F., Philippakis, A. A., Talukder, S., Gehrke, A. R., Jaeger, S. A., Bulyk, M. L. 2009. Diversity and complexity in DNA recognition by transcription factors. *Science*, 324(5935), 1720–1723.
- Bailey, T. L. 2011. DREME: Motif discovery in transcription factor ChIP-seq data. *Bioinformatics*, 27(12), 1653–1659.
- Baker, B. S., & Belote, J. M. 1983. Sex determination and dosage compensation in *Drosophila melanogaster*. *Ann. Rev. Genet.*, 17, 345–393.
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120.
- Brownlie A, Hersey C, Oates AC, Paw BH, Falick AM. 2003. Characterization of embryonic globin genes of the zebrafish. *Dev Biol* 255: 48–61.

- Bruce, J. L., Price, B. D., Coleman, C. N., & Calderwood, S. K. 1993. Oxidative Injury Rapidly Activates the Heat Shock Transcription Factor but Fails to Increase Levels of Heat Shock Proteins. *Cancer Research*, 53, 13–24.
- Calderwood, S. K., Xie, Y., Khaleque, M. A., Chou, S. D., Murshid, A., Prince, T., & Zhang, Y. 2010. Signal Transduction Insights signal Transduction pathways Leading to Heat shock Transcription. *Signal Transduction Insights* 2010:2 13–24.
- Cheng, Z., Zhao, H., Ze, Y., Su, J., Li, B., Sheng, L. Hong, F. 2013. Gene-expression changes in cerium chloride-induced injury of mouse hippocampus. *PloS One*, 8(4), e60092.
- Contrino, S., Smith, R. N., Butano, D., Carr, A., Hu, F., Lyne, R., Micklem, G. 2012. modMine: flexible access to modENCODE data. *Nucleic Acids Research*, 40(Database issue), D1082-8.
- Coote, P. J., Cole, M. B., & Jones, M. V. 1991. Induction of increased thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae* may triggered by a mechanism involving intracellular pH. *Journal of General Microbiology*, 137(7), 1701–1708.
- Courgeon, A.M., Maisonhaute, C., & Best-Belpomme, M. 1984. Heat shock proteins are induced by cadmium in *Drosophila* cells. *Exp. Cell Res.* 153, 515–521.
- De Oliveira, M. V., Oliveira, A. C. D. F., Shida, C. S., de Oliveira, R. C., & Nunes, L. R. 2013. Gene expression modulation by paraquat-induced oxidative stress conditions in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 60, 101–9
- Diercke, K., Kohl, A., Lux, C. J., & Erber, R. 2014. Compression of human primary cementoblasts leads to apoptosis. A possible cause of dental root resorption. *Ursache für Wurzelresorptionen*, (6), 430–445.
- Djordjevic, M. 2007. SELEX experiments: new prospects, applications and data analysis in inferring regulatory pathways. *Biomolecular Engineering*, 24(2), 179–89.
- Donati, Y. R., Slosman, D. O., & Polla, B. S. 1991. Oxidative injury and the heat shock response. *Biochem. Pharmacol.*, 40: 2571-2577. 1990.
- El Golli-Bennour, E., & Bacha, H. 2011. Hsp70 expression as biomarkers of oxidative stress: Mycotoxins' exploration. *Toxicology*, 287(1–3), 1–7.

- Espina, J., Feijóo, C. G., Solís, C., & Glavic, A. 2013. Csrnp1a Is Necessary for the Development of Primitive Hematopoiesis Progenitors in Zebrafish. *PloS One*, 8(1), e53858.
- Fang D, Li Soungyu L, Xu Wanfu, KE zhiyong, Z. F. 2013. AXIN-related CSRNP1 mRNA expression and its transcriptional regulator TGF- $\beta$ 1 induced tumor cells. *J South Med Univ*, 33(8), 1122–1126. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-4254.2013.08.05>
- Feijóo, C. G., Sarrazin, A. F., Allende, M. L., & Glavic, A. 2008. Cystein-serine-rich nuclear protein 1, axud1/Csrnp1, is essential for cephalic neural progenitor proliferation and survival in zebrafish. *Developmental Dynamics*, 238(8), 2034–2043.
- Gabai, V., Meriin, A., & Mosser, D. 1997. Hsp70 prevents activation of stress kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 272(29), 18033–18037.
- Gabai, V. L., Meriin, A. B., Yaglom, J. A., Volloch, V. Z., & Sherman, M. Y. 1998. Role of Hsp70 in regulation of stress-kinase JNK: Implications in apoptosis and aging. *FEBS Letters*, 438(1–2), 1–4.
- Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., Botstein, D., and Brown, P.O. 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell* 11, 4241–4257
- Gingras, S., Pelletier, S., Boyd, K., & Ihle, J. N. 2007. Characterization of a family of novel cysteine- serine-rich nuclear proteins (CSRNP). *PloS One*, 2(8), e808.
- Glavic, A., Molnar, C., Cotoras, D., & de Celis, J. F. 2009. Drosophila Axud1 is involved in the control of proliferation and displays pro-apoptotic activity. *Mechanisms of Development*, 126(3–4), 184–97.
- Gong, W. J., & Golic, K. G. 2004. Genomic deletions of the Drosophila melanogaster hsp70 genes. *Genetics*, 168(3), 1467–1476.
- Gonda, R. L., Garlena, R. A., & Stronach, B. 2012. Drosophila heat shock response requires the jnk pathway and phosphorylation of mixed lineage kinase at a conserved serine-proline motif. *PLoS ONE*, 7(7).
- Graveley, B.R., May, G., Brooks, A.N., Carlson, J.W., Cherbas, L., Davis, C.A., Duff, M., Eads, B., Landolin, J., Sandler, J., Wan, K.H., Andrews, J., Brenner, S.E., Cherbas, P., Gingeras, T.R., Hoskins, R., Kaufman, T., Celniker, S.E. 2011. The D. melanogaster transcriptome: modENCODE RNA-Seq data for dissected tissues. Base de datos: <http://www.modencode.org/celniker/>

- Günther, V., Lindert, U., & Schaffner, W. 2012. The taste of heavy metals: Gene regulation by MTF-1. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1823(9), 1416–1425.
- Hang, S., & Gergen, J. P. 2017. Different modes of enhancer-specific regulation by Runt and Even-skipped during *Drosophila* segmentation. *Molecular Biology of the Cell*, 28(5), 681–691.
- Hartzog, G. A., & Fu, J. 2013. The Spt4–Spt5 complex: A multi-faceted regulator of transcription elongation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(1), 105–115.
- Heinz S, Benner C, Spann N, Bertolino. 2010. Simple Combinations of Lineage-Determining Transcription Factors Prime cis-Regulatory Elements Required for Macrophage and B Cell Identities. *Mol Cell* 28;38(4):576-589.
- Hightower, L. E. 1991. Heat Shock , Stress Proteins , Chaperones , and Proteotoxicity, 66, 191–197.
- Housby JN, Cahill CM, Chu B. 1999. Non steroidal antiinflammatory drugs inhibit the expression of cytokines and induce HSP70 in human monocytes. *Cytokine*. 1999;11:347–58.
- Ishiguro, H., Tsunoda, T., Tanaka, T., Fujii, Y., Nakamura, Y., & Furukawa, Y. 2001. Identification of AXUD1, a novel human gene induced by AXIN1 and its reduced expression in human carcinomas of the lung, liver, colon and kidney. *Oncogene*, 20, 5062–5066.
- Jamrich, M., Greenleaf, a L., & Bautz, E. K. 1977. Localization of RNA polymerase in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *PNAS*, 74(5), 2079–83.
- Jennings, B. H. 2011. *Drosophila*-a versatile model in biology & medicine. *Materials Today*, 14(5), 190–195.
- Johansen, K. M., Cai, W., Deng, H., Bao, X., Zhang, W., Girton, J., & Johansen, J. 2009. Polytene chromosome squash methods for studying transcription and epigenetic chromatin modification in *Drosophila* using antibodies. *Methods*, 48(4), 387–97.
- Jolma, A., Yin, Y., Nitta, K. R., Dave, K., Popov, A., Taipale, M. Taipale, J. 2015. DNA-dependent formation of transcription factor pairs alters their binding specificity. *Nature*, 527(7578), 384–8.
- Kaarniranta, K., Elo, M., Sironen, R., Lammi, M. J., Goldring, M. B., Eriksson, J. E., Helminen, H. J. 1998. Hsp70 accumulation in chondrocytic cells exposed to



high continuous hydrostatic pressure coincides with mRNA stabilization rather than transcriptional activation. *PNAS*, 95, 2319–2324.

Korb, K., Katsikogianni, E., Zingler, S., Daum, E., Lux, C. J., Hohenstein, A., & Erber, R. 2016. Inhibition of AXUD1 attenuates compression-dependent apoptosis of cementoblasts. *Clinical Oral Investigations*, 20(9), 2333–2341.

Kregel, K. C., & Sieck, G. C. 2002. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *Journal of Applied Physiology*, 89(4), 1253–1254.

Kuraishi, T., Binggeli, O., Opota, O., Buchon, N., & Lemaitre, B. 2011. Genetic evidence for a protective role of the peritrophic matrix against intestinal bacterial infection in *Drosophila melanogaster*. *PNAS*, 108(38), 15966–71.

Lakhotia, S. C., & Prasanth, K. V. 2002. Tissue- and development-specific induction and turnover of hsp70 transcripts from loci 87A and 87C after heat shock and during recovery in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Experimental Biology*, 205, 345–358.

Langmead, B., & Salzberg, S. L. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9(4), 357–359.

Hightower, L. E. 1991. Heat Shock , Stress Proteins , Chaperones , and Proteotoxicity, 66, 191–197.

Lebedeva, L. a, Nabirochkina, E. N., Kurshakova, M. M., Robert, F., Krasnov, A. N., Evgen'ev, Tora, L. 2005. Occupancy of the *Drosophila* hsp70 promoter by a subset of basal transcription factors diminishes upon transcriptional activation. *PNAS*, 102(50), 18087–18092.

Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N Durbin, R. 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16), 2078–2079.

Li, R., Hempel, L. U., & Jiang, T. 2015. A non-parametric peak calling algorithm for DamID-Seq. *PLoS ONE*, 10(3), 1–12.

Lichtlen, P., Wang, Y., Belser, T., Georgiev, O., Certa, U., Sack, R., & Schaffner, W. 2001. Target gene search for the metal-responsive transcription factor MTF-1. *Nucleic Acids Research*, 29(7), 1514–1523.

Lindquist, S. 1986. The heat-shock response. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 1151–1191.

- Lis JT, Mason P, Peng J, Price DH, Werner J. 2000. p-TEFb kinase recruitment and function at heat shock loci. *Genes Dev.* 14:792–803.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408.
- Luukkonen, B. G., Tan, W., & Schwartz, S. 1995. Efficiency of reinitiation of translation on human immunodeficiency virus type 1 mRNAs is determined by the length of the upstream open reading frame and by intercistronic distance. *Journal of Virology*, 69(7), 4086–94.
- Ma, Q. 2010. Transcriptional responses to oxidative stress: Pathological and toxicological implications. *Pharmacology and Therapeutics*, 125(3), 376–393.
- Marshall, O. J., & Brand, A. H. 2015. Damidseq-pipeline: An automated pipeline for processing DamID sequencing datasets. *Bioinformatics*, 31(20), 3371–3373.
- Mathelier, A., Zhao, X., Zhang, A. W., Parcy, F., Worsley-Hunt, R., Arenillas, D. J., Wasserman, W. W. 2014. JASPAR 2014: An extensively expanded and updated open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), 142–147.
- Mayer, M. P., & Bukau, B. 2005. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(6), 670–684.
- McDermott, J. E., Vartanian, K. B., Mitchell, H., Stevens, S. L., Sanfilippo, A., & Stenzel-Poore, M. P. 2012. Identification and validation of ifit1 as an important innate immune bottleneck. *PloS One*, 7(6), e36465.
- McDuffee, A. T., Senisterra, G., Huntley, S., Lepock, J. R., Sekhar, K. R., Meredith, M. J., Freeman, M. L. 1997. Proteins containing non-native disulfide bonds generated by oxidative stress can act as signals for the induction of the heat shock response. *Journal of Cellular Physiology*, 171(2), 143–151.
- Mi, H., Muruganujan, A., Casagrande, J. T., & Thomas, P. D. 2013. Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. *Nature Protocols*, 8(8), 1551–1566.
- Michel, G.P., & Starka, J. 1986. Effect of ethanol and heat stresses on the protein pattern of *Zyomonas mobilis*. *J. Bacteriol.* 165, 1040–1042.
- Missra, A., & Gilmour, D. S. 2010. Interactions between DSIF (DRB sensitivity inducing factor), NELF (negative elongation factor), and the *Drosophila* RNA polymerase II transcription elongation complex. *PNAS*, 107(25), 11301–6.

- Morimoto IR., & Santoro GM. 1998. Stress-inducible responses and Heat shock proteins: New pharmacologic targets for cytoprotection. *Nature*, 16(1998), 833-838.
- Moreno, E., Yan, M., & Basler, K. 2002. Evolution of TNF signaling mechanisms: JNK-dependent apoptosis triggered by Eiger, the *Drosophila* homolog of the TNF superfamily. *Current Biology*, 12(14), 1263–1268.
- Nagata, Y., Todokoro, K. 1999. Requirement of activation of JNK and p38 for environmental stress-induced erythroid differentiation and apoptosis and of inhibition inhibition of ERK for apoptosis. *Blood* 94, 853–863.
- Ni, Z., Schwartz, B. E., Werner, J., Suarez, J. R., & Lis, J. T. 2004. Coordination of Transcription, RNA Processing, and Surveillance by P-TEFb Kinase on Heat Shock Genes. *Molecular Cell*, 13(1), 55–65.
- Noselli, S., & Agnès, F. 1999. Roles of the JNK signaling pathway in *Drosophila* morphogenesis. *Current Opinion in Genetics & Development*, 9(4), 466–72.
- Park, Y., Caldwell, M. C., & Datta, S. 1997. Mutation of the central nervous system neuroblast proliferation repressor *ana* leads to defects in larval olfactory behavior. *Journal of Neurobiology*, 33(2), 199–211.
- Pasovic, L., Eidet, J. R., Olstad, O. K., Chen, D. F., Lyberg, T., & Utheim, T. P. 2016. Impact of Storage Temperature on the Expression of Cell Survival Genes in Cultured ARPE-19 Cells. *Current Eye Research*, 3683, 1–11.
- Pearson, J. C., Juarez, M. T., Kim, M., Drivenes, O., & McGinnis, W. 2009. Multiple transcription factor codes activate epidermal wound-response genes in *Drosophila*. *PNAS*, 106(7), 2224–2229.
- Pietenpol, J. a, & Stewart, Z. 2002. Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology*, 181–182, 475–81.
- Piskacek, S., Gregor, M., Nemethova, M., Grabner, M., Kovarik, P., & Piskacek, M. 2007. Nine-amino-acid transactivation domain: establishment and prediction utilities. *Genomics*, 89(6), 756–68.
- Price BD, Calderwood SK. 1999. Calcium is essential for multistep activation of the heat shock factor in permeabilized cells. *Mol Cell Biol*. 1991;11:3365–8.
- Quinlan, A. R. 2014. BEDTools: The Swiss-Army Tool for Genome Feature Analysis. In *Current Protocols in Bioinformatics* (Vol. 2014, p. 11.12.1-11.12.34). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.

- Ramírez, Fidel, Devon P. Ryan, Björn Grüning, Vivek Bhardwaj, Fabian Kilpert, Andreas S. Richter, Steffen Heyne, Friederike Dündar, & Thomas Manke. 2016. deepTools2: A next Generation Web Server for Deep-Sequencing Data Analysis. *Nucleic Acids Research*, 44 (W1): W160-W165
- Redza-Dutordoir, M., & Averill-Bates, D. A. 2016. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1863(12), 2977–2992.
- Ribeil, J.-A., Zermati, Y., Vandekerckhove, J., Cathelin, S., Kersual, J., Dussiot, M., Hermine, O. 2007. Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1. *Nature*, 445(7123), 102–5.
- Richter, K., Haslbeck, M., & Buchner, J. 2010. The Heat Shock Response: Life on the Verge of Death. *Molecular Cell*, 40(2), 253–266.
- Ritossa, F.M. 1962. A new puffing pattern induced by a temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18, 571–573.
- Rossi, M. N., & Antonangeli, F. 2015. Cellular Response upon Stress: P57 Contribution to the Final Outcome. *Mediators of Inflammation*, 259325.
- Saunders, A., Werner, J., Andrulis, E. D., Nakayama, T., Hirose, S., Reinberg, D., & Lis, J. T. 2003. Tracking FACT and the RNA polymerase II elongation complex through chromatin in vivo. *Science*, 301(5636), 1094–1096.
- Simoës-Costa, M., Stone, M., & Bronner, M. E. 2015. Axud1 integrates Wnt signaling and transcriptional inputs to drive neural crest formation. *Dev Cell*, 14(5), 544-554.
- Sorger, P. K. 1991. Heat shock factor and the heat shock response. 1990. *Cell* 65, 363–366.
- Southall, T. D., Gold, K. S., Egger, B., Davidson, C. M., Caygill, E. E., Marshall, O. J., & Brand, A. H. 2013. Cell-type-specific profiling of gene expression and chromatin binding without cell isolation: assaying RNA Pol II occupancy in neural stem cells. *Developmental Cell*, 26(1), 101–12.
- Staebling-Hampton, K., Hoffmann, F. M., Baylies, M. K., Rushton, E., & Bate, M. 1994. dpp induces mesodermal gene expression in *Drosophila*. *Nature*, 372(6508), 783–786.
- Su, Y. C., Treisman, J. E., & Skolnik, E. Y. 1998. The *Drosophila* Ste20-related kinase misshapen is required for embryonic dorsal closure and acts through a JNK MAPK module on an evolutionarily conserved signaling pathway. *Genes and Development*, 12(15), 2371–2380.

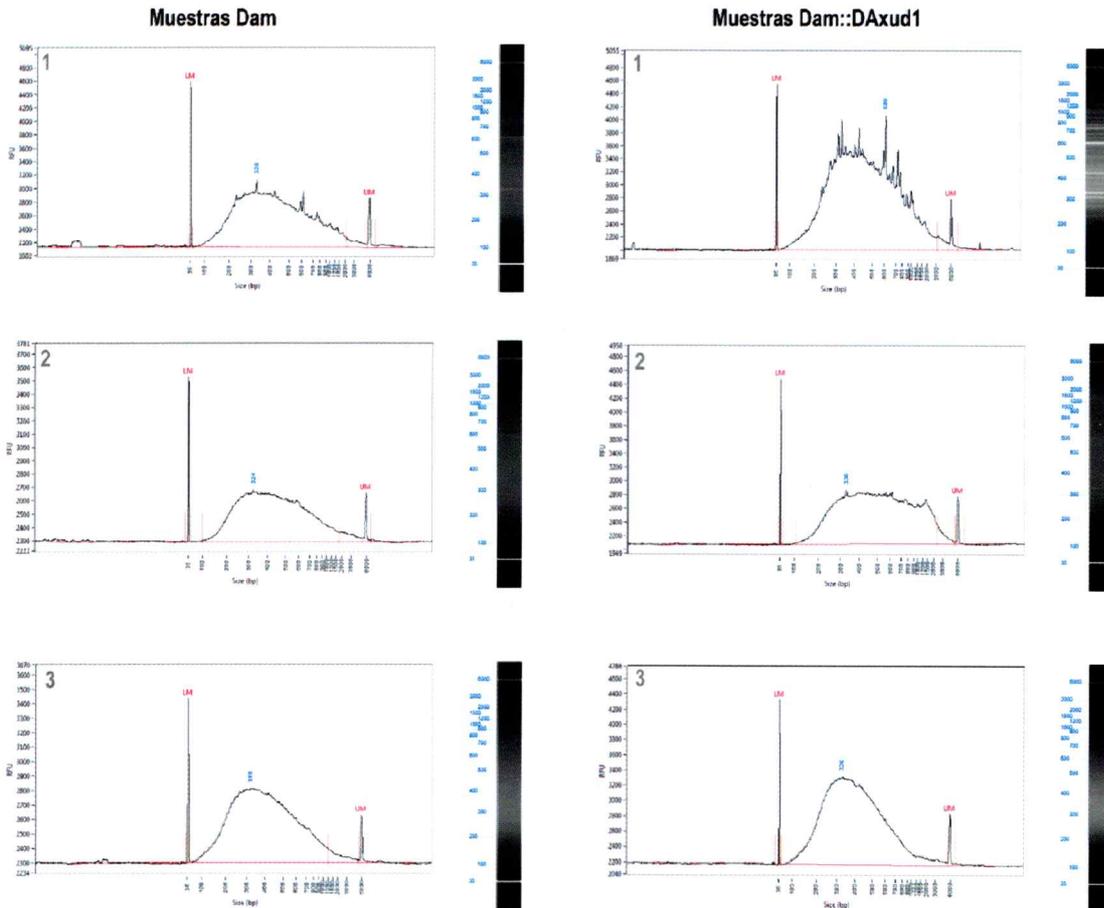
- Taneda T, Zhu W, Cao Q, Watanabe H, Yamaguchi Y. 2011. Erythropoiesis is regulated by the transcription elongation factor Foggy/Spt5 through gata1 gene regulation. *Genes Cells* 16: 231–242.
- Tang, S., Chen, H., Cheng, Y., Nasir, M., Kemper, N., & Bao, E. 2015. The interactive association between heat shock factors and heat shock proteins in primary myocardial cells subjected to heat stress. *International Journal of Molecular Medicine*, (17), 56–62.
- Tateno, M. 2000. Regulation of JNK by Src During *Drosophila* Development. *Science*, 287(5451), 324–327.
- van Steensel, B., & Henikoff, S. 2000. Identification of in vivo DNA targets of chromatin proteins using tethered dam methyltransferase. *Nature Biotechnology*, 18(4), 424–428.
- Wallen ES, Buettner GR, and Moseley PL. 1997. Oxidants differentially regulate the heat shock response. *Int J Hyperthermia* 13: 517–524.
- Welch, W.J., and Suhan, J.P. 1986. Morphological study of the mammalian stress response: characterization of changes in cytoplasmic organelles, cytoskeleton, and nucleoli, and appearance of intranuclear actin filaments in rat fibroblasts after heat-shock treatment. *J. Cell Biol.* 101, 1198–1211.
- Willsey, H. R., Zheng, X., Pastor-Pareja, J., Willsey, A. J., Beachy, P. A., & Xu, T. 2016. Localized JNK signaling regulates organ size during development. *eLife*, 5(2015), 1–18.
- Wolfram, V., Southall, T. D., Brand, A. H., & Baines, R. A. 2012. The LIM-Homeodomain Protein Islet Dictates Motor Neuron Electrical Properties by Regulating K<sup>+</sup> Channel Expression. *Neuron*, 75(4), 663–674.
- Wu, H., Wang, M. C., & Bohmann, D. 2009. JNK protects *Drosophila* from oxidative stress by transcriptionally activating autophagy. *Mechanisms of Development*, 126(8–9), 624–637.
- Yamaguchi, Y., Shibata, H., & Handa, H. 2013. Transcription elongation factors DSIF and NELF: Promoter-proximal pausing and beyond. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(1), 98–104.
- Yi, X., Bekeredjian, R., DeFilippis, N. J., Siddiquee, Z., Fernandez, E., & Shohet, R. V. 2006. Transcriptional analysis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 290(3). 1098-1102.

Zhimulev, I. F., Belyaeva, E. S., Semeshin, V. F., Koryakov, D. E., Demakov, S. a, Demakova, O. V, Andreyeva, E. N. 2004. Polytene chromosomes: 70 years of genetic research. *International Review of Cytology*, 241, 203–75.

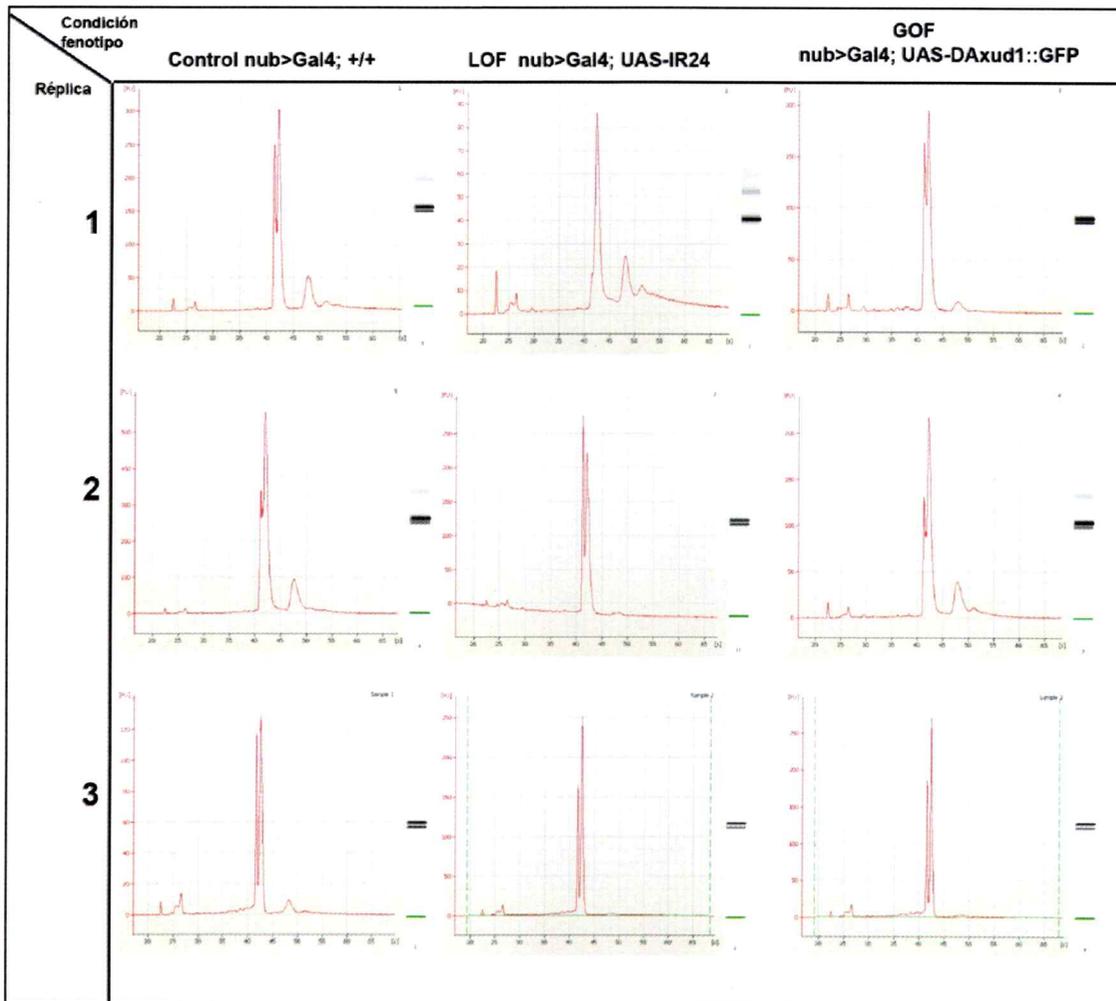
Zink, D., Sadoni, N., & Stelzer, E. 2003. Visualizing chromatin and chromosomes in living cells. *Methods*, 29(1), 42–50.

## ANEXOS

### ANEXO 1: Análisis de secuenciaciones masivas, estadísticas y controles de calidad.



**Figura S1: Análisis de tamaño de muestras de Dam-ID post-fragmentación.** Después de la fragmentación mediante el sonicador *Covaris*® las muestras se analizaron en el equipo *Fragment Analyzer*, un sistema de electroforesis en capilares de alta sensibilidad para la detección de ácidos nucleicos. Se exponen las muestras Control (Dam) y Dam::DAXud1, con sus réplicas correspondientes. En el eje Y de cada gráfico está la señal de abundancia de ADN en unidades RFU (*Relative Fluorescence Units*), mientras que en el eje X está indicado el tamaño. Los *peaks* LM y UM corresponden a marcadores de ADN de tamaños conocidos, siendo LM el marcador de tamaño menor (50 bases) y UM el marcador de tamaño mayor (6000 bases). En la zona derecha de cada gráfico está la digitalización de la imagen del capilar con la muestra cuantificada y graficada.



**Figura S2: Análisis de calidad de ARN, previo a la generación de librerías para ARN-seq.** Con el equipo *Bioanalyzer* se analizaron las muestras de ARN total enviadas a secuenciar. De forma similar que en el análisis en la figura S4 el eje Y grafica unidades de fluorescencia relativa y el eje X a los tiempos de elusión. En el lado derecho de cada perfil se observa la fotografía de la columna en que se visualizan los fragmentos. Un ARN se considera de buena calidad al diferenciarse dos *peaks* que corresponden al ARN ribosomal, en que su integridad es indicador de ARNm. En todos los casos se concluyó que el ARN es de buena calidad, teniendo un buen índice de elusión, resolución y tamaño de los *peaks*. Como información adicional se debe mencionar que algunos *peaks* pueden no diferenciarse bien, sin embargo, el ARN de insecto ha demostrado una tendencia a adquirir estructuras secundarias durante estos análisis, por lo que se debe considerar más el tamaño y la señal total que la diferenciación de los dos *peaks* (Winnebeck y cols., 2009).

**Tabla S1: sumario de secuenciación de muestras de Dam-ID. Se expone la estadística de cada réplica de condiciones Control (Dam) y DAxud1.**

<b>Muestra</b>	<b>Lecturas totales</b>	<b>Pares seleccionados</b>	<b>Pares alineados</b>	<b>% alineado</b>
Dam Control 1	75.004.478	27.717.008	21.555.517	77.7
Dam Control 2	61.906.492	22.413.172	17.885.711	79.8
Dam Control 3	78.743.176	29.158.027	22.422.522	76.9
Dam-DAxud1 1	67.899.514	24.513.003	18.066.083	73.7
Dam-DAxud1 2	57.455.046	20.802.281	16.392.197	78.8
Dam-DAxud1 3	84.554.602	31.367.752	24.247.272	77.3

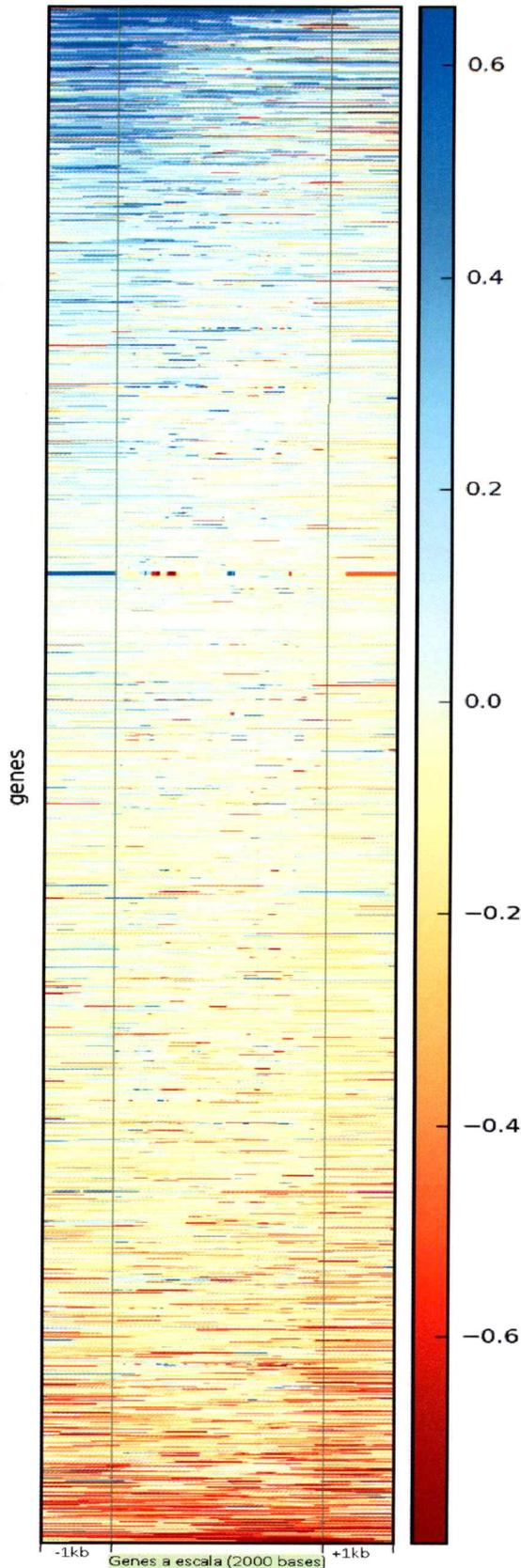
**Tabla S2: sumario de secuenciación de muestras de ARN-seq. Se expone la estadística de cada réplica de condiciones Control, Ganancia de función (GOF) y pérdida de función (LOF).**

<b>Muestras</b>	<b>Lecturas totales</b>	<b>Pares seleccionados</b>	<b>Pares alineados</b>	<b>% alineados</b>
Control - 1	44.307.052	21.225.258	19.642.480	95,2
Control - 2	47.006.348	22.498.202	20.608.183	94,8
Control - 3	43.205.866	20.621.450	18.934.391	95
GOF-1	47.844.698	22.725.556	21.005.424	94,8
GOF-2	46.485.820	22.103.375	19.306.644	94,3
GOF-3	40.671.264	19.328.899	17.631.158	95,3
LOF-1	49.727.758	23.789.308	21.787.264	95,3
LOF-2	37.186.476	17.453.639	15.941.893	90
LOF-3	39.012.234	18.556.937	17.042.848	94,8

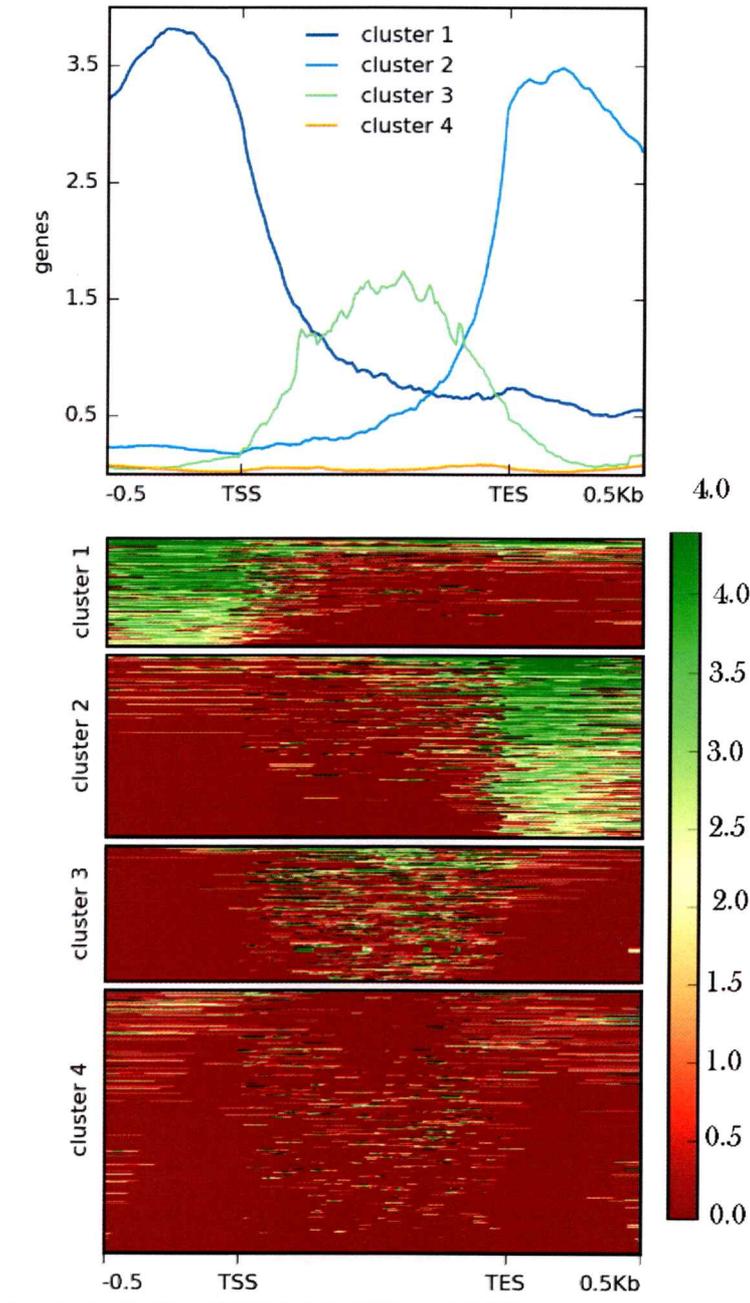
## ANEXO 2: Datos y gráficos adicionales de DamID-seq



**Figura S3: Expresión específica de mCherry en discos imaginales y prueba de transgénico.** El panel A indica al lado izquierdo el genotipo de las larvas que están al lado derecho, en que se observa que la expresión específica de mCherry en el disco imaginal. En B se muestran reacciones de PCR con partidores que amplifican los fragmentos flanqueados por secuencias GATC, de un tamaño entre 500-2000, que tienen adaptadores para posterior secuenciación. En el carril 1 se corrió la muestra con ADN genómico tratado de animales YW; El carril 2 corresponde a *nub>Gal4*; El carril 3 corresponde a UAS-Dam; Carril 4 a UAS-Dam::DAxud1; Carril 5 es *nub>Gal4; UAS-Dam*; Carril 6 es *nub>Gal4; UAS-Dam::DAxud1*. Ladder 1Kb.



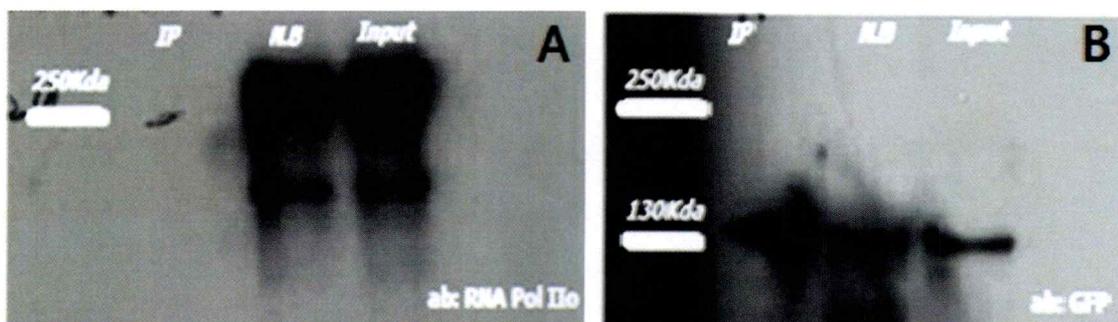
**Figura S4: Mapa de posicionamiento de las secuencias DamID-seq.** Se grafican los datos de posicionamiento de DAXud1 en todos los genes en un sólo gráfico, con los genes escalados a 2000 bases (zona inferior). En la zona superior se agruparon los genes a los cuales se les asoció un *peak* significativo. Bajo el gráfico se grafican todos los genes corregidos a una escala de 2kb. A partir de estos datos se construyeron los perfiles metagenómicos.



**Figura S5: Perfil metagenómico clusterizado desarrollado a partir del programa SICER.** Escala de genes 2000 bases. SICER es una herramienta alternativa desarrollada para análisis de nucleosomas, que identifica *peaks* amplios. Esta técnica arrojó más de 9000 *peaks* significativos, por lo que fue considerado poco selectivo. Detalles del programa están en el artículo de Xu y colaboradores, 2014.

### ANEXO 3: Interacción física y genética de DAxud1 con el factor de transcripción Caudal y otras proteínas nucleares.

Dado que DAxud1 co-distribuye con la forma activa de la ARN Polimerasa II (RNA Pol Ilo), existía la posibilidad de que interactuasen físicamente, posibilidad que se veía reforzada por el dato de que Spt5, factor de elongación de la transcripción, interactuaba con DAxud1 en ensayos de doble híbrido ([www.thebiogrid.org](http://www.thebiogrid.org); Chatr-Aryamontri y cols., 2015). Además, el fenotipo de ganancia de función de DAxud1 es suprimido en un *background* heterocigoto mutante para Stp5 (Figura S10). En base a esto, se realizó una co-inmunoprecipitación a partir de extractos de tejidos que expresaban DAxud1::GFP, con posterior western blot para ARN Polimerasa Ilo el inmunoprecipitado (Figura S6). Los resultados para esta aproximación dieron negativo.

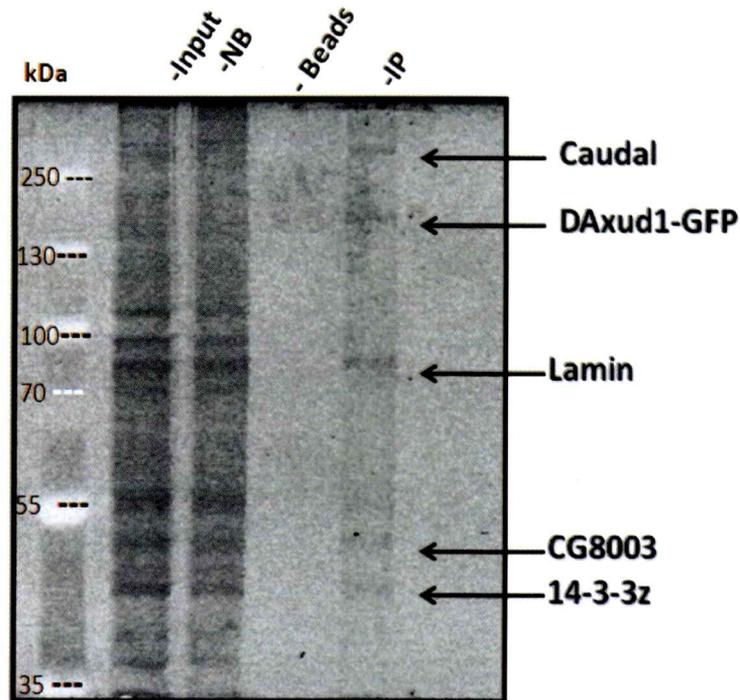


**Figura S6: Western blot para inmunoprecipitaciones de DAxud1.** Utilizando el epítipo GFP de DAxud1::GFP se realizaron inmunoprecipitaciones para revelar si existe interacción con componentes de la cromatina relacionados con transcripción, en este caso ARN polimerasa fosforilada. A) Inmunoblot para ARN Pol Ilo y B) Inmunoblot para DAxud1::GFP, utilizando el anticuerpo anti-GFP. IP: inmunoprecipitado; NB: non-bound, fracción no precipitada; Input: proteína total. Se utilizaron 300µg para realizar la inmunoprecipitación.

Como una alternativa para identificar proteínas que interactúan con DAxud1 se procedió a hacer un análisis por espectrometría de masa de las proteínas inmunoprecipitadas junto a DAxud1::GFP. La inmunoprecipitación se realizó a partir de extractos de proteína de discos imaginales provenientes de larvas de tercer estadio del genotipo *nub>Gal4; UAS-DAxud1::GFP*, en el que el epítoto de GFP se utilizó para la inmunoprecipitación. Las proteínas inmunoprecipitadas se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% y posterior tinción con Lumitein™ en gel de acrilamida, compatible con espectrometría de masas (Figura S7). Se hicieron tres réplicas experimentales a partir de extractos provenientes de grupos experimentales distintos.

Se identificaron 4 bandas mayores además de la correspondiente a la de DAxud1::GFP. Las bandas de cada electroforesis fueron extraídas y posteriormente se sometieron a digestión y espectrometría de masas para revelar la identidad (Tabla S3).

Aunque se tomaron los cuidados pertinentes en cuanto a limpieza y pureza de la muestra, las proteínas con mayor cobertura fueron las pertenecientes al complejo Actina-Miosina, ya que sus elementos aparecen en casi todas las bandas secuenciadas. Éste es un problema muy frecuente en la espectrometría de masa de extractos de proteínas (Mellacheruvu y cols., 2013), e incluso es un factor que disminuye la cobertura y el puntaje de las proteínas que realmente representan la banda correspondiente a la muestra. Se consideraron las proteínas con las siguientes mayores coberturas en la lista y con localización nuclear. Este criterio se usó para identificar las proteínas de cada banda.



**Figura S7: Inmunoprecipitación de DAxud1::GFP a partir de extractos proteicos de discos imaginales.** La tinción de proteínas que se utilizó fue Lumitein™ después de la electroforesis en gel de acrilamida. Se realizó el mismo procedimiento para discos *nub>Gal4; +/+* de a modo control, pero sin GFP, siendo este el control negativo para la inmunoprecipitación. Carriles: *input* (proteínas totales antes de inmunoprecipitar), *NB* (*non-bound fraction*; proteínas que se rescataron del sobrenadante al precipitar las bolitas de agarosa con el anticuerpo GFP unido), *IP* (proteínas que co-inmunoprecipitaron con las bolitas de agarosa producto de la interacción del anticuerpo anti-GFP, arrastrando los posibles complejos que formaría DAxud1::GFP).

**Tabla S3:** principales proteínas identificadas por espectrometría de masa. Se indica el porcentaje de la secuencia cubierta, el peso molecular descrito en bases de datos, su identificación, peso molecular relativo observado en la revelación de la electroforesis y comentarios sobre el resultado.

Cobertura	MW [kDa]	Descripción	Peso relativo en electroforesis	Comentarios
7,10	246,5	CAD protein	Proteína >250 kDa	Factor de transcripción. Expresión en disco de ala.
21,71	91,0	DAxud1	Proteína alrededor 130 kDa	El peso extra aparente de 40 kDa es por el Tagg GFP
26,85	71,3	Lamin	Proteína entre 100 y 70 kDa	Proteína de unión a cromatina. Rol represor. Expresión en disco de ala.
20,15	45,7	CG8003	Proteína alrededor 50 kDa	Proteína sin función estudiada. Dominio <i>zinc finger</i> . Expresión disco de ala.
17,34	38,2	14-3-3z	Proteína de alrededor 30kDa	Proteína nuclear y citosólica. Se ha descrito rol transcripcional.

Las proteínas identificadas fueron Caudal (CAD), Lamin, la proteína codificada por el gen CG8003 y 14-3-3z. Caudal (CAD) es un factor de transcripción que ha sido muy estudiado por su participación en definición del eje antero-posterior del embrión de *Drosophila* (McGinnis, W y cols, 1992; Moreno & Morata, 1999). En larva y adulto hay pocos estudios, pero se ha vinculado como un efector río abajo de la vía Wg, en que sería requerido para el desarrollo (larvas) y a la vez la regeneración (Adultos) del intestino posterior y placa anal de *Drosophila* (Moreno & Morata, 1999).

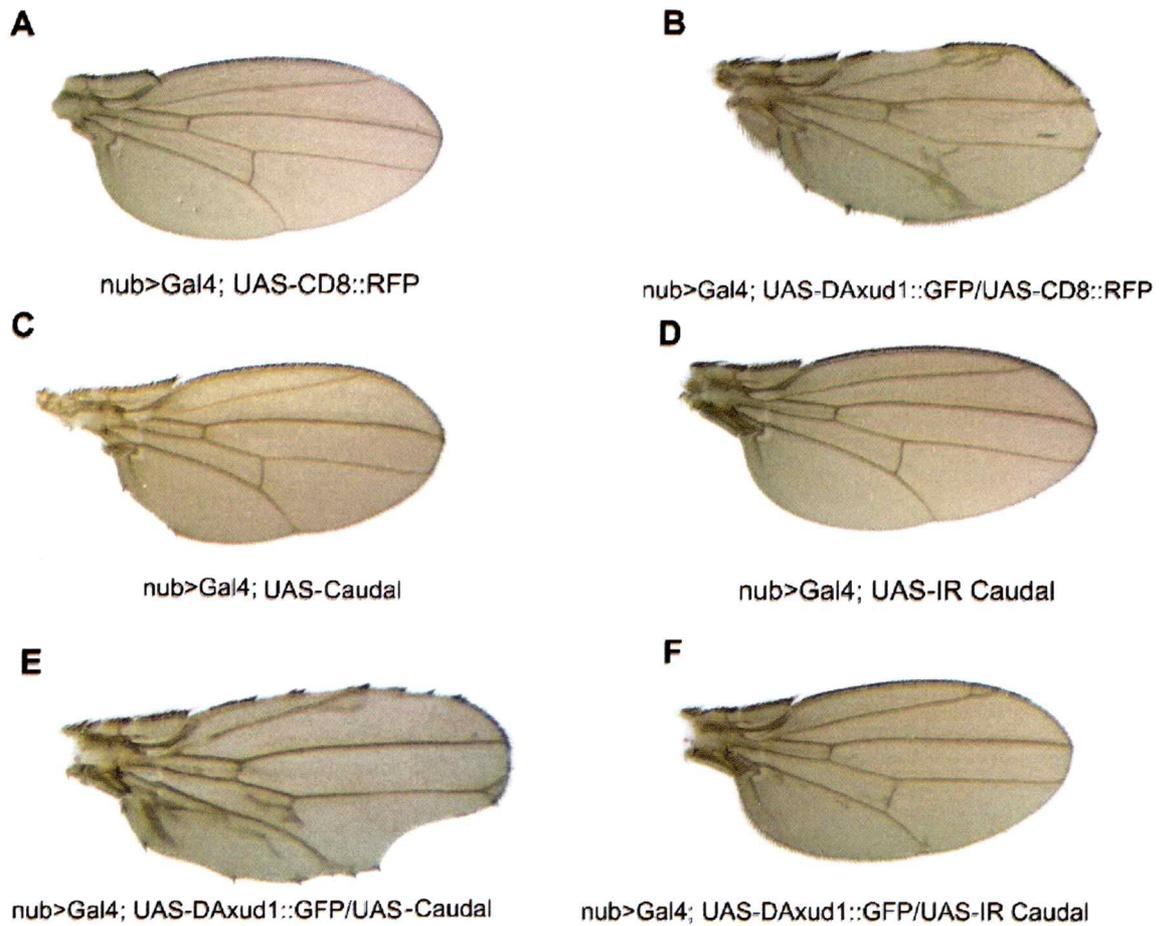
Lamin es una proteína estructural del núcleo, también tiene un rol regulatorio en el proceso de transcripción, ya que interactúa directamente y estructura en orden mayor la cromatina (Dechat y cols., 2010).

CG8003 es una proteína que en su secuencia se han reconocido dominios *zinc finger* de unión a ADN, característicos de algunos factores de transcripción. Cabe destacar que su transcrito se expresa fuertemente en sistema nervioso central de larva y adulto, así como en ovarios de hembra en *Drosophila* (Chintapalli y cols., 2007), patrón de expresión similar al de DAXud1.

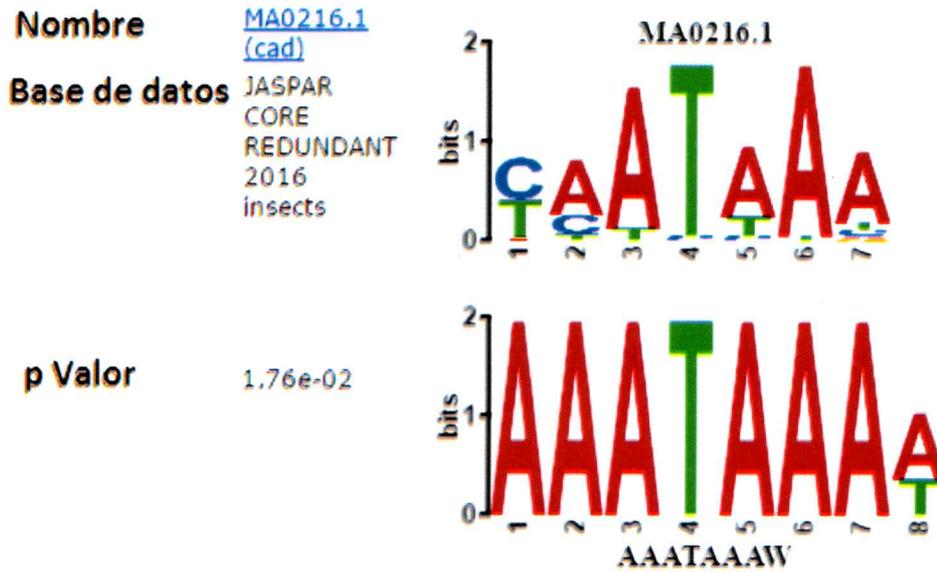
14-3-3z es una proteína que se encuentra tanto en citosol como en núcleo. A nivel de tejidos su transcrito se expresa fuertemente en sistema nervioso central y en menor medida en disco imaginal de ala (Chintapali y cols., 2007).

Para testear si realmente ocurre interacción funcional entre las proteínas, se co-expresó DAXud1 junto a constructos que producen pérdidas o ganancias de función de Caudal (Figura S8). Estos experimentos mostraron que el fenotipo de ala aberrante de ganancia de función de DAXud1 es revertido al co-expresar un interferente de Caudal (Figura S8 F), sugiriendo que actuarían en conjunto en el contexto del desarrollo del tejido imaginal de ala.

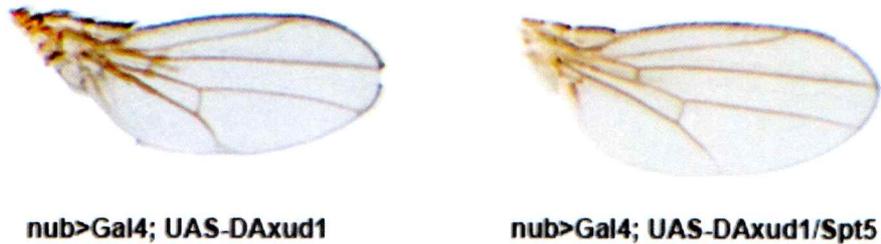
Ahondando en las interacciones con Caudal, se encontró que uno de los motivos recurrentes en las secuencias en que se localiza DAXud1 (datos de DamID-seq) es similar a la secuencia de unión a ADN de Caudal (Figura S9), que se encuentra en 775 de las 1589 secuencias de *peaks* analizadas.



**Figura S8: Co-expresión de ARN interferente de Caudal suprime fenotipo de ganancia de función de DAXud1.** Se observó una marcada reversión del fenotipo. En la parte inferior de cada ala se indican los genotipos A) Ala de animal control; B) Ala de animal con ganancia de función de DAXud1; C) Ala de animal con ganancia de función de Caudal; D) Ala de animal con ganancia de función E) Ala co-expresando ganancia de función de DAXud1 y Caudal. En esta combinación genética no nacieron machos debido a que en estos la expresión de Gal4 es mayor que en hembras, posiblemente produce exacerbación del efecto de muerte celular; F) Ala co-expresando ganancia de función de DAXud1 e interferente de Caudal. Animales desarrollados a 29°C.



**Figura S9:** Motivo identificado por DREME tiene similitud con el Motivo de unión a ADN de Caudal. El alineamiento se realizó con la herramienta TOMTOM, que utiliza la base de datos JASPAR, disponibles en internet.



**Figura S10:** Alelo mutante de Spt5 rescata fenotipo de muescas en las alas producidas por sobreexpresión de DAXud1. Animales desarrollados a 25°C.

### **Métodos Anexo 3**

#### **Protocolo de Western Blot**

##### **Preparación de las muestras y electroforesis:**

Las muestras se prepararon con tampón de carga 6X para western blot directo y tampón de carga 2X SDS para Western Blot para inmunoprecipitaciones. La cantidad de proteína preparada para cada carril fue 80 µg. Las mezclas de proteínas y tampón de carga se calentaron a 94°C por 5 min seguido por una centrifugación leve para que todo el material esté en el fondo. Las muestras se cargaron junto con el marcador de peso molecular (5 µl), y se llevó a cabo un primer tiempo de electroforesis con 75V por 15 minutos para que las muestras traspasen el gel concentrador. Seguido de este tiempo, el voltaje se subió a 120 V y se dejó correr por dos horas.

##### **Transferencia:**

Se retiró el gel de acrilamida de la cámara y se retiró el excedente de gel concentrador. Se cortó una membrana de nitrocelulosa (0,45 µm de diámetro de poro (Whatman, USA)), del mismo tamaño que el gel y previamente humedecida con tampón de transferencia se puso junto a él, flanqueada por láminas de papel filtro. Eso se puso en un sistema de transferencia en que el lado de la nitrocelulosa da hacia el polo positivo para realizar la transferencia encerrada en un "sandwich" de plástico que sirve como adaptador a la cámara. Sumergido el "Sandwich" en la

cámara de transferencia, el proceso se llevó a cabo a 400 mA, el tiempo varió dependiendo el tamaño de las proteínas, pero es entre una y dos horas.

Terminada la transferencia, la membrana se retiró y se marcaron los pesos moleculares del ladder, para someterla a proceso de bloqueo, el que se realiza con TBS-T 0,1%, con leche en 1-5% p/v dependiendo el anticuerpo, o bien BSA si es que se revelaron proteínas con epítopes fosforilados (ARN Polimerasa II). El proceso de bloqueo se realizó siempre en una hora. Lo usual fue incubar el anticuerpo por 16 horas a 4°C, pasado el tiempo se realizaron tres lavados con TBS-T 0,1%, (10 minutos cada uno) para luego incubar con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa. La incubación se realizó durante dos horas en TBS-T 0,1% en leche 5% para todos los anticuerpos secundarios.

#### **Revelado**

Previo al revelado la membrana se lavó tres veces en TBS-T 0,1% por 10 minutos. Luego, la membrana se incubó en partes iguales de los reactivos A y B del kit de ECL (Pierce, Super West Pico/Femto ECL (*enhanced chemiluminescence*)) por 3 minutos. Se eliminó el exceso de reactivo, y se colocó la membrana entre láminas de plástico. Las películas para rayos X se expusieron entre 1 – 20 minutos y fueron reveladas utilizando máquina para revelado (AGFA).

#### **Co-inmunoprecipitación de DAXud1**

Para éste experimento se requirieron 300 ug de proteína de disco imaginal de ala para cada ensayo. Los discos fueron disectados a 4°C y puestos en PBS 1X, los discos se acumularon durante tiempos de 40 minutos, al pasar ese tiempo,

se pusieron en un tubo *Eppendorf*, se sometió a *spin* de quince segundos (5000 rpm) y cuidadosamente con pipeta se extrajo el PBS en exceso. Esa muestra se guardó a -80°C hasta acumular material suficiente (400 discos). Las proteínas se extrajeron según el protocolo indicado en la sección anterior. Posteriormente se diluyeron para que en cada ensayo se tengan 300 ug. Esa cantidad se diluyó hasta 500 µl con buffer de dilución (Tabla1), se extrajeron 50 µl y se guardaron para la electroforesis de proteínas (muestra *Input*). Las bolitas con anticuerpo GFP covalentemente unido se lavaron con buffer de dilución (Tabla 4), y se centrifugaron para retirar el sobrenadante, para luego resuspender. Esto se reiteró dos veces y a la tercera las bolitas se resuspendieron en la solución de proteína diluída. Se incubaron con agitación leve a temperatura ambiente por dos horas. Al cabo de ese tiempo la muestra se centrifugó a 2500 rpm por dos minutos para retirar el sobrenadante, de esa solución se guardaron 50 µl (fracción no unida). El pellet se resuspendió en buffer de lavado y se centrifugó nuevamente a 2500 rpm por dos minutos. El procedimiento de lavado se repitió otras dos veces y a la tercera las partículas se resuspendieron en solución de glicina (200mM, pH 2.5) para disociar los complejos proteicos, nuevamente se centrifuga la muestra y el sobrenadante se retiró y tituló a 50 µl, para guardar, junto con las muestras de *input* y fracción no unida a -80°C hasta realizar la electroforesis y posterior Western Blot.

### **Tinción de proteínas**

Se utilizó una solución de Lumitein® (Biotium), sin diluir. Después de la electroforesis, el gel de acrilamida se puso en un recipiente con la solución de

teñido, por 60 minutos con agitación. Posteriormente se hicieron 2 lavados de 20 minutos con agua destilada. El revelado se realizó en transiluminador UV 300-400nm. Las bandas fueron extraídas con bisturí estéril y puestas en tubos eppendorf, donde se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el procedimiento de extracción de gel y secuenciado por espectrometría de masa. Este servicio se contrató a *Creative Proteomics*, Nueva York, EE.UU.

## **ANEXO 4: ARN-seq**

Se realizó un experimento de ARN-seq con el fin de encontrar genes que cambien su expresión frente a fluctuaciones de DAXud1.

### **Método experimental:**

El ARN se extrajo a partir de discos imaginales de larvas en tercer estadio (90-96 h). Las condiciones fueron Control (*nub-Gal4/Y; +/+*); Pérdida de función inducida mediante el RNA interferente IR24 (genotipo *nub-Gal4/Y;UAS-IR24/+*); y condición ganancia de función (*nub-Gal4/Y;UAS-DAXud1-GFP/+*). Se realizaron tres réplicas por condición.

Los discos se colectaron en PBS 1X, en hielo, todos provenientes de machos. Se hicieron rondas de colección cada 25 minutos, para evitar cualquier influencia de la degeneración de los discos, inmediatamente se retiró el PBS y los discos se congelaban en nitrógeno líquido para ser guardados a -80°C. La cantidad de discos para cada muestra de ARN se fijó en 150, con lo que se obtenía un mínimo de 4 µg de ARN total, suficiente para la secuenciación.

### **Extracción del ARN:**

Los 150 discos por muestra se pusieron en 250 µL de TRIZOL en un tubo Eppendorf de 1,7 µg y se homogenizaron con una punta de polipropileno previamente limpiado con NaOH 100mM (en agua DEPC) y lavado en etanol 100% libre de ARNasa. Para descartar elementos sólidos la muestra se centrifugó a 13000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a otro tubo *Eppendorf* y se agregaron 0,2 volúmenes de cloroformo para luego agitar en *vortex* por 1

minuto. La mezcla se centrifugó a 13000 rpm por 15 minutos y la fase superior transparente se retira para mezclarlo con 1  $\mu$ L de poliacrilamida lineal (25  $\mu$ g/  $\mu$ L) y 0.8 volúmenes de isopropanol. Esta mezcla se guardó a -20°C por una hora y se centrifugó a 13000 rpm por 15 minutos. El tubo con isopropanol y pellet de ARN se guardó a -80°C hasta enviar las muestras a Macrogen Inc (Corea del Sur), donde se purificaron los ARNm y se generaron las librerías de secuenciación.

### **Secuenciación:**

El ARNm se transformó en ADNc para ser secuenciado y las librerías se elaboraron de modo que los fragmentos a secuenciar sean de un tamaño de 300 pares de bases. La secuenciación se realizó en un equipo Illumina Hiseq2500 en lecturas 2x50 (esto quiere decir, para cada fragmento de 300 bases se realizaron secuenciaciones de 50 bases por un lado y 50 por el otro). Esta modalidad permite identificar variantes de *splicing*, favoreciendo la identificación de isoformas de ARNm.

Las muestras fueron secuenciadas en el equipo Illumina Hiseq2500 (Macrogen Inc. Seúl, Corea del Sur), por lo que la información de las secuenciaciones fue en el mismo formato que en las secuenciaciones de DamID. La información de cada muestra se obtuvo en archivos fastQC. Estos datos fueron filtrados con el programa *Trimmomatic*, para obtener las secuencias con parámetros de calidad Q>30, largo de 50 bases, y eliminar las secuencias de adaptadores Illumina. Se obtuvieron así los archivos de datos filtrados y con información de las secuenciaciones pareadas.

Para el posterior análisis de mapeo se utilizó el protocolo bioinformático propuesto por Trapnell y colaboradores (2013), llamado *protocolo Tuxedo*, en que el mapeo, ensamblaje y anotación de transcritos leídos se realizó mediante tres programas que trabajan consecutivamente: Tophat, Cufflinks y Cuffmerge. El análisis estadístico se realizó mediante el programa del mismo protocolo, Cuffdiff, y los gráficos se construyeron a partir del programa Cummerbund (Plataforma R, disponible en Bioconductor). La ventaja de este protocolo, a diferencia de otros programas, es que permite diferenciar variantes de *splicing* codificadas por un mismo gen, debido a que en el ensamble hace las anotaciones de las lecturas por exón y no por genes completos (Trapnell y cols., 2012). La versión de genoma utilizada también fue dm3 r5.57.

El análisis de las secuencias obtenidas se realizó por los métodos computacionales y estadísticos propuestos por Trapnell y colaboradores (2012), siendo los principales parámetros una razón de cambio absoluta mayor o igual a 2 y Valor p mayor o igual a 0.05, siendo usada la razón de cambio  $>[2]$  la estándar utilizada en varios estudios (Wilhelm y cols., 2009; Bullard y cols., 2010; Trapnell y cols., 2010).

## Resultados

En la comparación de condiciones Control vs. Ganancia de función se identificaron en total 77 genes diferencialmente expresados (54 aumentaron su expresión, 16 disminuyeron), mientras que en pérdida de función se encontraron 39 genes (33 aumentaron, 6 disminuyeron).



Los genes cuya expresión tuvo un aumento, se agruparon en categorías de procesos biológicos puntuales (Calificados por la iniciativa *Gene Ontology* y ordenados con el algoritmo disponible en *STRING*: <http://string-db.org/>). Estas categorías, de mayor a menor ocurrencia de genes fueron: proteólisis, gametogénesis, percepción olfativa, síntesis de cutícula, sinapsis y organización de citoesqueleto. No se encontraron categorías de procesos biológicos significativamente enriquecidos para los genes cuya expresión disminuyó en la ganancia de función de *DAXud1*.

### Ganancia de función



77 genes expresados diferencialmente

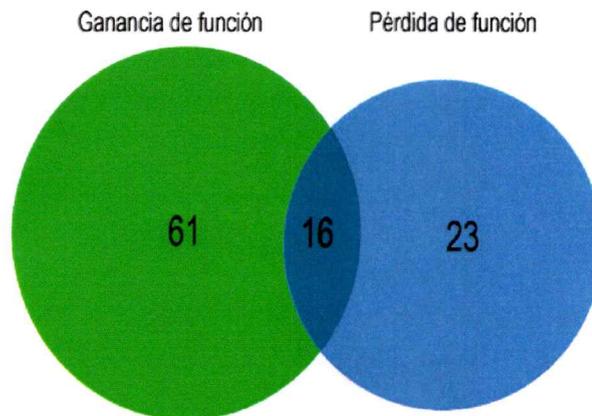
- \* 54 aumentaron su expresión respecto al control
- \* 23 disminuyeron su expresión respecto al control

### Pérdida de función

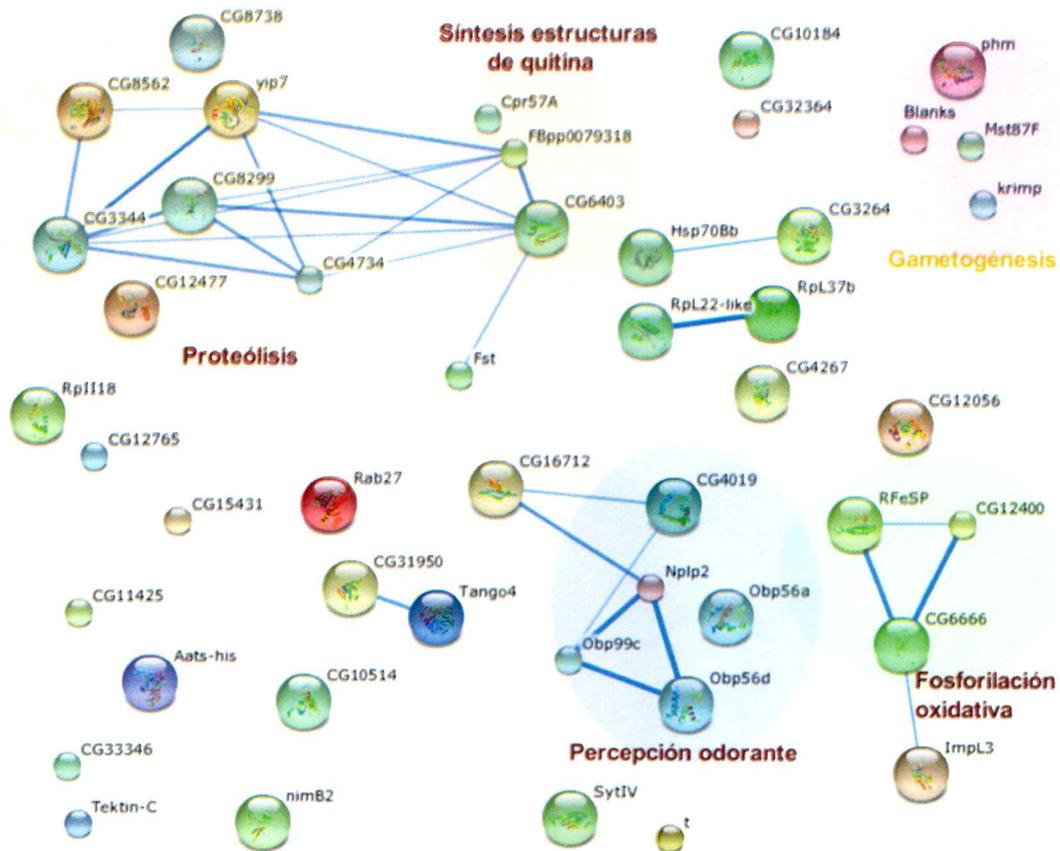


39 genes expresados diferencialmente

- \* 33 aumentaron su expresión respecto al control
- \* 6 disminuyeron su expresión respecto al control



**Figura S11: Resumen de datos de ARN-seq.** Se muestra la cantidad de genes que aumentaron o disminuyeron diferencialmente su expresión respecto al valor control ( $p$  valor  $<0.05$ ). El diagrama de ven resume la cantidad de genes que cambiaron diferencialmente su expresión de manera común en ambas condiciones.



**Figura S12: Relación entre genes que aumentaron su expresión génica en ganancia de función de DAxud1.** Utilizando el programa STRING (Jensen y cols., 2009), que utiliza la información de las proteínas codificadas por los genes, se buscaron relaciones entre los elementos que aumentaron su expresión. Se encontraron 5 grupos en que los genes se clasificaron por proceso biológico (*Gene Ontology*), lo que se visualiza en los genes agrupados en cada grupo de colores. Las líneas entre proteínas denotan la evidencia de relaciones como interacción física y co-expresión, siendo la línea más gruesa entre mayor sean estas relaciones y su fiabilidad. La figura dentro de cada esfera indica que hay una estructura proteica modelada o dilucidada.

## Genes diferencialmente expresados en pérdida de función

Se identificaron 39 genes diferencialmente expresados, 16 de ellos cambiaron en la misma dirección que en condiciones de ganancia de función. Entre estos genes se destacan los que codifican proteínas que intervienen en el metabolismo de quitina (Figura S12), también hay otros nuevos como Obp99c, (*odorant binding protein*) que es una variante de los Obp56a y Obp5d, por lo que hay un control similar en ese grupo de genes que están relacionados con la percepción odorante y probablemente con el fenotipo de arresto G<sub>2</sub>-M que induce diferenciación a esta clase de células (Hekmat-Scafe y cols., 2002).

Considerando los cambios equivalente para las condiciones de ganancia y pérdida de función se planteó la posibilidad de que el experimento hubiera fallado. Para descartar esto se analizó la expresión de DAXud1 en las condiciones de expresión del constructo interferente. Resultó que si bien no llegaba a ser significativo según los estándares (p Value= 0.0015; q Value = 0.050028), había un aumento de expresión de DAXud1 en todas las réplicas respecto del control (Figura S13). Esto no descarta la posibilidad de un error, ya que este gen tiene cuatro isoformas de mensajeros reportados (Figura S13 A), cuya expresión aumentaría el valor de FPKM total. Así que se procedió a analizar la expresión de las diferentes isoformas (Figura S13 y Tabla 10). Se encontró que la variante DAXud1-RB aumentaba notoriamente su expresión respecto al control en condiciones de silenciamiento.

Para confirmar que la expresión de esa isoforma sea completa y no debido a que se cuentan los fragmentos que provenían del constructo ARNi, se procedió

a elaborar un diagrama Sachimi (Figura S17), que grafica los eventos de *splicing* detectados a partir de lecturas del ARN, las que al mapearse con el genoma se dividen en dos, lo que permite asignarlos como eventos de *splicing* correspondiente. Aquí se observan dos cosas en el caso de las réplicas de ARNi: lo primero es que efectivamente la isoforma RB se expresa mucho más que en la condición control (por lo tanto, no habría un error en las réplicas), y que los eventos de *splicing* en las regiones codificantes son igual o más numerosos que el control, con una diferencia significativa en la condición de ARNi (test t *student*, p Value<0.05).

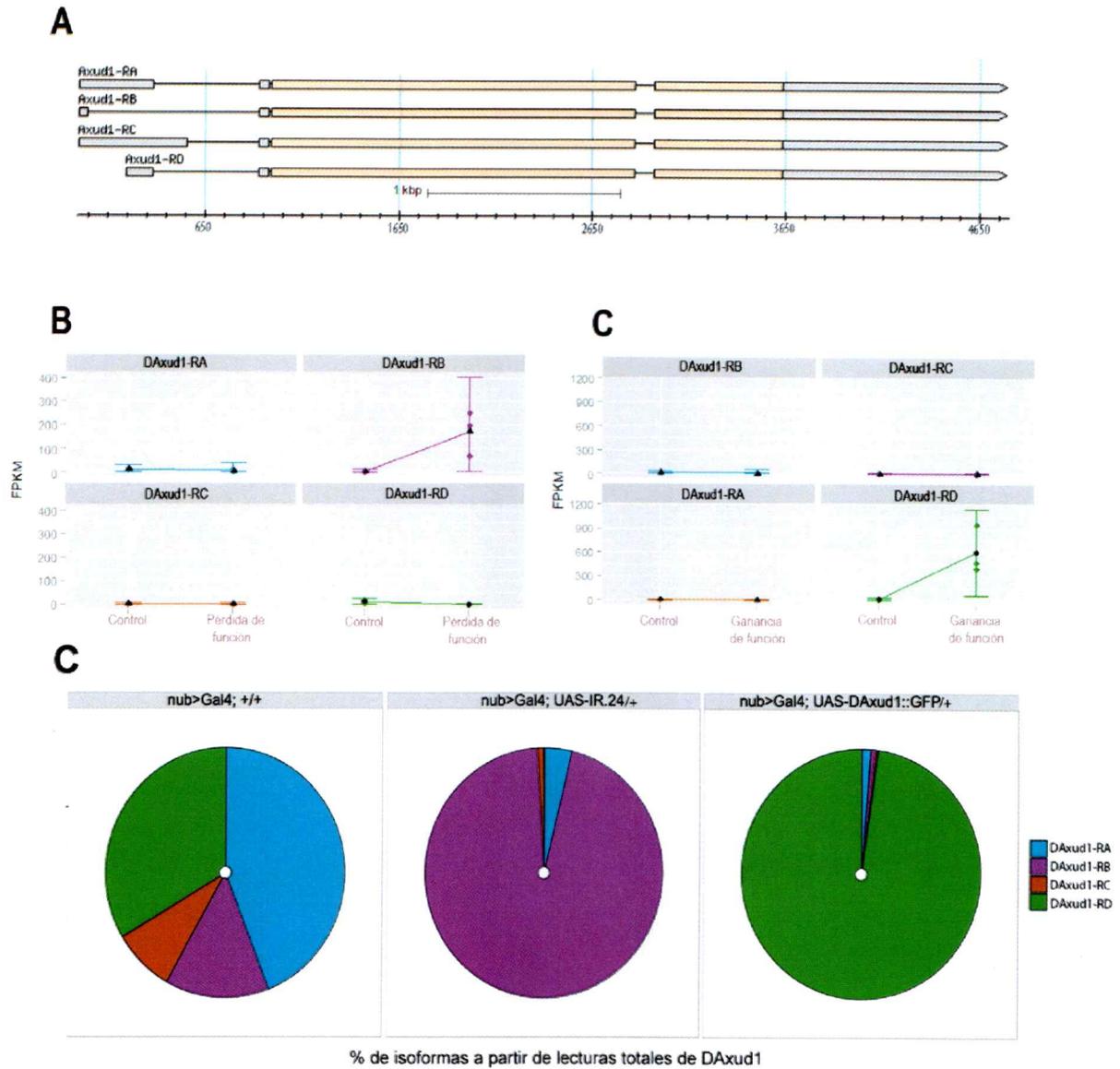
Es posible que el interferente tenga poca eficiencia para ésta isoforma, debido a que se diseñó para la isoforma RA (Figura 13A). La isoforma RB es más corta en el 5'UTR, no obstante debería verse afectada por el ARN interferente debido a que comparte 386 bases a partir del codón ATG. Sin embargo la secuenciación muestra que esto no parece ocurrir, ya que se observa que la isoforma RB aumenta su expresión considerablemente sin ser silenciada por el ARNi. Se concluye que la expresión de la isoforma RB, puede ser la causa del aumento equivalente de ciertos genes en las condiciones de ganancia y pérdida de función. Por lo anterior los análisis siguientes se realizaron exclusivamente en base a las secuencias obtenidas en la condición de sobreexpresión de DAxud1::GFP.

Los genes diferencialmente expresados en diferentes condiciones a partir de transcriptómica usualmente validan por otra técnica. Se utilizó la técnica de

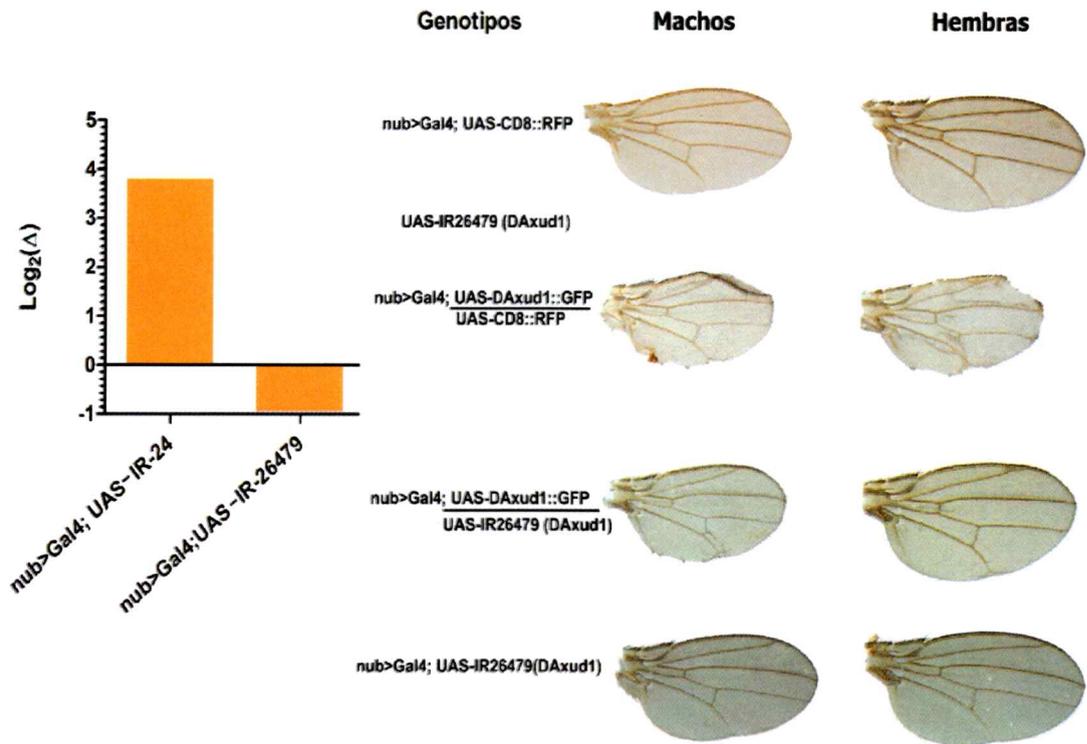
qPCR para confirmar el cambio en la expresión de los genes que serían regulados por DAxud1.

**Tabla S4:** conteo en FPKM de isoformas de ARNm de DAxud1.

	DAxud1-RA	DAxud1-RB	DAxud1-RC	DAxud1-RD	DAxud1 Total
<i>nub&gt;Gal4; +/-</i>	12.655600	4.029020	2.387440	9.648630	28.7207
<i>nub&gt;Gal4; UAS-IR24.DAxud1</i>	6.891180	175.067000	1.513350	0.212106	183.6830
<i>nub&gt;Gal4; UAS-DAxud1::GFP</i>	7.61872	4.09315	1.88900	599.65500	613.2560



**Figura S13: expresión diferencial de variantes de *splicing* de DAXud1 en condiciones de pérdida y ganancia de función.** A) Se ilustran las variantes de *splicing* hasta ahora identificadas y publicadas por *Flybase*. B) Comparación de los niveles de lecturas de las cuatro isoformas entre la condición Control y la pérdida de función. C) Comparación de los niveles de lecturas de las cuatro isoformas entre la condición Control y la ganancia de función.



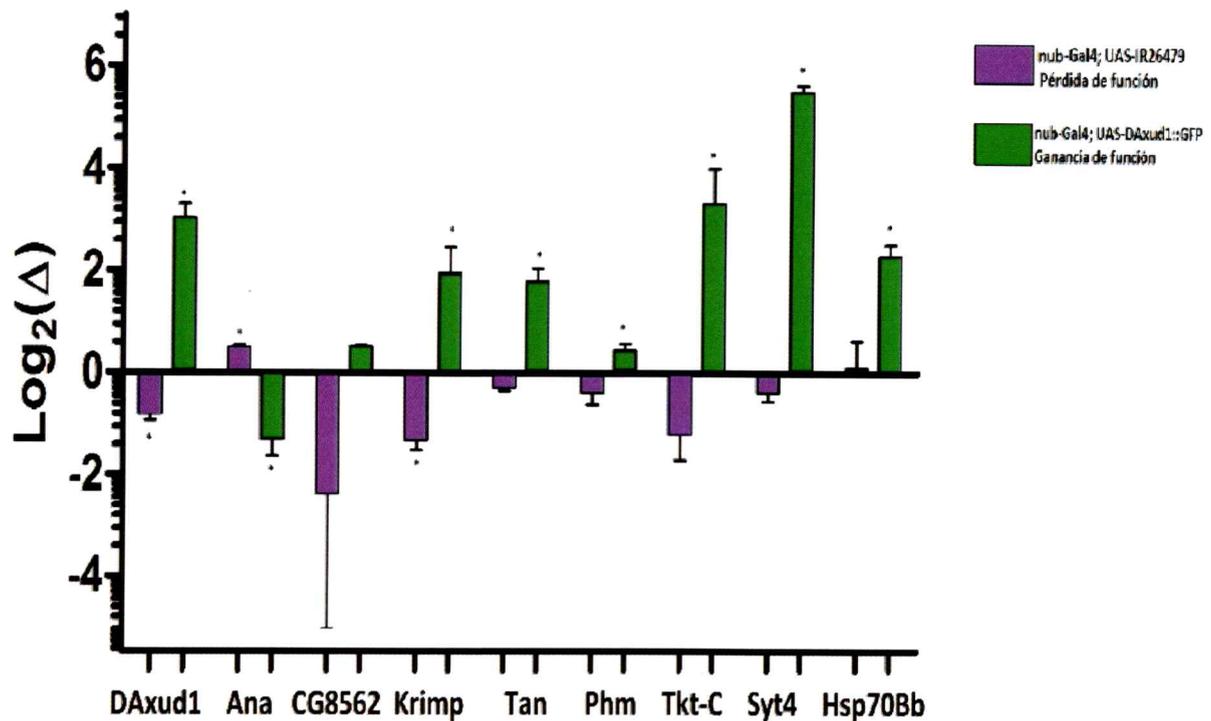
**Figura S14: Interferente DAXud-IR26479 disminuye niveles de ARNm de DAXud1 y revierte fenotipo de ganancia de función.** En el panel A se muestran los valores obtenidos a partir de qPCR de  $\text{Log}_2(\Delta)$  promedio de los interferentes utilizados, cuya comparación se hizo contra la condición control. El panel B está la descripción de fenotipos del interferente IR-26479 utilizando el driver *nubbin* (*nub*). Se observa que el fenotipo de ganancia de función es revertido cuando se co-expresa. Los animales se desarrollaron a 29°C en todos los experimentos.

## Correlación de datos de ARN-seq y qPCR

Dado que sigue siendo necesario analizar las variaciones de expresión génica de algunos genes en pérdida de función en qPCR, se optó por utilizar una línea UAS del banco de transgénicos RNA interferentes del VDRC (*Vienna Drosophila Resource Center*). Los resultados para validar esta línea se observan en la Figura S14, siendo el interferente IR-26479, al ser coexpresado con DAXud1-GFP capaz de disminuir los niveles de ARNm de DAXud1, revelado por qPCR (Figura S14). También es capaz de revertir el fenotipo de ganancia de función.

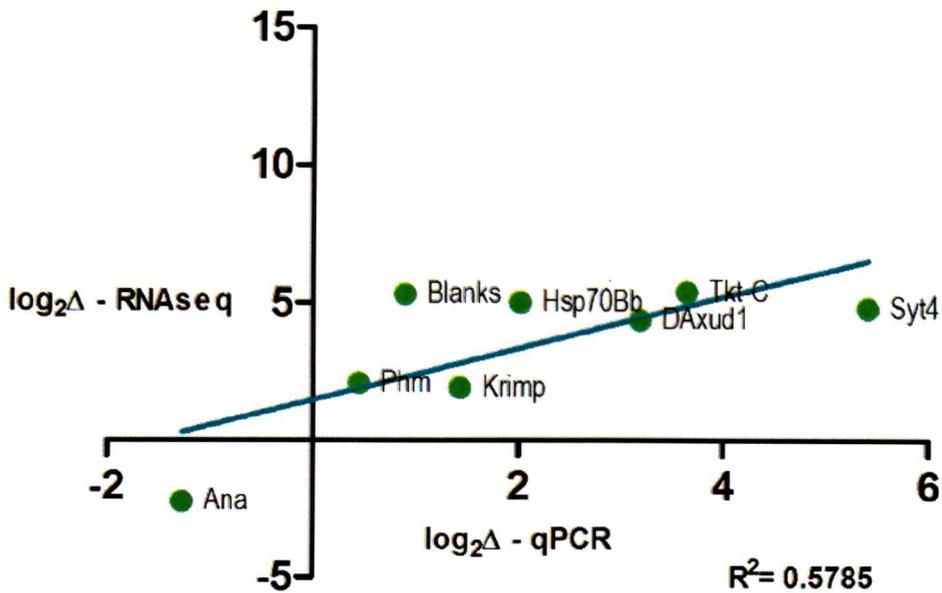
Con esta información, se procedió a disectar discos imaginales en cantidad suficiente para extraer ARN para las condiciones de Control, pérdida y ganancia de función de Daxud1. Esto se realizó desde 3 cruces independientes, misma metodología que la empleada en RNA-seq. Con ese material se realizaron análisis de qPCR para genes que cambiaron su expresión de manera significativa en RNA-seq, y que además presentaron buenos valores estadísticos como similitud de niveles entre réplicas y bajo valor p.

En general se mantienen las tendencias de los cambios de expresión, sin embargo, mediante el qPCR no se obtuvieron razones de cambio (*Fold Change*) similares al RNA-seq, exceptuando casos puntuales. Cabe recalcar, como se observa en la Figura S15, que para los genes seleccionados se observan cambios de expresión opuestos al comparar la ganancia y pérdida de función de DAXud1. Así, cambios de expresión de Daxud1 si regulan la expresión de estos genes, pudiendo corresponder a potenciales blancos transcripcionales.



**Figura S15: Razones de cambio (transformadas a  $\text{Log}_2$ ) de genes diferencialmente expresados en ARN-seq analizada por qPCR.** Se muestran en azul, para cada gen estudiado, las razones de cambio (transformadas a  $\text{Log}_2$ ) de la condición de pérdida de función respecto a la condición control. En verde se graficaron las razones de cambio (transformadas a  $\text{Log}_2$ ) de la ganancia de función respecto al control. En todos los casos se utilizó actina como gen normalizador, cuya razón de cambio es 1, el cual es la referencia del control para cada gen. Barras de error indican desviación estándar y asterisco sobre cada barra indica que el cambio promedio de la condición experimental fue significativa respecto al control (Test t,  $p < 0.05$ ) realizado comparando los valores  $2^{-\text{Ct}}$  de condición experimental y control (Livak y cols., 2001).

### Correlación datos RNaseq y qPCR



**Figura S16: Correlación de datos ARN-seq y qPCR.** Gráfico de correlación de datos entre valores log<sub>2</sub> (razón de cambio) para la ganancia de función en qPCR y ARN-seq. Las razones de cambio se transformaron a Log<sub>2</sub> y en el eje Y corresponde a las razones de cambio transformadas de los valores de ARN-seq mientras que en el eje X las razones transformadas de qPCR. Correlación de Pearson R<sup>2</sup> = 0.5785, p Value = 0.0236.

T

om

an

do sólo los valores log<sub>2</sub>(Δ), de RNA-seq y qPCR se obtiene una correlación positiva, la cual fue de R<sup>2</sup> = 0.5785 (pendiente 0.9293 +/- 0.3243). Los genes seleccionados para éste análisis cumplen el criterio de que en RNA-seq tuviesen un p-Value < 0.05, baja desviación estándar y posibles implicancias de su sobreexpresión sobre el fenotipo de arresto de ciclo celular observado en discos imaginales.

**Tabla S5:** Genes diferencialmente expresados en condiciones de ganancia de función respecto al control. Log2FoldChange>[1]; p Value< 0.05; q Value<0.05. Las columnas marcadas en **negrita** indican transcritos que cambiaron en condiciones de ganancia y pérdida de función, en el mismo sentido. Fold change = (FPKM condición/FPKM control).

ID flybase	Nombre	Log2(Fold Change)	p Value
FBgn0004191	<i>snarn:u2:34aba</i>	inf	5,00E-05
FBgn0033826	<i>cg4734</i>	inf	5,00E-05
FBgn0034052	<i>cg8299</i>	inf	5,00E-05
FBgn0034712	<i>cg3264</i>	inf	5,00E-05
FBgn0034822	<i>rpl37b</i>	inf	5,00E-05
<b>FBgn0035779</b>	<b><i>cg8562</i></b>	<b>inf</b>	<b>5,00E-05</b>
FBgn0036809	<i>cg12477</i>	inf	5,00E-05
FBgn0037167	<i>cg11425</i>	inf	5,00E-05
FBgn0039312	<i>cg10514</i>	inf	5,00E-05
FBgn0039453	<i>cg6403</i>	inf	5,00E-05
<b>FBgn0040959</b>	<b><i>peritrophin-15a</i></b>	<b>inf</b>	<b>5,00E-05</b>
<b>FBgn0086367</b>	<b><i>tan</i></b>	<b>inf</b>	<b>5,00E-05</b>
FBgn0262023	<i>cg42834</i>	inf	5,00E-05
<b>FBgn0002862</b>	<b><i>mst87f</i></b>	<b>inf</b>	<b>0.0002</b>
FBgn0082980	<i>snoarn:psi28s-2996</i>	inf	0.0006
FBgn0083040	<i>snoarn:psi18s-1854c</i>	inf	0.00235
FBgn0035781	<i>cg8560</i>	8,81	0.00125
FBgn0010425	<i>epsilon</i>	6,45	0.00115
FBgn0035638	<i>tektin-c</i>	5,38	5,00E-05
<b>FBgn0035608</b>	<b><i>blanks</i></b>	<b>5,34</b>	<b>0.0001</b>
<b>FBgn0028400</b>	<b><i>syt4</i></b>	<b>4,78</b>	<b>5,00E-05</b>
FBgn0037724	<i>fst</i>	4,67	0.00085
<b>FBgn0261647</b>	<b><i>axud1</i></b>	<b>4,37</b>	<b>5,00E-05</b>
<b>FBgn0013278</b>	<b><i>hsp70bb</i></b>	<b>4,16</b>	<b>5,00E-05</b>
FBgn0035154	<i>cg3344</i>	3,89	5,00E-05
FBgn0034470	<i>obp56d</i>	3,67	5,00E-05
FBgn0039510	<i>cg3339</i>	3,55	0.0001
<b>FBgn0033321</b>	<b><i>cg8738</i></b>	<b>3,35</b>	<b>0.0006</b>
FBgn0036880	<i>cpr76bc</i>	3,32	0.0012
<b>FBgn0260226</b>	<b><i>cg42500</i></b>	<b>3,12</b>	<b>0.0015</b>
FBgn0052364	<i>cg32364</i>	2,98	5,00E-05
FBgn0040813	<i>nplp2</i>	2,86	5,00E-05
FBgn0264265	<i>cr43765</i>	2,76	0.001
<b>FBgn0039682</b>	<b><i>obp99c</i></b>	<b>2,74</b>	<b>0.00025</b>
FBgn0031561	<i>cg16712</i>	2,63	0.00075
FBgn0039094	<i>cg10184</i>	2,60	0.00065

FBgn0034517	<i>cpr57a</i>	2,52	0.0002
FBgn0051955	<i>cg31955</i>	2,36	0.0001
FBgn0031602	<i>cg15431</i>	2,30	0.00065
FBgn0043783	<i>cg32444</i>	2,29	0.00125
FBgn0034837	<i>rpl22-like</i>	2,24	0.00025
FBgn0050016	<i>cg30016</i>	2,23	0.00125
<b>FBgn0028543</b>	<b><i>nimb2</i></b>	<b>2,22</b>	<b>0.00255</b>
<b>FBgn0034468</b>	<b><i>obp56a</i></b>	<b>2,16</b>	<b>5,00E-05</b>
FBgn0034098	<i>krimp</i>	1,91	5,00E-05
<b>FBgn0027791</b>	<b><i>o-fut2</i></b>	<b>1,85</b>	<b>0.00015</b>
FBgn0027087	<i>aats-his</i>	1,84	0.0002
FBgn0040060	<i>yip7</i>	1,81	0.00035
FBgn0053002	<i>mrpl27</i>	1,69	0.0014
FBgn0001258	<i>impl3</i>	1,63	0.0008
FBgn0037001	<i>cg6020</i>	1,60	0.001
FBgn0003275	<i>rpii18</i>	1,55	0.0032
FBgn0030365	<i>tango4</i>	1,54	0.0005
FBgn0030352	<i>cg15738</i>	1,47	0.00135
FBgn0038948	<i>psr</i>	1,46	0.0014
FBgn0021906	<i>rfesp</i>	1,44	0.0023
FBgn0083987	<i>snarn:u11</i>	2,60	0.00045
FBgn0262532	<i>cr43086</i>	2,3	0.00045
FBgn0026403	<i>ndg</i>	2,13	0.00275
FBgn0004959	<i>phm</i>	1,97	0.00235
FBgn0034354	<i>cg5224</i>	1,70	0.0013
FBgn0040251	<i>ugt86di</i>	-1,54	0.0006
FBgn0051262	<i>cg31262</i>	-2,42	0.0027
FBgn0033033	<i>scaf</i>	-1,45	0.00135
FBgn0031097	<i>obst-a</i>	-1,58	0.0008
<b>FBgn0010247</b>	<b><i>parp</i></b>	<b>-1,61</b>	<b>0.0004</b>
FBgn0011746	<i>ana</i>	-1,76	0.0001
FBgn0250869	<i>cg42240</i>	-1,90	0.0008
FBgn0033889	<i>cg6701</i>	-1,94	5,00E-05
FBgn0030852	<i>cg8316</i>	-2,13	0.00085
FBgn0031632	<i>cg15628</i>	-2,16	5,00E-05
<b>FBgn0052392</b>	<b><i>cg32392</i></b>	<b>-3,23</b>	<b>5,00E-05</b>
FBgn0022981	<i>rpk</i>	-3,34	5,00E-05
FBgn0000557	<i>ef1alpha100e</i>	-1,97	5,00E-05
FBgn0051436	<i>cg31436</i>	-3,53	5,00E-05
<b>FBgn0053346</b>	<b><i>cg33346</i></b>	<b>-inf</b>	<b>5,00E-05</b>
FBgn0033010	<i>atf6</i>	-1,46	0.00155

**Tabla S6:** genes diferencialmente expresados en condiciones de expresión de interferente respecto al control. Log2FoldChange>[1]; p Value< 0.05.

ID flybase	nombre	Log2(Fold Change)	p Value
FBgn0002534	<i>lcp3</i>	4,31	5,00E-05
FBgn0002535	<i>lcp4</i>	3,5	5,00E-05
<b>FBgn0002862</b>	<b><i>mst87f</i></b>	<b>inf</b>	<b>5,00E-05</b>
<b>FBgn0035779</b>	<b><i>cg8562</i></b>	<b>inf</b>	<b>5,00E-05</b>
FBgn0036227	<i>cg17826</i>	inf	5,00E-05
<b>FBgn0040959</b>	<b><i>peritrophin-15a</i></b>	<b>inf</b>	<b>5,00E-05</b>
FBgn0082997	<i>snoarn:psi28s-1232</i>	inf	0.0001
FBgn0053128	<i>cg33128</i>	inf	0.00015
FBgn0083004	<i>snoarn:psi28s-1175b</i>	inf	0.0002
FBgn0260955	<i>cg42587</i>	inf	0.00025
FBgn0065046	<i>snoarn:u3:9b</i>	inf	0.0006
<b>FBgn0086367</b>	<b><i>tan</i></b>	<b>inf</b>	<b>0.00025</b>
FBgn0085256	<i>cg34227</i>	5,10	5,00E-05
<b>FBgn0028400</b>	<b><i>syt4</i></b>	<b>5,05</b>	<b>5,00E-05</b>
<b>FBgn0035608</b>	<b><i>blanks</i></b>	<b>4.02</b>	<b>0.0002</b>
FBgn0000639	<i>fbp1</i>	4,58	0.00015
<b>FBgn0039682</b>	<b><i>obp99c</i></b>	<b>4,26</b>	<b>5,00E-05</b>
FBgn0031405	<i>cg4267</i>	4,23.	0.0001
<b>FBgn0033321</b>	<b><i>cg8738</i></b>	<b>4,20</b>	<b>0.0003</b>
FBgn0013949	<i>ela</i>	4,14	0.00055
FBgn0083987	<i>snarn:u11</i>	3,82	0.00015
FBgn0030105	<i>cg15369</i>	3,55	0.00045
FBgn0040398	<i>cg14629</i>	3,45	5,00E-05
FBgn0085815	<i>cr41605</i>	3,32	0.00015
<b>FBgn0013278</b>	<b><i>hsp70bb</i></b>	<b>3,20</b>	<b>0.0001</b>
FBgn0065099	<i>snarn:7sk</i>	3,14	0.0004
FBgn0040532	<i>cg8369</i>	3,04	0.00045
<b>FBgn0034468</b>	<b><i>obp56a</i></b>	<b>1,91</b>	<b>0.00125</b>
FBgn0085764	<i>cr40668</i>	2,70	5,00E-05
<b>FBgn0261647</b>	<b><i>axud1</i></b>	<b>2,67</b>	<b>0.00015</b>
<b>FBgn0027791</b>	<b><i>o-fut2</i></b>	<b>2,45</b>	<b>0.00115</b>
<b>FBgn0028543</b>	<b><i>nimb2</i></b>	<b>3,4869</b>	<b>5,00E-05</b>
FBgn0005670	<i>cyp4d1</i>	3,07	0.00045
FBgn0016694	<i>pdp1</i>	-2,45	0.0003
FBgn0087002	<i>rfabg</i>	-2,47	0.00025
FBgn0033108	<i>cg15236</i>	-2,55	5,00E-05
<b>FBgn0052392</b>	<b><i>cg32392</i></b>	<b>-3,06</b>	<b>5,00E-05</b>
<b>FBgn0010247</b>	<b><i>parp</i></b>	<b>-1,81</b>	<b>0.00155</b>
FBgn0020907	<i>scp2</i>	-inf	0.0001

FBgn0053346	cg33346	-inf	0.00035
-------------	---------	------	---------

**Tabla S7:** Genes que cambiaron en la misma dirección tanto en ganancia como en pérdida de función. Datos de ARN-seq.

Gen	Log2( $\Delta$ ) Ganancia de función	Log2( $\Delta$ ) Pérdida de de función
<i>DAxud1</i>	4,37	2,67
<i>hsp70bb</i>	4,16	3,2
<i>syt4</i>	4,78	5,05
<i>cg8562</i>	$\infty$	$\infty$
<i>mst87f</i>	$\infty$	$\infty$
<i>tan</i>	$\infty$	$\infty$
<i>obp99c</i>	2,74	4,26
<i>obp56a</i>	2,16	1,91
<i>peritrophin15a</i>	$\infty$	$\infty$
<i>cg32392</i>	-3,23	-3,96
<i>cg8738</i>	3,35	4,2
<i>cg33346</i>	0	0
<i>blanks</i>	5,34	4,02
<i>parp</i>	-1,61	-1,81
<i>o-fut2</i>	1,85	2,45
<i>nimb2</i>	2,22	3,48

## **Análisis de genes diferencialmente expresados en ganancia de función de DAXud1 identificados por ARN-seq: Funcionalidad y vinculación con genotipos**

Analizando los genes que aumentaron su expresión, de acuerdo a la clasificación por *Gene Ontology*, hay cinco grupos vinculados a procesos biológicos, siendo el más numeroso el de proteólisis, indicado en la Figura 12 que corresponde a 7 genes: CG3344 (peptidasa S10), CG8562 (peptidasa M14, Carboxipeptidasa tipo A), CG8299 (peptidasa S1, endopeptidasa), CG4734 (peptidasa S1A), CG12477 (ubiquitinaligasa E3), Yip7 (serina peptidasa) y CG8738 (serina peptidasa). Se analizarán a continuación los grupos de genes y sus componentes, haciendo énfasis en cómo es que la ganancia de función genera el fenotipo de muerte celular y arresto en G<sub>2</sub>-M.

Seis genes que codifican peptidasas, exepctuando CG8738 se expresan notoriamente en el intestino medio de larvas de estadio 3, y en menor medida en el de adulto (Tomancak y cols., 2002). Ello coincide con el patrón de expresión de DAXud1 en el desarrollo, ya que en estudios anteriores se reportó expresión en progenitores intestinales en la etapa 9 del desarrollo larvario (Glavic y cols., 2009).

Adicionalmente, un estudio de microarreglo de expresión de genes frente distintas condiciones de estrés en larvas de tercer estadio (disponible en *modEncodedatabase*; Contrino y cols., 2011) reveló que la expresión de estas peptidasas aumenta considerablemente y en conjunto frente a la exposición de etanol, Cadmio y rotenona.

Ninguna de estas proteasas putativas ha sido analizada de manera funcional en algún estudio, por lo que sólo se puede inferir que hay una tendencia

a expresarse en condiciones de estrés celular y posiblemente su expresión en el intestino podría desempeñar un rol en el procesamiento de alimento y defensa. No obstante, información de ortólogos está disponible en bases de datos (MEROPS database: Rawlings y cols., 2012). CG3344 es una peptidasa que pertenece a la familia S10, que actúa en lisosomas. CG8562 pertenece a la familia M14, de funciones diversas en anabolismo. CG8299 es parte de la familia S1, que son secretadas para el procesamiento de alimento y también producidas por células inmunes como efectores de citotoxicidad. Sobre CG4734 no hay datos salvo que se trataría de una metalocarboxilasa, sin estar asociada un grupo específico, similar es el caso de CG8738, del cual no hay mayores antecedentes.

CG12477 es una putativa E3 ubiquitina-ligasa, que tiene una alta homología con ubiquitinas ligasas con dedo de Zinc, perteneciente a una familia de proteínas llamada makorin, particularmente con makorin-1. Las E3 ligasas makorin están conservadas en todos los animales y se desempeña como ubiquitina ligasa específica para la subunidad TERT de la telomerasa, teniendo un efecto negativo en la división celular (Salvatico y cols., 2010). Sin embargo esta no parece ser una proteína *target* en *Drosophila*, ya que no se requiere de TERT para agregar repeticiones en los telómeros (Sasaki & Fujiwara, 2000), por lo que es posible que tenga otras proteínas como blanco para mediar la ubiquitinación.

Se ha reportado que en condiciones de estrés oxidativo de diferente naturaleza, aumenta la proteólisis (por expresión de peptidasas y ubiquitinaligasas E3) y a la vez la traducción de ARNm se ve disminuido globalmente, exceptuando elementos relacionados con la respuesta a estrés (Mehlhase & Grune, 2002;

Vogel y cols., 2011). En base a estos antecedentes, se refuerza la idea de que DAXud1 promueve la transcripción de genes de respuesta a estrés, fundamentada además con antecedentes que indican que AXUD1 de mamíferos aumenta su expresión frente a estrés oxidativo gatillado por metales (Cheng y cols., 2013) y por Doxorubicina (Yi y cols., 2006).

### **Componentes del citoesqueleto, microtúbulos**

Ambos transcritos, Tektin-C y CG3339 codifican para componentes de microtúbulos, en distintos contextos. Tektin-C es un componente estructural de microtúbulos que forman flagelos, otorgando estabilidad mecánica (Amos L., 2008), mientras que CG3339, si bien no se ha estudiado en *Drosophila*, corresponde a un ortólogo de la cadena pesada de Dineína, responsable del transporte retrógrado de vesículas y de ARNm (Myster & Peifer, 2001; Welte M., 2004). Hasta ahora no se ha vinculado la expresión de Tektin-C, ni de CG3339 con estrés oxidativo o alguna condición de estrés.

La proteína que corresponde a la cadena pesada de Dineína participa en el checkpoint G<sub>2</sub>-M, ya que se ha demostrado que la depleción de la proteína en cultivos celulares aumenta la tasa mitótica (Raaijmakers y cols., 2013). La dineína participa en el correcto posicionamiento de los centrosomas en la fase G<sub>2</sub>, y también recluta elementos de *checkpoint* en los cinetocoros (Raaijmakers y cols., 2013). Es posible que una sobreexpresión de proteínas que interactúan con microtúbulos generen inestabilidad del huso mitótico, por lo que podrían ser responsables del arresto del ciclo celular en G<sub>2</sub>-M observada en la ganancia de función de DAXud1.

## Gametogénesis

Tres son los genes principales de gametogénesis identificados: Krimp, Blanks y Mst87f. Krimp se expresa en niveles altos en el ovario adulto (Robinson y cols., 2013), mientras que Blanks y Mst87f tienen mayor expresión en testículo adulto. En *Drosophila* solo existen estudios sobre Krimp y Blanks, en los que se indica que son esenciales para el desarrollo de gametos, pero con funciones diferentes. Krimp se expresa casi exclusivamente en ovario adulto (Robinson y cols., 2013), específicamente en los oocitos a partir de su etapa en célula troncal hasta el huevo maduro (Lim y cols., 2007). Forma parte de la membrana perinuclear y su pérdida de función genera esterilidad debido a defectos en la polaridad de la división meiótica. Actúa uniéndose a ARNs mensajeros dirigiendo su localización e inhibiendo su traducción (Lim y cols., 2007; Anne J., 2010). Por otra parte, Blanks codifica para una proteína que se une a un ARN de doble hebra, contribuyendo al procesamiento para generar ARNi de modo independiente de RISC (Gerbasi y cols., 2008). Se expresa durante la etapa de espermatocito I hasta el espermio maduro y su pérdida de función provoca alteraciones en el desarrollo del espermio.

No existen antecedentes que vinculen a DAXud1 con gametogénesis, pero Krimp tiene cambios de expresión frente a cambios de DAXud1, por lo que es posible que tenga alguna relevancia en generación de ovarios, sin embargo la pérdida de función con el interferente IR-26479 inducido con el Tubulin>Gal4 no genera esterilidad, posiblemente porque la pérdida de función no es equiparable a

la de un mutante nulo, condición que permitiría analizar la relevancia de DAXud1 sobre el desarrollo y función de gónadas con mayor claridad.

### **Formación de cutícula**

Existe una expresión de transcritos que codifican para proteínas que forman parte de la estructura de la cutícula, particularmente de proteínas que se unen a la quitina para su estabilización en esta estructura. Se ha demostrado que la quitina tiene propiedades antioxidantes y que frente a estrés oxidativo hay una mayor síntesis de estos polisacáridos en levaduras (De Oliveira y cols., 2013). Además de formar parte de la cutícula en *Drosophila*, estas proteínas se sintetizan en el intestino, formando la barrera peritrópica (Wijffels y cols., 2002). Adicionalmente se ha documentado en *Drosophila* que la barrera peritrópica cumple funciones de protección contra patógenos y especies reactivas de oxígeno (Kuraishi y cols., 2011), reforzando la noción de que DAXud1 modula la respuesta a estrés oxidativo.

### **Sinapsis y percepción sensorial**

Respecto a los genes Obp51a, Obp99 y Nrp de percepción olfativa, éstos se expresan en células sensoriales odorantes, corresponden a proteínas secretadas por las dendritas y favorecen la unión ligando-receptor (Hekmat-Scafe y cols., 2002). Por otra parte SytIV y Tan participan en la función sináptica. La existencia de linajes neurales en disco imaginal de ala se debe a que el ala del adulto posee mecanoreceptores, los cuales provienen de neuroblastos que se diferenciaron a partir de células de tejido imaginal (Furman & Bukharina, 2008).

## **Genes no agrupados**

*rpL37b* es un constituyente estructural de los ribosomas, necesario para el ensamblaje de la subunidad 60S de eucariontes (Gamalinda y cols., 2013). Se ha descrito que su ortólogo en levaduras aumenta su expresión durante la exposición de metil-sulfonato (Tkach y cols., 2012), agente químico alquilante que genera estrés replicativo, ya que aumenta la tasa de error durante la replicación del ADN. Ello coincide con que los niveles de ARNm de AXUD1 aumentan considerablemente en cardiomiocitos de ratón expuestos a doxorubicina, agente que genera tanto estrés replicativo como oxidativo (Yi y cols., 2006).

Hsp70Bb es proteína chaperona que aumenta fuertemente durante estrés por calor e hipoxia (Gong & Golic, 2006). Lo interesante es que su expresión aumenta en condiciones de estrés, tal como RpL37 y el grupo relacionado con proteólisis que se encontraron en éste estudio. Hsp70Bb también se encuentra en el locus en donde DAXud1::GFP se relocaliza durante el estrés térmico, pudiendo ser un gen blanco directo.

El resto de los genes no ha sido estudiado, ni se ha encontrado alguna relación de co-expresión con algún estímulo estresor.

## **Genes cuya expresión de ARNm disminuyó en ganancia de función**

Según lo especificado en la Figura 11, 23 genes disminuyeron significativamente su expresión. No se elaboró un diagrama de red debido a que no hay relaciones documentadas entre ninguno de los genes. Sin embargo, entre estos el gen *Ef1 $\alpha$ 100E* podría estar vinculado con el fenotipo de muerte celular inducida por la ganancia de función de DAXud1.

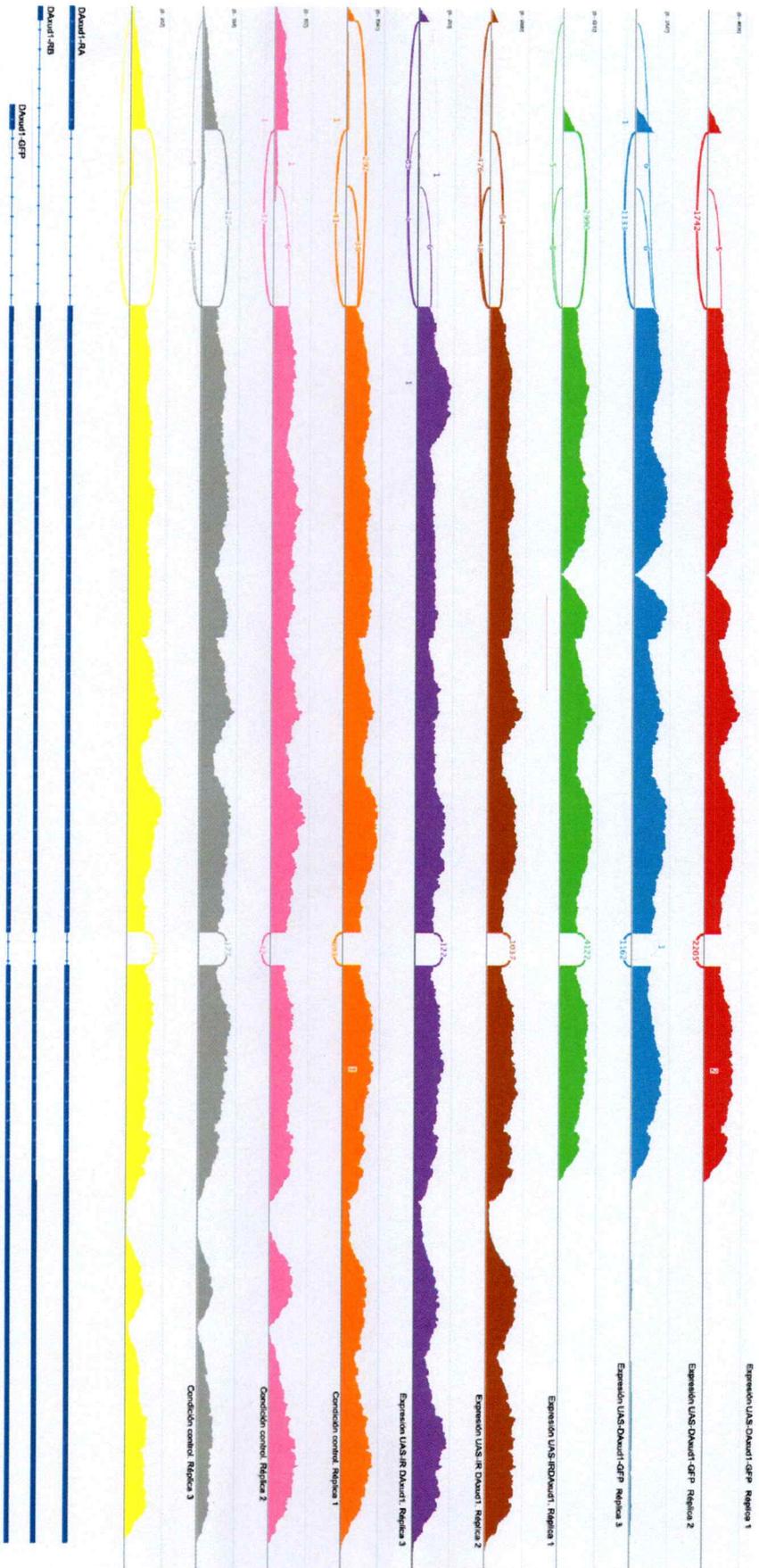
Ef1 $\alpha$ 100E es un factor de elongación de la traducción necesario para el posicionamiento del aminoacil-tARN en el sitio A del ribosoma durante la síntesis de proteínas (Lasko P., 2000). La baja de expresión de *Ef1 $\alpha$ 100E* es acorde al aumento de expresión de peptidasas, lo que hace suponer que en ganancia de función de DAXud1 se detona un proceso relacionado con respuesta a estrés. Las respuestas a estrés, específicamente para estrés oxidativo producidos por ROS, implican procesos de proteólisis y disminución de síntesis de proteínas (Mehlahse & Grune, 2002).

La disminución de la expresión de Ef1 $\alpha$  en líneas celulares de cáncer produce una disminución de la proliferación, migración y aumento de apoptosis (Edmonds y cols., 1996; Pecorari y cols., 2009) y por el contrario, la sobreexpresión de Ef1 $\alpha$  en líneas celulares humanas tiene un efecto antiapoptótico (Talapatra y cols., 2002). Misma situación se ha reportado en células de disco imaginal de ala en *Drosophila melanogaster*, y a la vez la disminución de la expresión de Ef1 $\alpha$ -100e se vincula con apoptosis independiente de p-53 (Van Bergeijk y cols., 2012).

Sobre los otros genes que disminuyeron su expresión, es interesante mencionar el gen *anachronism* (ana), codificante para una glicoproteína que es

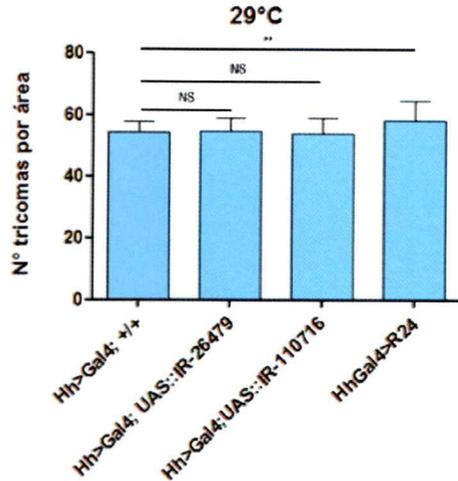
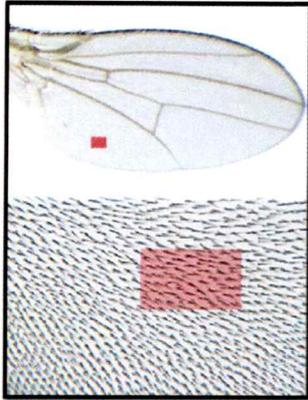
secretada por células gliales en el tejido del sistema nervioso central durante el desarrollo de la larva (Park y cols., 1997). Sobre este gen se comentará más adelante, ya que es un ejemplo de un posible rol represivo de DAXud1 en células de disco imaginal de ala.

Es necesario recalcar que el experimento de ARN-seq se realizó en disco imaginal de ala, cuya diferenciación celular apenas involucra neuronas y glía, por lo que posiblemente DAXud1 regule más genes en células precursoras del sistema nervioso, consistente con lo mostrado en vertebrados donde los homólogos de Daxud1 se expresa ampliamente en el tejido nervioso durante el desarrollo (Feijó y cols., 2009; Quinlan y cols., 2009; Simoes-Costa y cols., 2015).



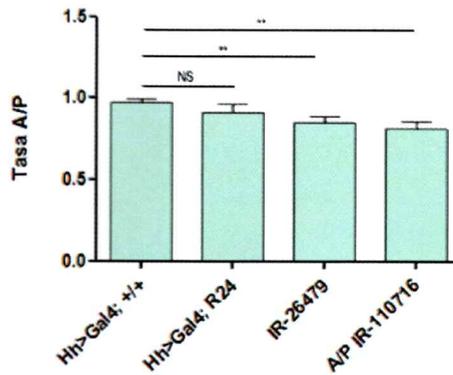
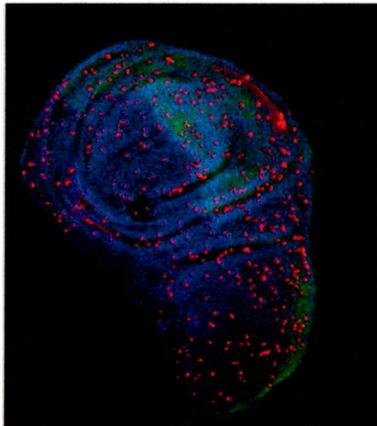
**Figura S17. Gráfico de *sashimi* que revela las variantes de splicing, así como el mapeo de los fragmentos. Cada fila se corresponde con una réplica de los experimentos (indicada en el lado derecho). En la zona inferior están graficadas las isoformas RA- y RB . En cada fila, en el extremo superior derecho, se indica las dimensiones del eje Y con números del cero en adelante, que representa la cantidad de fragmentos por región (altura de las figuras). Los eventos de *splicing* se indican con las uniones entre exones en que se indica un número, que indica la cantidad de reads que mapearon justo entre el exón 5' y el 3'.**

A



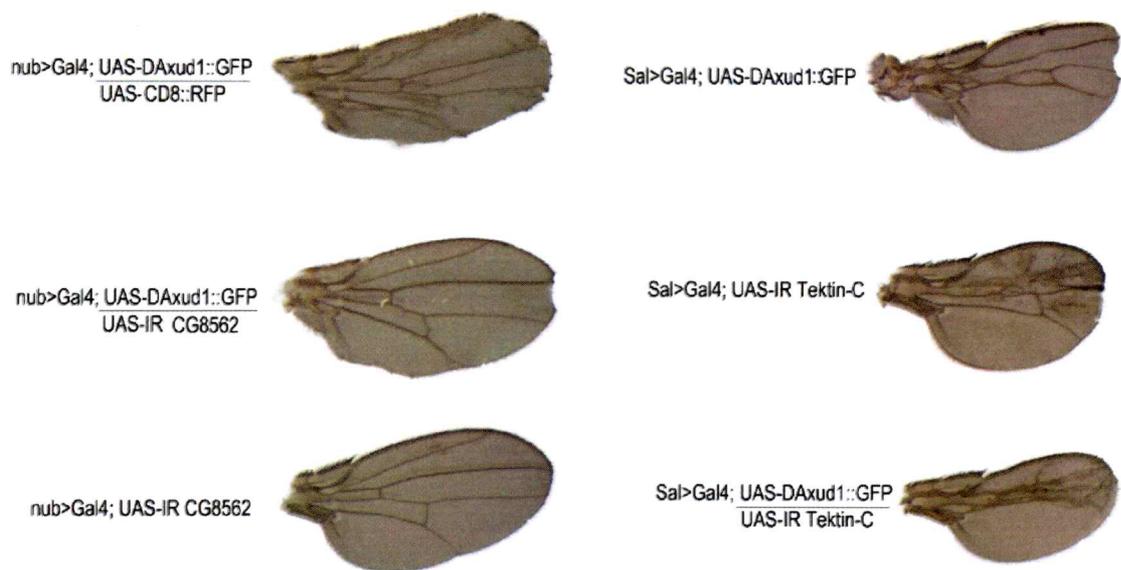
Comparación Test Tukey. \*\*  $p = 0.0053$  respecto control. Desarrollo a 29°C.

B



Comparación Test Tukey. \*\*  $p = 0.0416$  respecto control. Desarrollo a 29°C.

**Figura S18: Constructos de ARNi de DAXud1 generan fenotipos diferentes en densidad celular y PH3.** A) Utilizando el *driver hh*, que expresa Gal4 en posterior, se indujo expresión de interferentes en el compartimento posterior de ala, y se realizó conteo de tricomas en un área de 100  $\mu\text{m}^2$  en la zona ilustrada. B) Utilizando las mismas construcciones y genotipos que en A, se realizaron conteos de células en G<sub>2</sub>-M (marcadas en canal rojo, por inmunofluorescencia para PH3, marcador de esta etapa del ciclo celular), se observa que los tejidos que expresan el interferente de DAXud1 tienen un mayor índice mitótico, aunque bastante somero. Esto se realizó en compartimento posterior (Marcado en verde) y anterior, en discos imaginales de ala de tercer estadio, con esa información se hizo una proporción A/P para 20 discos de cada condición.



**Figura S19: prueba de interferentes para genes que aumentaron su expresión en ganancia de función.** En la columna de alas de la izquierda se observan los resultados del interferente para el gen CG8562, obteniendo una reversión del fenotipo. En la columna de alas de la derecha se pueden observar los resultados de un experimento similar, pero utilizando otro driver (*sal*>Gal4) debido a el driver *nubbin* produce un patrón de expresión del constructo UAS que produce letalidad en estadio larvario. Los animales se desarrollaron a 29°C.

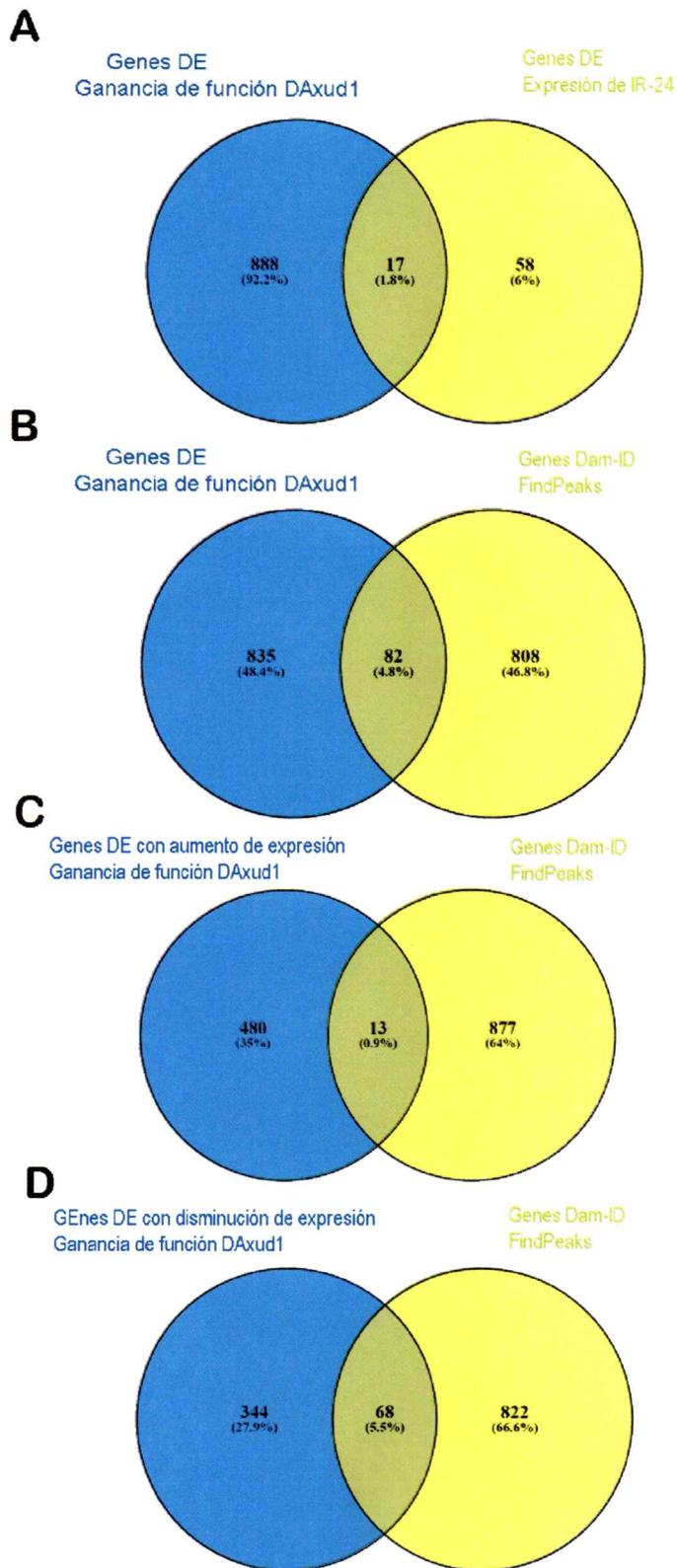


Figura S20: Diagramas de Venn de genes en común entre test de 2 réplicas (*Cuffdiff*) y genes con *peaks* positivos (*FindPeaks*).

## Script de Phyton para extracción de datos en *Cuffdiff* para generar listas en excel de ARN-seq: el "#" antecede comentarios sobre los comandos.

```
def main(diff_list):

    reader = csv.reader(open(diff_list), delimiter = "\t")

    next(reader)

    test_id, gene_id, gene, locus, sample_1, sample_2, status, value_1, value_2, log2_fold_change, test_stat, p_value,
q_value, significant = row #Se definen las variables

    if significant == "yes": #Expresión para extraer los significativos

#
    if log2_fold_change == "inf" or ("inf" in log2_fold_change) == False and float(log2_fold_change)>= 1 ): #Expresion
para filtrar los log2_fold_change mayores que 1 o inf

#
    if q_value == "1" or ("1" in q_value) == False and float(q_value) <= 0.211 ): #Expresion para filtrar los
log2_fold_change menores que -1 o -inf

#
    if (log2_fold_change == "inf" or ("inf" in log2_fold_change) == False and float(log2_fold_change)>= 1 )) or
(log2_fold_change == "-inf" or ("inf" in log2_fold_change) == False and float(log2_fold_change) <= -1 ): #ambas

        print test_id,gene, locus, sample_1, sample_2, status, value_1, value_2, log2_fold_change, test_stat,
p_value, q_value, significant #Expresión para imprimir mas variables listandolas separadas por ",". Por ejemplo test_id, log2_fold_change,
significant

if __name__ == '__main__':
```

**Tabla S9:** GO de procesos biológicos en test de 2 réplicas de ARN-seq para los genes sobre-regulados en ganancia de función de DAXud1.

Clave Proceso Biológico	Nombre Proceso biológico	Número de genes	FDR
GO.0034641	Procesos metabólicos celulares de procesamiento de nitrógeno	126	2.21e-21
GO.0044237	Procesos metabólicos celulares	186	2.19e-17
GO.0006119	Fosforilación oxidativa	27	4.75e-17
GO.0022900	Cadena transportadora de electrones	27	2.74e-16
GO.0042773	Síntesis de ATP acoplada a transporte de electrones	25	8.61e-16
GO.0046034	Metabolismo de ATP	31	2.26e-15
GO.0042775	Síntesis mitocondrial de ATP	24	2.36e-15

**Tabla S10:** vías KEEG en genes sobre-regulados en el análisis de ARN-seq por 2 réplicas en ganancia de función de DAXud1.

Clave vía KEEG	Nombre vía KEEG	Número de genes	FDR
dme190	Fosforilación oxidativa	33	3.94e-17
dme1100	Procesos metabólicos	83	1.41e-15
dme3050	Proteosomas	13	2.54e-07
Dme1200	Metabolismo de carbono	16	8.98e-06
dme3010	Ribosoma	18	8.98e-06
dme3040	Spliceosoma	17	8.98e-06
dme620	Metabolismo de piruvato	9	0.000663
dme640	Metabolismo de propanoato	6	0.000663
dme280	Degradación de valina, leucina e isoleucina	7	0.000764
dme3018	Degradación de ARN	9	0.000764
dme3060	Exportación de proteínas	6	0.000764
dme3013	Transporte de ARNm	14	0.00135
dme270	Metabolismo de cisteína y metionina	6	0.0018

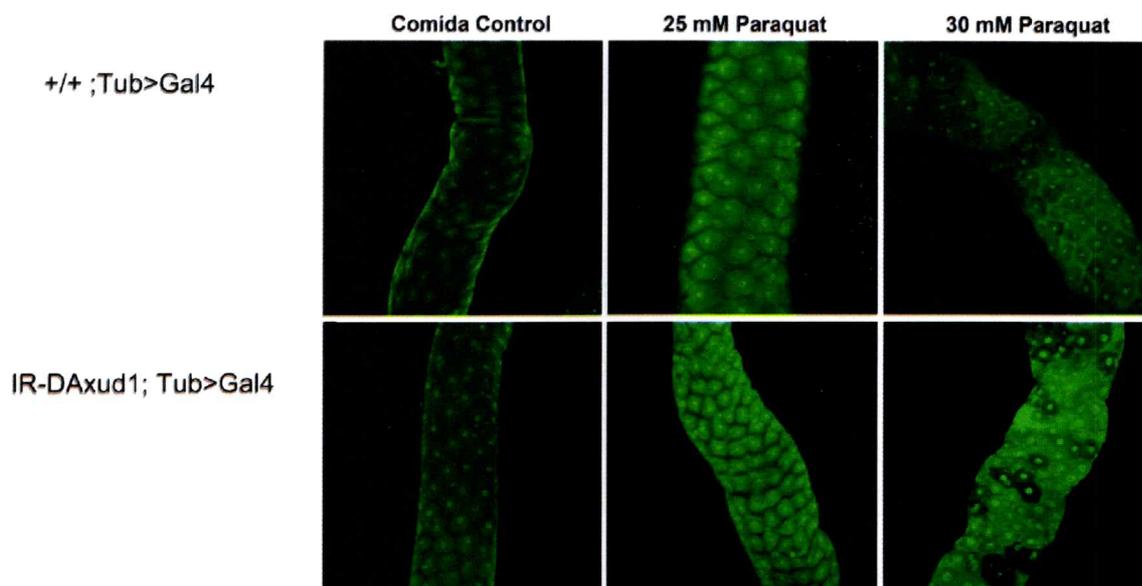
**Tabla S11:** Categorías GO de Procesos Biológicos de genes sub-regulados en el análisis de ARN-seq por 2 réplicas en ganancia de función de DAXud1.

Clave Categoría	Nombre Proceso Biológico	Número de Genes	FDR
GO:0007444	Desarrollo de disco imaginal	59	9,51E-05
GO:0002165	Desarrollo pupal y larval	59	1,98E-02
GO:0009791	Desarrollo post-embrionario	60	2,38E-02
GO:0000902	Morfogénesis celular	60	6,05E-03
GO:0007552	Metamorfosis	54	1,22E-01
GO:0007472	Morfogénesis de disco imaginal	42	6,19E-02
GO:0048707	Morfogénesis puparia	52	6,20E-02

**Tabla S12:** vías KEEG en genes sub-regulados en el análisis de ARN-seq por 2 réplicas en ganancia de función de DAXud1.

Clave vía KEEG	Nombre vía KEEG	Número de genes	FDR
dme04310	Vía Wnt	11	0.02239
dme04320	Formación de eje Dorso-ventral	7	0.05019
dme04013	Señalización MAPK	5	0.01124
dme04630	Señalización Jak-STAT	5	0.01392
dme04350	Señalización TGF-beta	6	0.01923
dme04330	Señalización vía Notch	4	0.01787
dme03018	Degradación ARN	5	0.03242

## ANEXO 5: pérdida de función de DAXud1 genera fenotipos de susceptibilidad frente a exposición a Paraquat, Peróxido de Hidrógeno y condiciones de ayuno

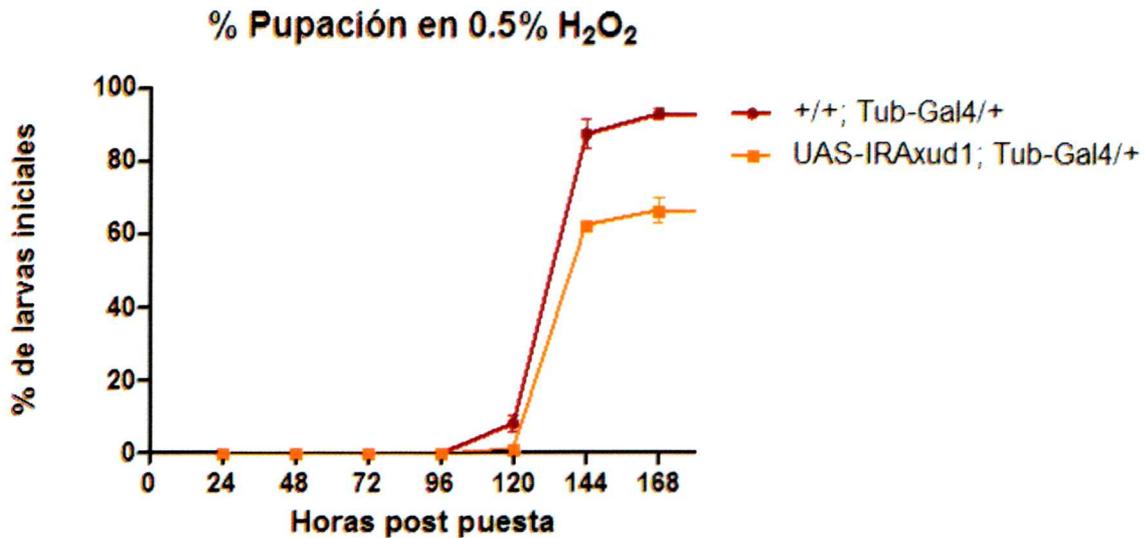


**Figura S21: Animales con pérdida de función de DAXud1 genera una mayor muerte celular en intestinos de animales alimentados con Paraquat.** Se muestran las secciones posteriores del intestino medio de larvas control estadio 3 y larvas que expresaban ubicuamente interferente de DAXud1, que fueron alimentadas por 24 horas con comida suplementada con Paraquat (agente químico generador de estrés oxidativo). Las células muertas se revelaron con naranja de acridina.

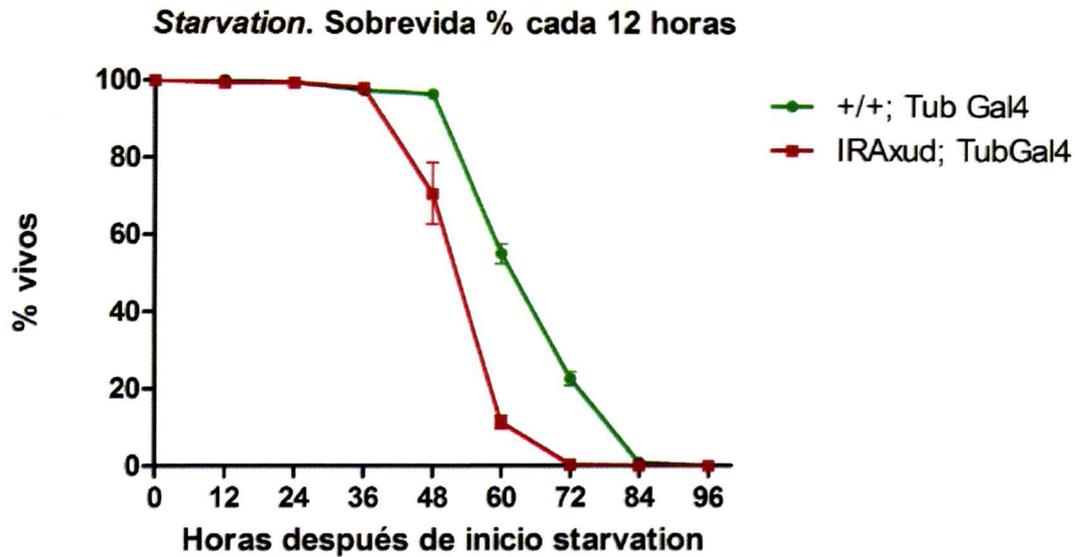
### Tinción naranja de acridina en intestinos

Larvas alimentadas con comida control o con Paraquat adicionado en diferentes concentraciones fueron disectadas para extraer su intestino y analizar el segmento posterior para observar muerte celular. La muerte celular se observó con naranja de acridina (2,5µg/ml en PBS 1X) sin fijación previa. Los tejidos se tiñeron durante 5 minutos, posteriormente se lavó el exceso sumergiendo el tejido teñido por 5 minutos en PBS 1X. Inmediatamente los intestinos fueron montados

en portaobjetos y analizados con microscopía confocal utilizando 488 nm como longitud de onda de excitación y detector de fluorescencia a 530 nm.



**Figura S22: Animales con pérdida de función de D<sub>A</sub>xud1 presentan un menor porcentaje de pupación que los animales control al crecer en medio con Peróxido de Hidrógeno .** Se realizaron ensayos de pupación similares a los de exposición a estrés térmico del Objetivo 1. Se realizaron puestas de 6 horas en placas con levadura, al día siguiente se rescataron las larvas sin fenotipo TM6B y se pusieron en medio normal hasta el estadio larvario 2. Las larvas en estadio larvario 2 (72 horas post puesta) se trasladaron a medio de crecimiento Carolina suplementado con 0.5% v/v de Peróxido de Hidrógeno en grupos de 25 larvas por vial, 3 réplicas de cada grupo experimental (Total 6 tubos). La temperatura de desarrollo fue de 29°C.



**Figura S23: Animales adultos con pérdida de función de DAxud1 son más sensibles a falta de nutrientes que la condición control. Se colectaron animales 12 horas post-eclosión en 3 grupos por condición de 70 animales cada uno. Experimento se realizó con animales a 29°C.**

### **Ensayos de Ayuno o *Starvation***

Para los experimentos de restricción nutricional se aislaron moscas adultas nacidas antes de 48 horas las que se separaron por género. 40 moscas por vial se pusieron en viales con agarosa, el que se cambió cada día, a la misma hora descartando y contando los animales muertos.

## **Resultados**

Los animales con menor expresión de DAXud1 tienen una menor sobrevida en condiciones de restricción nutricional total (Figura S23). Este resultado se condice con una relación ya establecida entre respuesta a estrés térmico y ayuno. En esta relación (Dokladny y cols., 2013) se ha establecido que el proceso de autofagia puede ser bloqueado por la inducción de proteínas Hsp70 en eucariontes, siendo una explicación para el resultado de la Figura S23, en que la menor expresión de DAXud1 tendría como consecuencia una menor inducción de la expresión de Hsp70 respecto a las condiciones control.

### **Experimentos de estrés oxidativo y térmico**

Para los experimentos de estrés oxidativo, se transfirieron larvas del fenotipo correspondiente (Control y experimental) en cantidad suficiente por vial (>30 larvas) y en triplicado. El medio de crecimiento inicial fue el indicado anteriormente y para los experimentos se utilizó medio Carolina 4-24. Para los controles el medio se preparó con agua destilada, en volumen 1:1, mientras que para las condiciones experimentales se utilizó la solución acuosa en la concentración indicada en el experimento, mezclada 1:1 en volumen con el medio.

En los ensayos de estrés térmico se utilizó el medio normal de harina, agar y levadura. En que las larvas y adultos se expusieron a 37°C y a 39°C en los tiempos correspondientes a cada experimento.

## BIBLIOGRAFÍA ANEXOS

- Anne, J. 2010. Targeting and anchoring Tudor in the pole plasm of the *Drosophila* oocyte. *PLoS One*, 5(12), e14362.
- Bullard, J. H., Purdom, E., Hansen, K. D., & Dudoit, S. 2010. Evaluation of statistical methods for normalization and differential expression in mRNA-Seq experiments. *BMC Bioinformatics*, 11, 94.
- Chatr-Aryamontri, A., Breitkreutz, B. J., Oughtred, R., Boucher, L., Heinicke, S., Chen, D., Tyers, M. 2015. The BioGRID interaction database: 2015 update. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), D470–D478.
- Contrino, S., Smith, R. N., Butano, D., Carr, A., Hu, F., Lyne, R., Micklem, G. 2012. modMine: flexible access to modENCODE data. *Nucleic Acids Research*, 40(Database issue), D1082–8.
- Chintapalli, V. R., Wang, J., & Dow, J. a T. 2007. Using FlyAtlas to identify better *Drosophila melanogaster* models of human disease. *Nature Genetics*, 39(6), 715–20.
- de Oliveira, M. V., Oliveira, A. C. D. F., Shida, C. S., de Oliveira, R. C., & Nunes, L. R. 2013. Gene expression modulation by paraquat-induced oxidative stress conditions in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 60, 101–9.
- Dechat, T., Adam, S. A., Taimen, P., Shimi, T., & Goldman, R. D. 2010. Nuclear lamins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(11), 1–23.
- Dokladny, K., Zuhl, M. N., Mandell, M., Bhattacharya, D., Schneider, S., Deretic, V., & Moseley, P. L. 2013. Regulatory coordination between two major intracellular homeostatic systems: Heat shock response and autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 288(21), 14959–14972.
- Edmonds, B. T., Wyckoff, J., Yeung, Y. G., Wang, Y., Stanley, E. R., Jones, J., ... Condeelis, J. 1996. Elongation factor-1 alpha is an overexpressed actin binding protein in metastatic rat mammary adenocarcinoma. *Journal of Cell Science*, 109 Pt 1, 2705–14.
- Feijóo, C. G., Sarrazin, A. F., Allende, M. L., & Glavic, A. 2009. Cystein-serine-rich nuclear protein 1, Axud1/Csrnp1, is essential for cephalic neural progenitor proliferation and survival in zebrafish. *Developmental Dynamics*, 238(8), 2034–43.
- Furman, D. P., & Bukharina, T. a. 2008. How *Drosophila melanogaster* Forms its Mechanoreceptors. *Current Genomics*, 9(5), 312–23.

- Gamalinda, M., Jakovljevic, J., Babiano, R., Talkish, J., de la Cruz, J., & Woolford, J. L. 2013. Yeast polypeptide exit tunnel ribosomal proteins L17, L35 and L37 are necessary to recruit late-assembling factors required for 27SB pre-rRNA processing. *Nucleic Acids Research*, 41(3), 1965–83.
- Gerbasi, V. R., Preall, J. B., Golden, D. E., Powell, D. W., Cummins, T. D., & Sontheimer, E. J. 2011. Blanks, a nuclear siRNA/dsRNA-binding complex component, is required for *Drosophila* spermiogenesis. *PNAS*, 108(8), 3204–9.
- Gong, W. J., & Golic, K. G. 2006. Loss of Hsp70 in *Drosophila* is pleiotropic, with effects on thermotolerance, recovery from heat shock and neurodegeneration. *Genetics*, 172(1), 275–86.
- Hekmat-Safe, D. S., Safe, C. R., McKinney, A. J., & Tanouye, M. a. 2002. Genome-wide analysis of the odorant-binding protein gene family in *Drosophila melanogaster*. *Genome Research*, 12(9), 1357–69.
- Kuraishi, T., Binggeli, O., Opota, O., Buchon, N., & Lemaitre, B. (2011). Genetic evidence for a protective role of the peritrophic matrix against intestinal bacterial infection in *Drosophila melanogaster*. *PNAS*, 108(38), 15966–71.
- Lasko, P. (2000). The *Drosophila melanogaster* Genome : Translation Factors and RNA, 150(2), 51–56.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408.
- Lim, A. K., & Kai, T. 2007. Unique germ-line organelle, nuage, functions to repress selfish genetic elements in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(16), 6714–9.
- McGinnis, W., & Krumlauf, R. 1992. Homeobox genes and axial patterning. *Cell*, 68(2), 283–302.
- Mehlhase, J., & Grune, T. 2002. Proteolytic response to oxidative stress in mammalian cells. *Biological Chemistry*, 383(3–4), 559–67.
- Mellacheruvu, D., Wright, Z., Couzens, A. L., Lambert, J.-P., St-Denis, N. A., Li, T. N., et al. 2013. The CRAPome: a contaminant repository for affinity purification–mass spectrometry data. *Nature Methods*, 10(8), 730–736.

- Moreno, E., & Morata, G. 1999. Caudal is the Hox gene that specifies the most posterior *Drosophila* segment. *Nature*, 27(6747), 873–877.
- Myster, S. H., & Peifer, M. 2001. Wingless can't fly so it hitches a ride with dynein. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 23(10), 869–72.
- Pecorari, L., Marin, O., Silvestri, C., Candini, O., Rossi, E., Guerzoni, C., Calabretta, B. 2009. Elongation Factor 1 alpha interacts with phospho-Akt in breast cancer cells and regulates their proliferation, survival and motility. *Molecular Cancer*, 8, 58.
- Quinlan, R., Graf, M., Mason, I., Lumsden, A., & Kiecker, C. 2009. Complex and dynamic patterns of Wnt pathway gene expression in the developing chick forebrain. *Neural Development*, 4(Dv), 35.
- Raaijmakers, J. a, Tanenbaum, M. E., & Medema, R. H. 2013. Systematic dissection of dynein regulators in mitosis. *The Journal of Cell Biology*, 201(2), 201–15.
- Rawlings, N. D., Barrett, A. J., & Bateman, A. 2012. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research*, 40(Database issue), D343-50.
- Robinson, S. W., Herzyk, P., Dow, J. a T., & Leader, D. P. 2013. FlyAtlas: database of gene expression in the tissues of *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Research*, 41(Database issue), D744-50.
- Salvatico, J., Kim, J. H., Chung, I. K., & Muller, M. T. 2010. Differentiation linked regulation of telomerase activity by Makorin-1. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 342(1–2), 241–50.
- Sasaki, T., & Fujiwara, H. 2000. Detection and distribution patterns of telomerase activity in insects. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 267(10), 3025–31.
- Talapatra, S., Wagner, J. D. O., & Thompson, C. B. 2002. Elongation factor-1 alpha is a selective regulator of growth factor withdrawal and ER stress-induced apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 9(8), 856–61.
- Tkach, J. M., Yimit, A., Lee, A. Y., Riffle, M., Costanzo, M., Jaschob, D., Brown, G. W. 2012. Dissecting DNA damage response pathways by analysing protein localization and abundance changes during DNA replication stress. *Nature Cell Biology*, 14(9), 966–76.

- Tomancak, P., Beaton, A., Weiszmam, R., Kwan, E., Shu, S., Lewis, S. E., Rubin, G. M. 2002. Systematic determination of patterns of gene expression during *Drosophila* embryogenesis. *Genome Biology*, 3(12), RESEARCH0088.
- Trapnell, C., Hendrickson, D. G., Sauvageau, M., Goff, L., Rinn, J. L., & Pachter, L. 2013. Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. *Nature Biotechnology*, 31(1), 46–53.
- van Bergeijk, P., Heimiller, J., Uyetake, L., & Su, T. T. 2012. Genome-wide expression analysis identifies a modulator of ionizing radiation-induced p53-independent apoptosis in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One*, 7(5), e36539.
- Vogel, C., Silva, G. M., & Marcotte, E. M. 2011. Protein expression regulation under oxidative stress. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 10(12), M111.009217.
- Welte, M. a. 2004. Bidirectional transport along microtubules. *Current Biology : CB*, 14(13), R525-37.
- Wilhelm, B. T., & Landry, J.-R. (2009). RNA-Seq-quantitative measurement of expression through massively parallel RNA-sequencing. *Methods (San Diego, Calif.)*, 48(3), 249–57.
- Wijffels, G., Eisemann, C., Riding, G., Pearson, R., Jones, a, Willadsen, P., & Tellam, R. 2001. A novel family of chitin-binding proteins from insect type 2 peritrophic matrix. cDNA sequences, chitin binding activity, and cellular localization. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(18), 15527–36.
- Winnebeck, E. C., Millar, C. D., & Warman, G. R. (2010). Why does insect RNA look degraded? *Journal of Insect Science*, 10(159), 159.
- Xu, S., Grullon, S., Ge, K., & Peng, W. 2014. Spatial Clustering for Identification of ChIP-Enriched Regions (SICER) to Map Regions of Histone Methylation Patterns in Embryonic Stem Cells. In B. L. Kidder (Ed.), *Stem Cell Transcriptional Networks: Methods and Protocols*, Vol. 150 (pp. 97–111).
- Yi, X., Bekerredjian, R., DeFilippis, N. J., Siddiquee, Z., Fernandez, E., & Shohet, R. V. (2006). Transcriptional analysis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 290(3), H1098-102.