

00591
10

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y MOLECULAR DEL GENE *tonalli (tna)*
EN *Drosophila melanogaster*.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

BIÓLOGO LUIS MANUEL GUTIÉRREZ GALINDO

CUERNAVACA, MORELOS

SEPTIEMBRE 2003

A



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PAGINACIÓN DISCONTINUA

INDICE

ABSTRACT	1
RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	3
1.- Los genes selectores	3
2.- Establecimiento de la expresión de los genes HOM	5
3.- Control de la expresión genética y el código de histonas	5
4.- Mantenimiento de la expresión de los genes HOM	7
5.- Represión de los genes HOM	8
5a.- Los complejos Pc-G	8
5b.- El modelo del trans-silenciamiento para el gene <i>Scr</i>	10
6.- Activación de los genes HOM: Complejos <i>trx-G</i>	13
7.- Antagonismo entre los factores Pc-G y <i>trx-G</i>	15
8.- La maquinaria de transcripción basal	17
9.- El complejo TFIIH	18
10.- La RNA polimerasa II	19
11.- El complejo Mediador	20
12.- Sumoilación	21
13.- Sumoilacion de factores asociados a la cromatina	22
JUSTIFICACION	25
OBJETIVOS	26
RESULTADOS	28
1.- Caracterización genética y molecular <i>tna</i> del gene	28
2.- Los genes <i>tna</i> y <i>tara</i> son miembros del grupo de genes <i>trx-G</i>	28
3.- Los genes <i>tna</i> y <i>tara</i> interactúan genéticamente con el gene <i>Antp</i>	28

B

4.- Mutaciones en los genes *RpIII140*, *hay* y *mrn* modifican diferencialmente la desrepresión de los genes *Scr* y *Ubx* 30

PUBLICACIONES 33

(343-354)

(I-XXVI)

DISCUSION 34

1.- Tna y Tara como modificadores postraduccionales de la transcripción 34

2.- El reclutamiento del complejo BRM, Tna y Tara a la cromatina activa 35

3.- El sistema de modificación postraduccional sumo/ubiquitina y su relación con el código de histonas 37

4.- El papel de los factores TFIIH y RNAPolII en la desrepresión de genes HOM..... 38

5.- Mrn como una posible subunidad regulatoria de TFIIH 40

5.- Propiedades regulatorias de componentes de la RNAPolII 40

CONCLUSIONES 43

PERSPECTIVAS 45

BIBLIOGRAFÍA 46

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Luis Manuel Gutiérrez Galindo

FECHA: 12 Septiembre 2003

FIRMA: [Firma manuscrita]

C

ABSTRACT

The developmental role of homeotic genes function is controlled at many levels by general and specific regulators. For example, the Brahma (Brm) chromatin-remodeling complex is necessary for the transcriptional regulation of homeotic genes. This activity of this complex requires the assistance of auxiliary factors. In this work we have identified the *tonalli* (*tna*) and *taranis* (*tara*) genes as genetic modifiers of *brahma* (*brm*). The *brm* gene encodes an ATPase and is a catalytic subunit of the Brm complex. The *tna* locus is necessary for the adequate expression of *Antennapedia* (*Antp*), *Sex combs reduced* (*Scr*) and *Ultrabithorax* (*Ubx*) homeotic genes. Moreover, *tna* genetically interacts with subunits of the Brm, Mediator and Kismet complexes. The *tna* gene encodes two alternative proteins; the large isoform has an SP-RING domain. A set of related proteins, called the PIAS family, uses this domain for the sumoylation of specific substrates. It has been proposed that sumoylation is a covalent modification that is thought to be involved in the regulation of proteins subcellular localization. It also has a role as an antagonist of protein degradation by ubiquitylation. We propose that *Tna* is involved in posttranslational modification of chromatin modifiers and/or transcriptional coactivators. We also show that phenotypes caused by derepression of homeotic genes are sensitive enough to uncover, *in vivo*, the activity of some subunits of the basal transcriptional complexes TFIIF and the RNA polymerase II holoenzyme [i.e. Haywire (*Hay*), the p52 subunit called Marionette (*Mrn*) and *RpII140*]. Some point mutations in the *hay* and *RpII140* genes act as modifiers of the *Ubx* derepression. The silent state of the *Scr* gene in some tissues can be derepressed by Polycomb mutations or by destabilizing a pairing-dependent system. Both backgrounds are strongly suppressed by a *RpII140* point mutation. Nevertheless, *hay* and *mrn* point mutations only modify *Scr* phenotypes in the context of pairing-dependent derepression *Scr*. We speculate that mutations in these genes produce toxic proteins that act conflicting players in the regulatory environment in homeotic gene function.

RESUMEN

La función de los genes homeóticos durante el desarrollo es controlada a distintos niveles por reguladores generales y específicos. Por ejemplo, el complejo remodelador de la cromatina Brahma se necesita durante la regulación transcripcional de los genes homeóticos. La actividad de este complejo sobre sus blancos requiere de la ayuda de factores auxiliares. En este trabajo identificamos a los genes *tonalli (tna)* y *taranis (tara)* como modificadores genéticos del gene *brahma (brm)*. El gene *brm* codifica para una ATPasa presente en el complejo remodelador del mismo nombre. El locus *tna* es necesario para la expresión correcta de los genes homeóticos *Antennapedia (Antp)*, *Sex combs reduced (Scr)* y *Ultrabithorax (Ubx)*. Además, *tna* interactúa con subunidades de los complejos Brm, Mediador y Kismet. El gene *tna* codifica para dos proteínas alternativas y la isoforma grande contiene un motivo SP-RING. Este motivo se presenta en un conjunto de proteínas conocidas como la familia PIAS y está involucrado en la sumoilación de substratos específicos. Se ha propuesto que la sumoilación es una modificación covalente que regula la localización subcelular de proteínas y también antagoniza la degradación por ubiquitinación. La función molecular de Tna podría ser la modificación postraduccional de modificadores de la cromatina y/o coactivadores. Además, encontramos que los fenotipos provocados por la derepresión de genes homeóticos son útiles para mostrar la actividad de subunidades de los complejos basales de transcripción conocidos como TFIID y la holoenzima polimerasa II de RNA [i.e. Haywire (Hay), la subunidad p52 denominada Marionnette (Mrn) y Rpl140]. Algunas mutaciones puntuales en *hay* y *Rpl140* son aumentadores del fenotipo provocado por la derepresión de *Ubx*. El gene *Scr* silenciado está inactivado en algunos tejidos y puede ser desreprimido por mutantes en Polycomb ó por mutaciones que desestabilizan sus interacciones represivas dependientes de apareamiento. Una mutación puntual en *Rpl140* suprime la derepresión de *Scr* en cualquier fondo genético. No obstante, mutantes puntuales en *hay* y *mrn* sólo modifican la derepresión del locus *Scr* en condiciones que dependen de apareamiento cromosomal. Explicamos lo anterior proponiendo que la presencia de proteínas tóxicas para estos factores afectan el entorno regulatorio de la función de los genes homeóticos.

INTRODUCCIÓN

1.- Los genes selectores.

El problema fundamental de la biología del desarrollo es entender cómo un huevo fertilizado crece y forma un cuerpo adulto. Las células de los animales tienen una identidad propia la cual es programada por la actividad de los genes selectores. Originalmente estos genes fueron definidos por su propiedad de regular los destinos de grupos de células (García-Bellido, 1975). Actualmente, el concepto de gene selector es más amplio y comprende a los genes que controlan la identidad celular, tisular, de órganos y de regiones amplias del cuerpo de los animales (Mann y Carroll, 2002).

El insecto *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) se ha usado para evaluar la función de los genes selectores. En este organismo se pueden definir cuatro grandes grupos: los genes selectores específicos de región (1), de campo (2), de órganos o tejidos (3) y de células (4). Mutantes que provocan la pérdida de la actividad de alguno de ellos provoca la ausencia de estructuras morfológicas particulares (Mann y Carroll, 2002). Por ejemplo, la inactivación de los genes selectores específicos de región (los genes homeóticos o HOM) produce transformaciones morfológicas de una parte del cuerpo a otra. Lo anterior indica que existe una regulación cruzada entre los diferentes selectores HOM (Kaufman et al, 1990; Mann y Carroll, 2002).

Los genes HOM de *D. melanogaster* codifican para factores de transcripción que contienen un motivo de unión a DNA conocido como homeodominio. Como se observa en la Figura 1, los genes HOM se expresan en dominios discretos en el cuerpo de la mosca y controlan la expresión de varios genes blanco que participan en el desarrollo de las estructuras corporales. Los genes HOM están ubicados en dos loci separados: El complejo *Antennapedia* (ANTC) incluye los genes *Antennapedia* (*Antp*), *Sex combs reduced* (*Scr*), *Deformed* (*Dfd*), *proboscipedia* (*pb*) y *labial* (*lab*) (Kaufman et al, 1990). El complejo *Bithorax* (BXC) está formado por los genes *Ultrabithorax* (*Ubx*), *abdominal-A* (*abd-A*) y *Abdominal-B* (*Abd-B*) (Sánchez-Herrero et al, 1985).

La función de *Antp* es necesaria durante el desarrollo de la región del mesotórax T2 y de las patas derivadas de los tres compartimientos torácicos T1, T2 y T3 (Figura 1). *Antp* reprime la identidad de ojo-antena en todos los segmentos del tórax. Los genes *lab*, *pb* y *Dfd* son requeridos para promover activamente el desarrollo de la cabeza y reprimir el desarrollo del tórax en la cabeza (Abbot y Kaufman, 1986; Abzhanov et al, 2001; Kaufman et al, 1990). El producto del gene *Scr* se requiere para el desarrollo de la identidad de las células del primer segmento torácico (T1) y del labrum (Kennison et al, 1998). En el caso del complejo *BX-C*, los tres loci del complejo (Figura 1) determinan el patrón morfológico de las regiones del tórax posterior (*Ubx*⁺) y de los segmentos abdominales (*abd-A* y *Abd-B*). Además, se necesita la contribución de los tres genes de este complejo para impedir el desarrollo de la identidad torácica en el abdomen (Sánchez-Herrero et al, 1985). Por ejemplo, se sabe que la deleción completa del complejo provoca la transformación de todos los segmentos T3 y abdominales (A1-A8) hacia la identidad del segmento torácico T2 (Lewis, 1978).

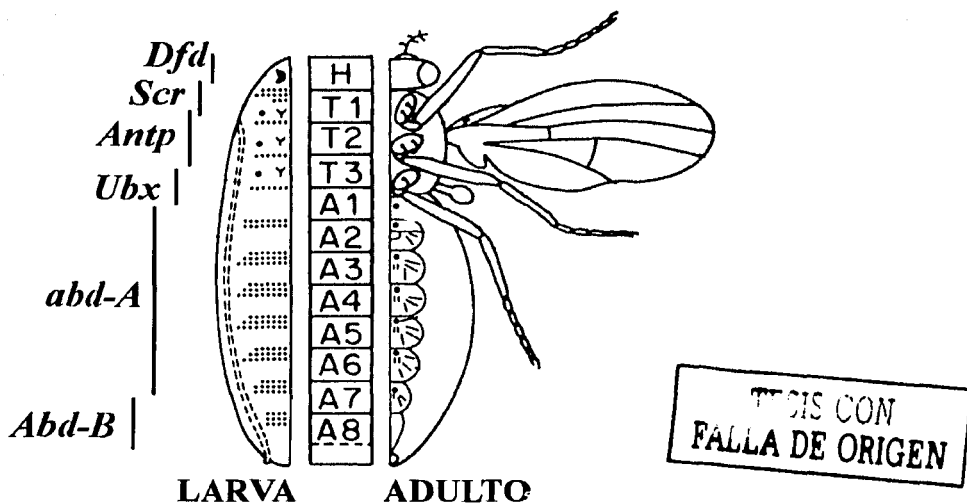


Figura 1. Los genes de los complejos *ANTP* y *BX* asignan la identidad morfológica de los derivados cuticulares ventrales durante el desarrollo de *Drosophila* (Imágen tomada de Lewis, 1978). H corresponde al segmento de la cabeza, T1-T3 a los torácicos y A1-A8 para los abdominales.

2.- Establecimiento de la expresión de los genes HOM.

Durante la embriogénesis temprana de *D. melanogaster*, el estado transcripcional de los genes HOM se establece por la cascada regulatoria que participa en la formación de los segmentos. Los genes HOM se empiezan a transcribir poco antes del inicio de la celularización del blastodermo del embrión en amplios dominios sobrelapantes y requieren de la función activadora de los genes de segmentación conocidos como pair-rule (Ingham, 1988; Ingham y Martínez-Arias, 1986). Posteriormente, las fronteras de expresión de los HOM son restringidas por la acción represora de los factores de segmentación Gap (Harding y Levine, 1988; Ingham, 1988). En las regiones regulatorias de los genes HOM existen sitios sobrelapantes de unión para las proteínas Pair-rule y Gap, que actúan como competidores directos de la activación o represión inicial de los genes HOM (Müller y Bienz, 1992; Shimmell et al, 1994). En este momento las células del blastodermo poseen una identidad que se debe mantener por varias generaciones celulares aún a pesar de la desaparición de los factores de segmentación (Carroll y Scott, 1985). Por esta razón, las células blastodérmicas deben de tener mecanismos de memoria molecular que aseguren la continuidad del destino morfológico de sus descendientes.

3.- Control de la expresión genética y el código de histonas.

Durante el desarrollo, las células de los animales deben mantener y recordar su identidad morfológica. El mecanismo por el cual lo realizan es a través de preservar un patrón particular de expresión de sus genes aún a pesar de transitar continuamente por la división celular (Turner, 2002). Una hipótesis (Orphanides y Reinberg, 2002) sugiere que las etapas que regulan la expresión de los genes están conectadas de manera física y funcional en el orden siguiente: a) el proceso de transcripción b) el procesamiento y los RNAs mensajeros (mRNAs) c) la síntesis y modificación de proteínas y d) el control de la concentración local de proteínas (compartimentalización). Esta serie lineal de eventos requiere que una etapa se concluya para empezar la siguiente y predice que cada etapa es una subdivisión de un proceso continuo.

Esta hipótesis enfatiza las combinatorias secuenciales de eventos en conjunción con múltiples contactos físicos altamente específicos. Los resultados de un gran cúmulo de trabajos sugiere que la expresión individual de los genes en las células se regula en etapas particulares y por lo tanto, hasta este momento, no existen reglas universales aplicables a la expresión de todos los genes (Orphanides y Reinberg, 2002). La etapa inicial que controla la expresión de los genes es la transcripción. En los eucariontes, este proceso es realizado por un complejo multiproteico que incluye a la RNA polimerasa. Esta enzima cataliza la síntesis del mRNA a partir de un templado de DNA, el cual, se encuentra compactado en el núcleo por la acción de un amplio grupo de proteínas que incluye a las histonas. Cuando un par de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 se asocia con un hebra de DNA abarcando 146 pares de bases conforma un nucleosoma. El conjunto de la asociación DNA-proteínas en el núcleo de una célula en interfase se le conoce como cromatina, en la cual, el nucleosoma es la unidad mínima estructural y funcional. Los nucleosomas se asocian en cadenas continuas y se ensamblan en estructuras más complejas (e.g: fibras de cromatina de 10 y 30 nanómetros). Las histonas son proteínas que contienen dos dominios. El dominio central contribuye a la compactación del nucleosoma y contacta directamente al DNA. El dominio saliente está conformado por sus extremos amino-terminales. Estos extremos, al ser modificados covalentemente, regulan las interacciones entre nucleosomas vecinos y modulan el grado de compactación de las fibras de cromatina (Felsenfeld y Groudine, 1998).

En los eucariontes, la activación transcripcional se realiza por medio del reclutamiento selectivo de proteínas. La descompactación de la cromatina es un requisito para que los factores de unión a DNA específicos (activadores) pueden llegar a la cercanía de los genes y sobre todo tengan acceso a sus secuencias blanco en el DNA. Algunos activadores lo hacen por sí solos pero otros necesitan ayuda de otros factores (Orphanides y Reinberg, 2002), y a estos asistentes se les conoce como coactivadores. Estos últimos son reclutados por los activadores y algunos de ellos alteran ó modifican la estructura de la cromatina por medio de interacciones proteína-proteína. Existen coactivadores que acetilan los extremos aminos de las histonas y debilitan los contactos DNA-nucleosoma. El sustrato generado por estas enzimas, favorece el reclutamiento de otros complejos con

actividad de ATPasa que retiran los nucleosomas de las regiones regulatorias de los genes (Narlikar y Kingston, 2002). Este proceso de "remodelación" de la cromatina ayuda a exponer regiones regulatorias de los genes como, por ejemplo, la región de inicio de la transcripción entre otras. Finalmente, otros complejos coactivadores (Mediador, SAGA y ADA entre otros) facilitan la entrada de la maquinaria de transcripción al promotor (Featherstone, 2002). Este esquema no es universal para todos los genes y el programa de activación transcripcional depende del orden en el cual llegan los factores y de su concentración relativa en un gene blanco (Cosma, 2002). Durante el desarrollo, las células diferenciadas tienen que propagarse en condiciones fisiológicas cambiantes y por lo tanto, deben asegurar la expresión de los genes involucrados en generar su identidad. Recientemente, se ha propuesto que el nucleosoma tendría el potencial de funcionar como el banco de memoria de la expresión de una célula. Esta hipótesis (Jenuwein y Allis, 2001) sugiere que existe un código de histonas el cual es descifrado para controlar la expresión de un gene. En esta situación, una modificación covalente en un residuo específico de una histona predispone el establecimiento subsecuente de otras modificaciones en la misma u otras histonas. Al final, existe un patrón de modificaciones que son leídas por medio del reclutamiento de complejos de proteínas que favorecen el funcionamiento de la maquinaria de transcripción (Jenuwein y Allis, 2001). Esta hipótesis se ha evaluado analizando la activación del gene IFN- β (Agalioti et al, 2002). En este caso, una colección de lisinas en las histonas H3 y H4 son acetiladas por el complejo acetilador de histonas Gcn5. Una de estas modificaciones tiene como blanco a la histona H4 y es necesaria para el reclutamiento del complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF. Además, otras modificaciones en la histona H3 son críticas para el reclutamiento del factor basal de transcripción TFIID (Agalioti et al, 2002). Es importante resaltar que en este caso sólo se evaluó una de las muchas modificaciones posibles y hoy en día se sabe que hay otras.

4.- Mantenimiento de la expresión de los genes HOM.

Cuando los factores de segmentación cesan su actividad, los factores pertenecientes a los grupos Polycomb (Pc-G) y trithorax (trx-G) toman la función de mantener los estados

transcripcionales de los genes HOM. Las células con genes HOM silenciados requieren de los factores PcG y las células donde los genes HOM mantienen su expresión requieren de los factores trx-G (Kennison, 1995; Francis y Kingston, 2001 y Simon y Tamkun, 2002). Algunos de los factores PcG y trx-G forman complejos multiméricos de alto peso molecular que contienen actividades bioquímicas que actúan sobre la estructura de los nucleosomas (Simon y Tamkun, 2002). Las proteínas Pc-G y trx-G se unen a sitios específicos en los cromosomas conocidos como PREs y TREs (Polycomb and TriThorax Response Elements). Estos elementos se encuentran en muchos lugares cromosomales y en particular, se han caracterizado en las regiones regulatorias de ANTC y BXC. Los elementos PREs/TREs pueden funcionar de manera heteróloga y reproducen parcialmente la memoria del patrón de expresión de un promotor HOM (Tillib et al, 1999). Se ha propuesto que los factores Pc-G y trx-G actúan a tres niveles: 1) Generando modificaciones covalentes en la cromatina y alterando su estructura, 2) Estimulando o bloqueando la actividad de la maquinaria basal de transcripción y 3) La posible colaboración de RNAs no codificantes en la activación y represión de genes HOM (Orlando, 2003).

5.- Represión de los genes HOM.

5a.- Los complejos Pc-G.

Hasta este momento, se han purificado dos complejos Pc-G a partir de los embriones de *D. melanogaster* (Figura 2). Se necesita la dosis silvestre de las proteínas de ambos complejos para mantener el estado reprimido de la expresión de los genes HOM. El complejo E(Z)/ESC (600-650 kDa) contiene las proteínas Enhancer de Zeste (E(Z)), Extra sex combs (Esc), la desacetilasa de histonas Rpd3, el Supresor of Zeste 12 (Su(Z)12), Nurf-55. (Czermin et al, 2002 y Müller et al, 2002) y Pleihomeotic (Pho) (Poux et al, 2001b). El complejo PRC1 (1-3 MDa) contiene las proteínas Polycomb (Pc), Polyhomeotic (Ph), Posterior sex combs (Psc), dRING, Sex combs on midleg (Scm) (Shao et al, 1999 y Levine et al, 2002 y) y el factor GAGA entre otras (Horard et al, 2000).

La proteína Esc es esencial en el desarrollo temprano. Su asociación en el complejo E(Z)/ESC sugiere que podría ayudar a la transición entre el inicio y el mantenimiento del silenciamiento mediado por el complejo PRC1 (Strul y Bower, 1982 y Müller, 1995). La proteína E(Z) tiene un motivo conocido como SET que cataliza la metilación de las lisinas 9 y 27 de la histona H3 (Czermin et al, 2002 y Müller et al, 2002). La metilación en la lisina 27 colocaliza con un sitio PRE en *Ubx* y esta señal facilita la unión del cromodominio de Pc que es una proteína del complejo PRC1. Es por esto que se cree que la función del complejo E(Z)/ESC es dejar marcas epigenéticas en la cromatina que favorezcan el reclutamiento posterior del complejo (Czermin et al, 2002 y Müller et al, 2002). El cromodominio es un motivo que se encuentra presente en otras proteínas represoras como HP1. A través del cromodominio la proteína HP1 es reclutada a la cromatina en zonas donde las histona H3 se encuentra metilada en la lisina 9 (Nakayama et al, 2001). Este evento es necesario para el reclutamiento de un sistema de silenciamiento multiproteico. De esta manera, existen modificaciones postraduccionales en la histona H3 que reclutan selectivamente complejos de silenciamiento.

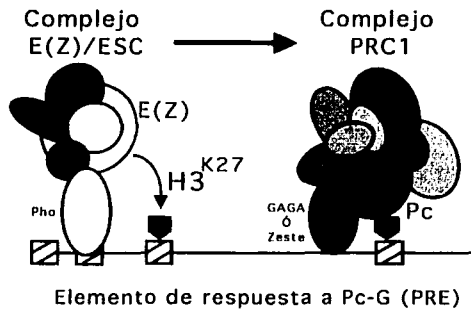


Figura 2. Los complejos Pc-G actúan sobre los elementos regulatorios PRE. El complejo E(Z)/ESC tiene actividad de metilación de histonas y el cromodominio de PC podría estar involucrado en el reclutamiento del complejo PRC1. Los factores Pho, Zeste y GAGA unen DNA y podrían funcionar como reclutadores de ambos complejos.

Este modelo de reclutamiento por histonas metiladas es complejo. Pero otras evidencias sugieren que el silenciamiento por Pc-G es un proceso todavía más elaborado y muchos

de sus componentes aún no han sido identificados. Por ejemplo, si la proteína Pc se une artificialmente a un PRE antes del blastodermo celular, no se bloquea el inicio de la transcripción de *Ubx*. El sistema de silenciamiento dependiente de PC sólo se puede establecer en *Ubx* si las células embrionarias adquirieron previamente la identidad de blastodermo celular (Poux et al, 2001a). En embriones en la etapa de preblastodermo (0-2 hrs), se ha podido detectar una interacción transitoria entre las proteínas Pc y Esc (Poux et al, 2001a). Estas proteínas están asociadas en un supracomplejo que contiene algunas subunidades de PRC1 y de E(Z)/ESC pero que carece de Psc. En embriones postblastodermo, las proteínas Pc y Esc se detectan en complejos separados. En el caso de PRC1 ahora sí se detecta la proteína Psc. Por lo tanto, en un inicio, el complejo E(Z)/ESC estaría interactuando con un complejo PRC1 reclutado independientemente. Esta interacción promovería la transición hacia el establecimiento de un complejo PRC1 "maduro" que incluiría Psc. Se ha propuesto que Psc es el represor transcripcional del complejo PRC1 (Beuchle et al, 2001 y Francis et al, 2001).

5b.- El modelo del trans-silenciamiento para el gene *Scr*.

El gene *Scr* se necesita para asignar la identidad de la cabeza y del primer segmento del tórax. Cada uno de los tres segmentos torácicos en la larva contiene un par de grupos de células conocidos como discos imagales. En la metamorfosis, estos discos se diferencian en las patas del adulto. En las patas del primer segmento de los machos silvestres existe una estructura conocida como "peine sexual". Cada uno de los 10-12 dientes de este peine se origina a partir de una célula individual. Las proteínas *Scr* se expresan en dosis silvestres únicamente en las células del primer disco imagal. Las mutantes nulas para el gene *Scr* provocan una reducción en el número de dientes en este disco. En las células del segundo y tercer discos imagales no se detecta la expresión de las proteínas *Scr* y por lo tanto tampoco existen peines sexuales (Kennison et al, 1998). La expresión ectópica de las proteínas *Scr* en los discos del segundo y tercer segmentos torácicos provoca la diferenciación y aparición de peines sexuales. Este fenotipo ha sido usado para la identificación de los factores Pc-G y trx-G (Kennison y Tamkun, 1988).

En el caso de *Scr* y posiblemente de *Ubx*, se ha propuesto que existe un sistema de silenciamiento dependiente de apareamiento cromosomal (Southworth y Kennison, 2002). Este modelo predice la existencia de dos elementos regulatorios, denominados MES (Maintenance Elements for Silencing) en el locus de *Scr* (Figura 3). Los elementos MES interactuarían en cis para inactivar el promotor de *Scr* en las células del segundo y tercer discos imagales (Figura 4). La ausencia de interacción entre los MES en el primer disco imagal propiciaría la transcripción de *Scr* (Figura 4).

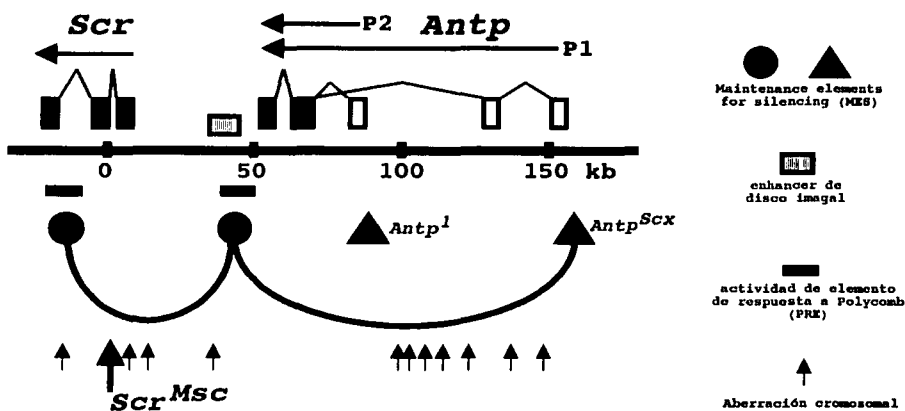


Figura 3. Región genómica que incluye los genes *Scr* y *Antp*. Los elementos MES aíslan la expresión de los genes contenidos entre ellos. Los triángulos representan inserciones y las flechas los puntos de rompimiento de inversiones o translocaciones cromosomales. (Tomado de Southworth y Kennison, 2002).

Las inversiones o translocaciones cromosomales *Scr^{Msc}*, *Scr^{Rp11}* y *Scr^W* provocan la expresión ectópica de *Scr* en el segundo y tercer disco imagales y la aparición de peines sexuales (Figura 2). Estas mutantes tienen puntos de rompimiento en el DNA estructural de los MES (Figura 3). Los cromosomas que albergan estas inversiones no pierden sus elementos MES y cuando se aparean con su cromosoma homólogo podrían competir con los MES de éste. Lo anterior provocaría la desestabilización del sistema de

silenciamiento de *Scr* (Figura 4) y por ende, la desrepresión de *Scr* en los segundo y tercer discos imagales (Southworth y Kennison, 2002).

Por otra parte, existe una inserción de DNA repetitivo en *Antp* (*Antp^{Scx}*) que también desreprime *Scr* en los discos imagales 2 y 3 y se cree que esta inserción contiene un elemento parecido a un MES (Figura 3 y 5). Cuando el cromosoma *Antp^{Scx}* se aparea con su homólogo (Figura 5), la inserción *Scx* podría competir y desestabilizar, tanto en cis ó trans, el silenciamiento del locus *Scr* (Southworth y Kennison, 2002).

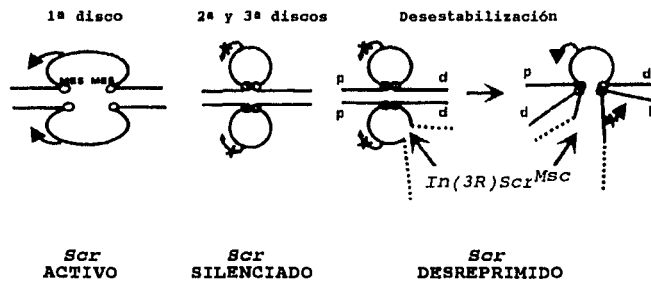


Figura 4. Modelo de la desrepresión de *Scr* por la inversión cromosomal *Scr^{MSC}*. (Tomado de Southworth y Kennison, 2002).

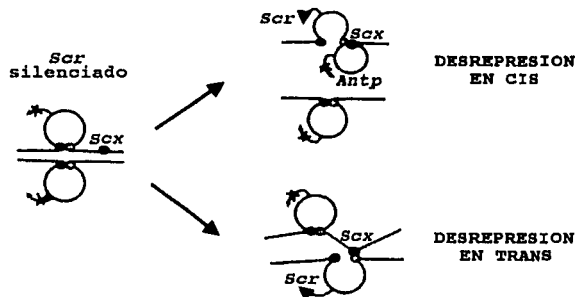


Figura 5. Modelo de la desrepresión de *Scr*, tanto en cis ó trans, por la adición de un elemento tipo MES en *Antp* (*Antp^{Scx}*). Además, la desrepresión en cis de *Scr* provocaría la inactivación del promotor 2 de *Antp*. (Tomado de Southworth y Kennison, 2002).

6.- Activación de los genes HOM: Complejos trx-G.

En *D. melanogaster* se han purificado cuatro complejos multiméricos que contienen subunidades codificadas por genes del *trx-G* (Figura 6). Algunas de ellas están asociadas en el complejo BRAHMA (BRM) de 2 MDa y corresponden a los factores Brahma (Brm), Osa (Osa), Moira (Mor) y Snr1 (Snr1) (Collins et al, 1999; Kal et al, 2000 y Papoulas et al, 1998). La proteína BRM es una ATPasa con actividad de remodelación de la cromatina que facilita el reclutamiento de activadores transcripcionales a promotores específicos. El complejo BRM actúa como un corregulador de la actividad de la RNA polimerasa II (RNAPolII) (Armstrong et al, 2002). Existen varios complejos relacionados a BRM en otros organismos y su composición es heterogénea. En levadura existen los complejos SWI/SNF, RSC y en humanos se han purificado al menos cuatro: i.e BAF, PBAF, hBRM, BRG1-I y BRG1-II. Éstos contienen homólogos de algunas subunidades del complejo BRM: Brm (Swi/Snf2, Sth1, hBrm y Brg1), Osa (Swi1 y BAF250), Mor (Swi3, Rsc8, BAF170 y BAF155), Snr1 (Snf5, Sth1 y Ini1), BAP 111 (BAF57 solamente en humano), BAP55 (Arp7 y beta-actina) y BAP47 (Arp9 y BAF53) (Klochender-Yeivin et al, 2002).

Los complejos BRM en levadura, *D. melanogaster* y mamíferos regulan, positiva y negativamente, la expresión de genes involucrados en varios procesos, como por ejemplo: el crecimiento celular, el control del ciclo celular, la reparación del DNA, la diferenciación y la respuesta hormonal (Lohuizen, 1999). Por lo tanto, se presume que la función del complejo BRM como facilitador general de la transcripción por la RNAPolII es una función conservada en muchos organismos (Armstrong et al, 2002). Por ejemplo, en levadura el complejo RSC es esencial y se requiere para la expresión de por lo menos 700 genes (Damelin et al, 2002); además, en ciertos estudios se ha observado que RSC se une físicamente con la proteína TATA (TATA-binding protein), la cual reconoce algunos de los promotores dependientes de la RNAPolII (Sanders et al, 2002). No obstante, en otros casos no se ha detectado una interacción física con la RNAPolII (Armstrong et al, 2002).

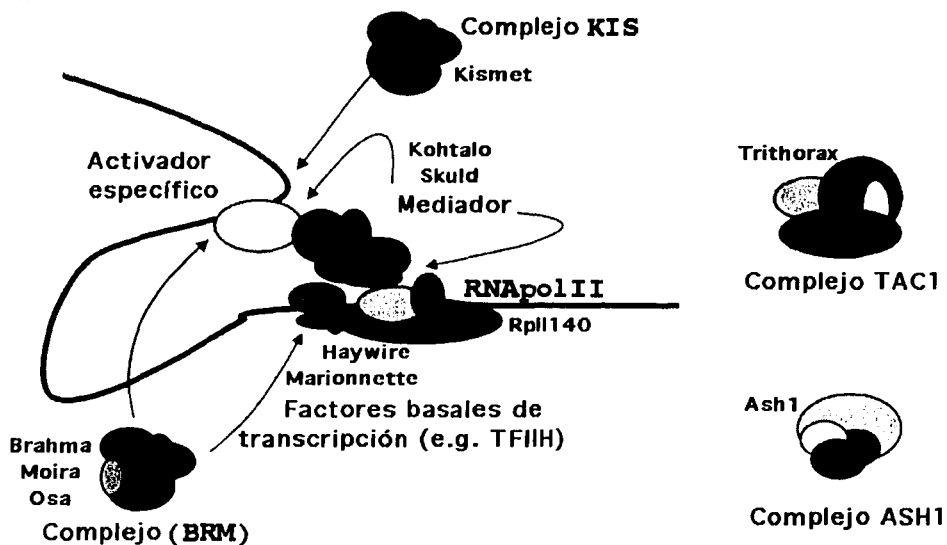


Figura 6. Los complejos que contienen subunidades *trx-G* como BRM, TAC1, ASH1, KIS y Mediador funcionan como coactivadores de la RNApolIII. Se muestran las proteínas Rpl140, Haywire y Marionette como subunidades de los complejos basales de transcripción RNApolIII y TFIIF.

Las proteínas *trx-G* Absent, small, and homeotic disc 1 y 2 (Ash1 y Ash2) están presentes en dos complejos separados de 2 y 0.5 MDa respectivamente (ASH1 y ASH2) (Papoulas et al, 1998). El factor Trx está asociado junto con la proteína Sbf1 y la acetilasa de histonas dCBP en el complejo TAC1 (Petruk et al, 2001). Las evidencias recientes sugieren que los distintos complejos *trx-G* cooperan en la alteración de la estructura de la cromatina. El complejo TAC1 tiene actividad de acetilación sobre la histona H4 (Tabla 1) (Petruk et al, 2001) y el estado hiperacetilado de los elementos PREs/TREs es necesario para heredar el estado activo de un gene reportero (Cavalli y Paro, 1999), por lo que esta modificación podría participar en el mantenimiento de la memoria de la expresión de genes homeóticos. La proteína Trx, que tiene un dominio SET (Tabla 1), metila la lisina 4 de la histona H3 (Czernin et al, 2002) y este dominio es esencial para mantener la identidad homéotica (Katsani et al, 2001). El complejo ASH1 de *D. melanogaster* metila

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

las lisinas 4 y 9 de la histona H3, así como la lisina 20 de la histona H4 (Tabla 1). La combinación de las tres modificaciones facilita el reclutamiento del complejo BRM a un promotor (Beisel et al, 2002).

Factores trxG	Dominios	Actividades bioquímicas
Brm	ATPasa, Bromodominio	Remodelación de nucleosomas
Osa	ARID	Une DNA inespecíficamente
Tou ^{&}	PHD, Bromodominio	
Lid [*]	ARID, RING/PHD, PHD	
Trx	PHD, SET	Acetilación de histonas (SET)
Ash1	PHD, SET	Acetilación de histonas (SET)
Ash2	PHD	
BAP111	HMG	
Kis	Cromodominio, ATPasa	

Tabla 1. Algunas proteínas del trx-G contienen dominios proteicos que actúan o actuarían sobre la cromatina. La ATPasa de Brm es responsable de la actividad de remodelación de los nucleosomas. El dominio ARID une DNA al igual que muchos factores que tienen un dominio HMG. Los dominios RING y PHD podrían favorecer la actividad de ligasas de ubiquitina sobre blancos específicos ó mediar contactos entre proteínas. El bromodominio podría reconocer sustratos acetilados y el dominio SET tiene actividad de metilación de histonas. Además, se sabe que los cromodominios se unen a cromatina metilada. * Producto codificado por el gene *little imaginal discs (lid)*; [&] Producto codificado por el gene *toutatis (tou)*.

7.- Antagonismo entre los factores Pc-G y trx-G.

Se ha propuesto que los elementos PREs de los genes HOM silenciados, albergan marcas moleculares heredables que los señala para la represión transcripcional. Existen datos que sugieren que las proteínas Pc y Scm mantienen y propagan estas marcas y que las proteínas Psc y Ph reprimen directamente la transcripción de estos genes HOM marcados (Beuchle et al, 2001). Como se mencionó con anterioridad, todas estas proteínas están

contenidas en el complejo PRC1 y se sabe que, *in vitro*, el complejo PRC1 bloquea la actividad de los complejos remodeladores tipo BRM (Shao et al, 1999). La inhibición de la actividad remodeladora de Brm humano requiere que el complejo PRC1 contacte previamente la cromatina; ésta, sin embargo, continua aún siendo accesible a otros factores (Francis et al, 2001 y King et al, 2002). La proteína individual Psc puede reproducir todas estas actividades de PRC1, aunque no puede ser reclutada a un sitio PRE (Francis et al, 2001), mientras que Pc si puede ser reclutado. Lo anterior sugiere que Psc antagoniza la transcripción *per se* y Pc reconoce y mantiene una marca de memoria que posiblemente sea la metilación de histonas (Czermin et al, 2002). Este escenario propone que el complejo PRC1, al menos a través de Psc, es un antagonista directo de la función de remodelación de la cromatina y de la transcripción. Además, se ha detectado que el complejo PRC1 coexiste con los componentes del complejo de inicio (Saurin et al, 2001a y Saurin et al, 2001b) y elongación (Orlando y Jones, 2002) de la maquinaria de transcripción. Por lo tanto, se presume que el complejo PRC1, reclutado en un PRE, podría inhibir la reacción de transcripción en varias etapas.

La ausencia de Pc en *D. melanogaster* desreprime la expresión de genes HOM y este evento es suprimido por la reducción en la dosis de muchos de los factores trx-G como Brm y Trx (Kennison y Tamkun, 1988). Es decir, la carencia de Pc en sus blancos permite que Brm y Trx actúen. Sin embargo, en algunos casos lo contrario no sucede de manera similar. Por ejemplo, los defectos morfológicos provocados por la ausencia de Brm no son suprimidos por la reducción en la cantidad de Pc (Brizuela et al, 1994) pero los defectos homeóticos provocados por la eliminación de Trx si son suprimidos por mutantes en Pc (Capdevilla et al, 1986). Cuando Brm ó Trx se expresan en tres dosis versus una dosis de Pc, solamente Trx aumenta la desrepresión de genes homeóticos pero no Brm (Kennison y Russell, 1987).

Brizuela planteó la hipótesis que Trx competiría directamente con Pc para determinar el estado activo de un gene HOM; Brm unicamente estaría involucrada en la transcripción de los genes activos y sería incapaz de remover a Pc del gene reprimido (Brizuela et al, 1994). Evidencias recientes sugieren que Trx es un coactivador que induce cambios en la

cromatina que tienen dos efectos: aumentar la transcripción e impedir el re-establecimiento del silenciamiento por Pc (Poux et al, 2002). Como se ve en la Tabla 1, existen múltiples actividades bioquímicas que los factores trx-G pueden o podrían realizar en la cromatina. Por lo tanto, se espera que los factores trxG actúen en distintas etapas de la expresión de los genes HOM: organización de la estructura de la cromatina, estimulación de la actividad de la RNAPolIII, la modificación covalente de histonas, etc.

8.- La maquinaria de transcripción basal.

Por medio de experimentos de reconstitución *in vitro* en promotores tipo TATA, se ha definido que la maquinaria de transcripción basal consiste de un complejo de proteínas que incluye la RNAPolIII y los factores basales TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF y TFIIH. A partir de estos experimentos, se propuso un orden de reclutamiento en un complejo de pre-iniciación: el factor TBP, subunidad del complejo TFIID, se une al promotor TATA seguido del reclutamiento de TFIIB. Posteriormente, se une la RNAPolIII no fosforilada asociada a los factores TFIIF, TFIIE y TFIIH. Después de la apertura del promotor, el dominio CTD de la RNAPol II se fosforila. Lo anterior promueve el escape a partir del DNA del promotor y la progresión a la fase de elongación. Al llegar a la terminación, una fosfatasa defosforila la RNAPolIII y la deja disponible para iniciar otro evento de transcripción (Woychik y Hampsey, 2002).

En el caso de *D. melanogaster*, se han caracterizado a cuatro tipos de elementos promotores: 29% están relacionados a TATA, 26% son DPE (Downstream Promoter Element), 14% son TATA-DPE y el 31% no tienen ninguno de estos elementos (Kutach y Kadonaga, 2000). TBP no se une al elemento DPE y parece que otras subunidades de TFIID (TAF₁₁₆₀ y TAF₁₁₄₀) lo podrían hacer. Existen factores específicos (NC2) que actúan positivamente en los promotores DPE y reprimen los TATA. Además, se sabe que un elemento regulatorio (enhancer) específico para un promotor DPE no puede activar a un promotor TATA. Los promotores de los genes homeóticos *Antp*, *Scr* y *Ubx* son del tipo DPE (Kutach y Kadonaga, 2000) y las regiones cis-regulatorias de estos genes determinan su patrón de expresión. Todo lo anterior indica que existen factores que discriminan el tipo de promotor usado y podrían contactar diferencialmente a los

componentes usados por la "maquinaria de transcripción basal". El panorama que se espera es la identificación de elementos regulatorios (enhancers, silenciadores, etc) específicos para cada tipo de promotor (Butler y Kadonaga, 2002).

9.- El complejo TFIIH.

El factor TFIIH (Figura 7) es un complejo multiprotéico que participa en procesos celulares como la transcripción mediada por la RNAPol II, la reparación del DNA y el control del ciclo celular. El complejo TFIIH está compuesto por nueve subunidades (Figura 7). Las subunidades centrales están compuestas por las proteínas XPB, XPD, p38, p44, p52 y p62. Las tres restantes que son Mat1, la ciclina H1 y Cdk7 se asocian en un segundo subcomplejo denominado CAK (Cdk-Activating Kinase) (Tirode et al, 1999). La actividad de helicasa 3'-5' de XPB [codificado por el gene *haywire (hay)* en *Drosophila*] promueve la apertura del DNA del promotor y la formación del primer enlace fosfodiéster (Sung et al, 1996). En este momento, la RNAPol II no puede iniciar la elongación porque no está fosforilada y provoca abortos en la síntesis del mRNA (reiniciación). En el comienzo de la fase de elongación, la cinasa Cdk7 es la responsable de la fosforilación del CTD de la RNAPol II (Dahmus, 1995). La actividad de la helicasa de XPB/Hay promueve la separación final de la RNAPol II para consolidar adecuadamente la fase de elongación (Moreland et al., 1999).

El análisis de la secuencia del genoma de *D. melanogaster* predijo que el locus *tfb* es el homólogo a la proteína p52 del complejo TFIIH en humano. El locus *marionette (mrn)* tiene una posición citogenética (71C3-E1) muy cercana a la de *tfb* (71E1). Las mutaciones que inactivan la unidad transcripcional del gene *tfb* no complementan a los alelos del gene *mrn*. Como todas estas mutaciones forman parte del mismo grupo de complementación, se pudo inferir que afectan la función del mismo gene. Por lo tanto, el locus *mrn* codifica para la proteína p52 del complejo TFIIH en *D. melanogaster* [Hiromi, 2003 (comunicación personal) y Fregoso, 2003 (Proyecto de Doctorado)]. Mrn en humano se requiere para anclar a la helicasa XPB/Hay y su región C-terminal es necesaria para que el complejo TFIIH funcione adecuadamente en la transcripción y reparación por escisión de nucleótidos (Jawhari et al, 2002).

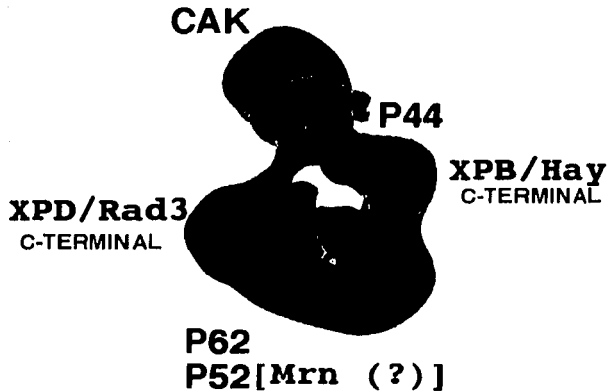


Figura 7. Reconstrucción del complejo TFIIF de humano por microscopía electrónica de alta resolución. Las letras indican la posición relativa de los diferentes componentes del complejo.

10.- La RNA polimerasa II.

La RNApolIII es una holoenzima compuesta por 10-12 subunidades y es suficiente para la síntesis de RNA *in vitro* a partir de un templado de DNA. Esta holoenzima no puede reconocer por sí misma a un promotor y requiere de la asistencia de los otros factores basales ó específicos. Las dos subunidades grandes (RpII215 y RpII140) de la holoenzima se asocian para exponer el sitio catalítico y participan en la selección del sitio de inicio de la transcripción. En el sitio activo convergen los ribonucleótidos y los factores que manejan el mRNA naciente. Las subunidades restantes (Figura 8) tienen funciones específicas como ayudar en la selección del sitio de inicio, regular la tasa de elongación y promover las interacciones con los activadores transcripcionales. Además, RpII215 contiene el dominio CTD y puede unir DNA mientras que la proteína RpII140 contiene el sitio activo y regula la tasa de elongación (Lee y Young, 2000).

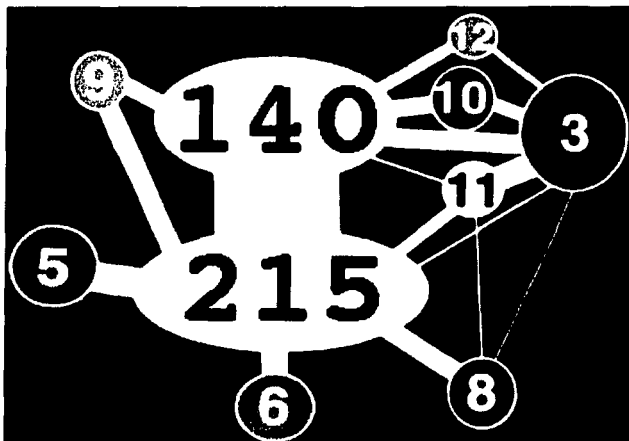


Figura 8. Representación de la estructura de la RNApolII de levadura en donde se muestra el patrón de interacciones entre sus componentes. Los numeros 140 y 215 corresponden a las subunidades más grandes RplI215 y RplI140.

11.- El complejo Mediador.

El complejo Mediador en *D. melanogaster* (dMed) representa un complejo coactivador de alrededor de 25 proteínas. Este complejo, transmite las señales de activación de los enhancers a la maquinaria de transcripción basal ubicada en un promotor (RNApol II). El complejo dMed actúa exclusivamente con factores de transcripción específicos. Por ejemplo, en ensayos *in vitro*, el complejo dMed se requiere para la activación transcripcional de diferentes promotores (e.g. el promotor 2 de *Antp*) (Park et al, 2001). Algunas subunidades del complejo dMed están codificadas por algunos genes del *trx-G*. Los genes *skuld* (*skd*) y *kohtalo* (*kto*) codifican para las subunidades TRAP240 y TRAP230 respectivamente (Figura 6). Estas subunidades comunican las señales de activadores conocidos (e.g. la proteína homeótica Scr) ó desconocidos que determinan la identidad de algunas células en los discos imagales. Originalmente las mutaciones *skd* y *kto* fueron aisladas como supresoras de mutaciones en *Pc*, lo que refleja un papel general en la transcripción. Por otra parte, las células que carecen de *skd* y *kto* no están afectadas en su viabilidad ó proliferación, aunque la ausencia de una subunidad central del complejo dMed (e.g. TRAP80) si lo hace (Boube et al, 2000; Treisman, 2001).

Lo anterior indica que no todos los componentes de este complejo son necesarios para las actividades generales. La presencia ó ausencia de subunidades específicas (e.g. Skd ó Kto) en complejos relacionados al dMed podrían reflejar las actividades específicas de este complejo (Treisman, 2001).

12.- Sumoilación.

Sumo es una proteína relacionada a ubiquitina que regula varios procesos celulares como son el transporte nuclear, la señalización y la progresión del ciclo celular (Müller et al, 2001). En cambio la ubiquitina dirige la degradación de sus sustratos, a través del proteasoma 26S, cuando se agrega como polímero. Cuando la ubiquitina se agrega como monómero controla muchos procesos y entre ellos el funcionamiento de las histonas (Hicke, 2001 y Weissman, 2001). Las proteínas sumo y ubiquitina se unen a sus sustratos por medio de un sistema de conjugación que requiere de la actividad de tres enzimas (Figura 9). En el caso de sumo, la enzima E1 activadora consiste del heterodímero Aos1/Uba2 y es el encargado de la formación del complejo E1-sumo, a través de un enlace tioéster. La enzima E2 conjugante transfiere la proteína sumo a la lisina del sustrato. Las enzimas E3 ligasas son requeridas para facilitar la modificación covalente y la selección del sustrato (Melchior, 2000).

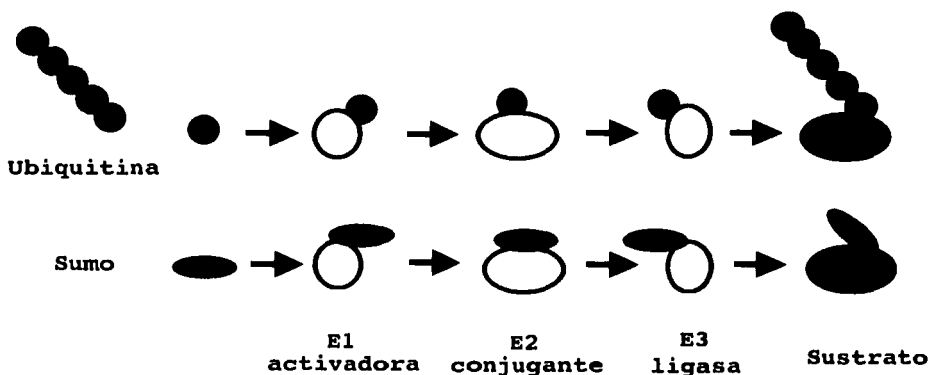


Figura 9. Sistema de conjugación de los modificadores ubiquitina y sumo.

En los animales existen dos tipos de E3 ligasas de sumo descritas hasta la fecha. El primer tipo está ejemplificado por la proteína asociada al poro nuclear RanBP2 (Kirsh et al, 2002). El segundo tipo incluye a las proteínas de la familia PIAS (*protein inhibitor of activated STAT*) que tienen un dominio de unión a zinc conocido como SP-RING (Hochstrasser, 2001). Las proteínas PIAS son correguladores de la transcripción mediada por receptores de hormonas (Kotaja et al, 2000). El dominio SP-RING modula la función de factores de transcripción a través de su actividad de E3 ligasa de sumo (Kotaja et al, 2002). La caracterización de la proteína del *trx-G* Tonalli nos permitió sugerir la existencia de un nuevo subgrupo de E3 ligasas (ver artículo y discusión anexa). Estos factores recién identificados tienen el dominio XSPRING (*eXtended SP-RING finger*) el cual correspondería a su dominio catalítico (Gutiérrez et al, 2003).

13.- Sumoilacion de factores asociados a la cromatina.

Existen varios blancos de sumoilación que intervienen en la estructura de la cromatina. Uno de esos blancos es la familia de proteínas SP100 (Sternsdorf et al, 1997), que junto con otros componentes se asocia en los cuerpos nucleares conocidos como PML (Seeler et al, 1998). Los cuerpos PML (*ProMyelocytic Leukaemia*) son estructuras subnucleares que están asociados a la matriz nuclear y que contactan transitoriamente con muchas proteínas sumoiladas, incluyendo algunos represores transcripcionales como Daxx y p53. Aunque la función de los cuerpos PML es enigmática, se sugiere que están implicados en la regulación transcripcional, control de la muerte celular programada y la presentación de antígenos (Müller et al, 2001). En mamíferos, el gene SP100 genera cuatro isoformas por *splicing* alternativo: SP100A, SP100-HMG, SP100C y SP100B. Todas se unen a la proteína heterocromática HP1 y las tres primeras se pueden sumoilar. La sumoilación de SP100A estabiliza la interacción con HP1 (Seeler et al, 2001). Las variantes SP100A y SP100C junto con HP1, actúan como represores transcripcionales (Seeler et al, 1998). La variante SP100C tiene un dominio PHD-Bromodominio (Seeler et al, 2001) que es característico de factores que probablemente regulen la estructura de la cromatina como el factor *trxG* Tou (Tabla1) (Fauvarque et al, 2001). Tou pertenece a la familia de

proteínas WAL que incluye a la proteína Acf1. Esta proteína, en *D. melanogaster*, es subunidad del complejo movilizador de la cromatina ACF/CHRAC (Ito et al, 1999).

Otro blanco de sumoilación son las desacetilasas de histonas denominadas HDACs. Estas enzimas desacetilan residuos de lisina específicos en el extremo amino de la histonas. Esta modificación postraducciona confiere una conformación cerrada a la cromatina lo cual impide la entrada a la maquinaria de transcripción al DNA. Las modificaciones postraduccionales por sumo en estas enzimas modifican su actividad. Por ejemplo, las proteínas HDAC1 y 4 sumoiladas aumentan su capacidad catalítica y represora (David et al., 2002 y Kirsh et al, 2002). La modificación de HDAC4 la realiza RanBP2 que como ya se mencionó antes, es una E3 ligasa de sumo. Esta proteína se asocia con el poro nuclear y por lo tanto la sumoilación ocurriría en este lugar. En este caso, sumo podría funcionar como una señal de retención nuclear para inhibir o retardar la re-exportación de la proteína HDAC4 (Kirsh et al, 2002). La desacetilasa de histonas HDAC3 interactúa físicamente con las proteínas SIZ2 (E3 ligasa tipo PIAS), MusTRD1/BEN y TFII-I. En el núcleo, el factor TFII-I se requiere para la activación transcripcional de promotores específicos. TFII-I es un factor que se activa y fosforila en respuesta a señales extracelulares y se transloca del citoplasma al núcleo. La proteína MusTRD1/BEN es un represor específico de TFII-I, se piensa que la proteína MusTRD1/BEN excluye a TFII-I del núcleo y puede ser que MusTRD1/BEN compita en el citoplasma con un factor requerido para la translocación nuclear de TFII-I. Alternativamente, MusTRD1/BEN podría interferir con un regulador de TFII-I en el núcleo. SIZ2 estimula la activación transcripcional dependiente de TFII-I, mientras que la enzima HDAC3 la reprime cuando hay dosis bajas de SIZ2 ó TFII-I. A un aumento en la dosis de los factores SIZ2 ó TFII-I se contrarresta el efecto negativo de HDAC3. Lo anterior sugiere que SIZ2 tiene un papel regulatorio de la actividad de la enzima HDAC3. A partir de estos trabajos se puede

inferir que existe un antagonismo entre distintas modificaciones postraduccionales (e.g. sumoilación y desacetilación) en el proceso de activación transcripcional (Tussié-Luna et al, 2002a y Tussié-Luna et al, 2002b).

JUSTIFICACION

La caracterización genética de los factores que regulan la determinación de los segmentos de *D. melanogaster* ha producido una amplia variedad de mutaciones en proteínas Pc-G y trx-G, así como también, de generar ideas nuevas sobre la importancia de la regulación transcripcional en este proceso (Kennison, 2003). Los factores Pc-G y trx-G se asocian en distintos complejos multiméricos que regulan la transcripción de los genes ANTC y BXC en diferentes etapas. Los últimos hallazgos en este campo resaltan la importancia que tienen los complejos Pc-G y trx-G en el establecimiento de las modificaciones covalentes en las histonas, la remodelación de la cromatina y las interacciones con los factores basales de transcripción (Simon y Tamkun, 2002). En este momento, se está intentando resolver los siguientes tópicos: 1) La interdependencia funcional entre estos complejos, 2) El significado de las variaciones temporales y espaciales en su composición, (Simon y Tamkun, 2002), 3) Identificar cómo y cuáles factores basales de transcripción son reclutados en un promotor homeótico activo o inactivo (Kennison, et al, 1998) y 4) La regulación de la actividad enzimática de estos complejos, entre otros.

Con el propósito de identificar a factores requeridos para el mantenimiento de la transcripción de los genes HOM, se propone la identificación y caracterización de genes que interactúen genéticamente con *brm* en la regulación del promotor 2 de *Antp*. Además, identificar mutaciones en los genes que codifican para las subunidades de la RNAPolIII y TFIIF que modifiquen los fenotipos provocados por la pérdida y ganancia en la función de los genes ANTC y BXC.

OBJETIVOS

El trabajo de esta tesis se dividió en dos partes.

1.- Caracterización genética y molecular del gene *tonalli* (*tna*).

Hipótesis:

Si las mutantes de los genes *tna* y *tara* interactúan genéticamente con las mutaciones en el gene *brm* y la proteína Brm es parte de un complejo proteico que promueve la expresión de genes HOM y tiene actividad de remodelación de la cromatina. Entonces, los factores codificados por los loci *tna* y *tara* podrían actuar en algún paso específico de la función de *brm*, como por ejemplo: a) En la expresión del gene *brm*, b) Como una subunidad del complejo BRM, c) Uniendo o modificando a los componentes del complejo BRM, d) Regulando su actividad enzimática d) Como parte de la cascada regulatoria de los genes activados por BRM.

Para evaluar esta propuesta se planteó lo siguiente:

- 1.- Conocer la identidad molecular del gene *tna*, mediante el aislamiento de su región genómica; clonación y secuenciación de su(s) transcrito(s) y la comparación de la secuencia de aminoácidos de su proteína con los factores celulares semejantes de otras especies. Lo anterior no permitirá proponer una función al producto Tna.
- 2.- Análisis de la función materna y cigótica de *tna* en el desarrollo de *D. melanogaster*, mediante la eliminación de su actividad antes y después de la fertilización.
- 3.- Estudiar el papel de *tna*, *tara* y otros genes *trx-G* en la expresión del promotor 2 de *Antp*.

2.- Estudiar el papel de las subunidades individuales de TFIIH y la RNAPolIII en la expresión de genes HOM.

Hipótesis:

Si la expresión de los genes en *Drosophila*, como los homeóticos (ANTC y BXC), es regulada durante el desarrollo (Kennison et al, 1998) y las mutaciones en los factores basales de transcripción producen fenotipos específicos. Entonces, se podría esperar que los factores basales de transcripción, como TFIIH y RNAPolIII, contribuyan de manera diferencial en los distintos niveles que controlan la función de los genes HOM. Como consecuencia, las mutaciones en TFIIH y RNAPolIII podrían afectar: a) El inicio y mantenimiento de la expresión de los genes ANTC y BXC, b) El silenciamiento y reactivación de los genes ANTP y BXC, c) La expresión de los genes regulados por las proteínas homeóticas, entre otras

Para evaluar estas posibilidades, se planteó lo siguiente:

- 1.- Evaluar si mutaciones en los genes *hay*, *mrn* y *RpIII40* (TFIIH y RNAPolIII) modifican los fenotipos provocados por la pérdida y ganancia en la función de los genes ANTC y BXC.
- 2.- Identificar los cambios puntuales en estas proteínas. Se cree que existen sitios de contacto en estos factores que serían importantes para la regulación de la expresión de los genes HOM.
- 3.- Analizar si las mutaciones en *hay*, *mrn* y *RpIII40*, interactúan genéticamente con mutaciones en los genes Pc-G y trx-G.

RESULTADOS

1.- Caracterización genética y molecular del gene *tna*.

El gene *tna* se requiere para la expresión correcta de los genes *Antp*, *Scr* y *Ubx*. *tna* codifica para al menos dos proteínas (TnaA y TnaB). La isoforma TnaA contiene un motivo conocido como SP-RING. Este motivo está conservado en otras especies y está involucrado en la sumoilación de sustratos específicos. El análisis genético y molecular de este factor se describe en el artículo de la siguiente sección (Gutiérrez et al, 2003).

2.- Los genes *tna* y *tara* son miembros del grupo de genes *trx-G*.

Mutaciones en los genes *tna* y *tara* interactúan genéticamente con *brm* y *osa* (Calgaro et al 2002 y Gutiérrez et al, 2003). Se les considera genes *trx-G* porque las mutaciones recesivas en estos genes producen individuos con fenotipos de pérdida en la función de genes HOM (Calgaro et al 2002 y Gutiérrez et al, 2003;). El homólogo de Tara en ratón puede unir otras proteínas que albergan motivos tipo PHD-Bromodominio y RING (Hsu et al, 2001). En este trabajo sugerimos que Tara podría interactuar físicamente con la proteína Brm (Gutiérrez et al, 2003).

3.- Los genes *tna* y *tara* interactúan genéticamente con el gene *Antp*.

Existen dos promotores alternativos que dirigen la transcripción de *Antp* y le permiten múltiples maneras de regulación durante el desarrollo. Cada promotor responde a distintas regiones cis-regulatorias que dirigen la expresión localizada de *Antp* (Laughon et al, 1986). La reducción de la expresión del promotor 2 de *Antp* en el disco imagal del ala provoca que las moscas extiendan las alas (Vázquez et al, 1999). Las mutaciones en los genes *tna*, *tara*, *brm* y *osa* aumentan este fenotipo (Vázquez et al, 1999; Calgaro et al, 2002 y Gutiérrez et al, 2003). Las mutaciones *Antp^{Ns}* y *Antp^{73b}* provocan la desrepresión de *Antp* en el disco ojo-antena y su transformación hacia pata a una frecuencia de 90-100 % en individuos que contienen estas mutaciones. La desrepresión de *Antp* en la mutante *Antp^{Ns}* proviene de su propio promotor (*P2*) y en el caso de *Antp^{73b}* de un promotor no homeótico (Frischer et al, 1986; Talbert y Garber, 1994). Estos fondos genéticos han sido

utilizados para evaluar la especificidad a los factores Brm, Osa, Mor y Tna sobre un promotor homeótico (Tamkun et al, 1992; Brizuela y Kennison, 1997; Vázquez et al, 1999 y Gutiérrez et al, 2003). Como se ve en la Tabla 2, las mutaciones en *tna* y *tara* suprimen la transformación provocada por la mutación *Antp^{Ns}* [*tna⁻* (17%), *tara⁰³⁸⁸¹* (50%) y *tna³*, *tara²⁰* (49%)] Estas mutaciones no modifican el fondo mutante *Antp^{73b}* (100% en todos los genotipos). Por lo tanto, Tna y Tara actúan en la transcripción de *Antp* y no actúan postraduccionalmente en la proteína Antp.

Genotipo	<i>Antp^{Ns}</i> *	<i>Antp^{73b}</i> *
+/+	236/249 (95)	253/253 (100)
<i>tna¹</i> /+	172/205 (84)	258/258 (100)
<i>tna⁻</i> /+	13/75 (17)	46/46 (100)
<i>tara⁰³⁸⁸¹</i>	40/80 (50)	129/129 (100)
<i>tna¹ tara⁰³⁸⁸¹</i>	25/44 (56)	122/122 (100)
<i>tna²</i>	41/47 (87)	53/53 (100)
<i>tara²</i>	91/113 (80)	80/80 (100)
<i>tna² tara²</i>	75/106 (71)	110/110 (100)
<i>tna³</i>	76/109 (70)	93/93 (100)
<i>tara²⁰</i>	97/102 (95)	119/119 (100)
<i>tna³ tara²⁰</i>	60/121 (49)	95/95 (100)

Tabla 2: *tna* y *tara* reducen la transformación homeótica provocada por la mutante *Antp^{Ns}* pero no por la mutación *Antp^{73b}*. El símbolo (*) indica el número de individuos que muestran la transformación de antena a pata dividido entre el número de moscas examinadas.

Las mutantes *ina*¹, *tara*² y *tara*²⁰ fueron generadas con etilmetanosulfonato y generan cambios puntuales en estos loci (Vázquez et al, 1999). Estas mutantes por sí solas no tienen fenotipo visible, con excepción de *ina*¹ que genera individuos que extienden las alas a una proporción del 17% (Gutiérrez et al, 2003). Todas ellas interactúan fuertemente con mutaciones en *brm* y *osa* (Gutiérrez et al, 2003). Se presume que varias mutaciones puntuales en *osa* (e.g. *osa*¹ y *osa*²) generarían proteínas alteradas que retienen la capacidad de unirse a otros factores y podrían competir con la proteína silvestre Osa (Vázquez et al, 1999). *ina*¹ es una mutación puntual que genera un producto truncado en la proteína TnaA que asemeja al producto alternativo TnaB. TnaB no substituye la función de TnaA y como el transcrito para *tnaB* aparece solamente en el desarrollo tardío, se presume que TnaB podría modular negativamente la función de TnaA (Gutiérrez et al, 2003). La naturaleza molecular de las mutaciones *tara*² y *tara*²⁰ se desconoce y se presume que también generan productos alterados para Tara (Vázquez et al, 1999 y Gutiérrez et al, 2003).

Los datos genéticos presentados en esta sección sugieren que proteínas mutantes para para Osa, Tna y Tara competirían con sus contrapartes silvestres y afectarían la activación de un promotor homeótico.

4.- Mutaciones en los genes *RpIII40*, *hay* y *mrn* modifican diferencialmente la desrepresión de los genes *Scr* y *Ubx*.

Esta parte del trabajo se describe en detalle en el manuscrito de la siguiente sección [Gutiérrez et al, 2003 (manuscrito sometido)]. Aquí mostramos que algunas mutaciones en los genes *RpIII40*, *hay* y *mrn* interactúan genéticamente con alelos que provocan la desrepresión de los genes *Ubx* y *Scr*. Una mutación en particular, *RpIII40*^{imp}, aumenta específicamente los fenotipos provocados por la pérdida en la función de *Ubx*. Además, esta mutante suprime los fenotipos provocados por la desrepresión de *Scr* en cualquier fondo genético, pero en contraste, aumenta el fenotipo observado cuando se desreprime el gene *Ubx*.

Las mutantes en los genes *hay* y *mrn* (TFIIH) modifican específicamente los fenotipos provocados por la desrepresión de *Scr* en un contexto particular; cuando la desrepresión de *Scr* depende de apareamiento cromosomal (mutaciones *Scr^{Msc}* y *Antp^{Scx}*). Las mutantes *hay^{nc2}* y *hay^{nc2rv4}* reducen la expresividad del fenotipo provocado por la mutación *Antp^{Scx}* y aumentan la penetrancia del fenotipo generado por la desrepresión de *Ubx* [(Gutiérrez et al, 2003 (manuscrito recién sometido)]. En contraste (Figura 10 y Tabla 3), algunos alelos puntuales en *mrn* (*mrn^{E94}*, *mrn^{ex9-2}*) aumentan el fenotipo provocado por la desrepresión de *Scr* en los mutantes *Scr^{Msc}* y *Antp^{Scx}*.

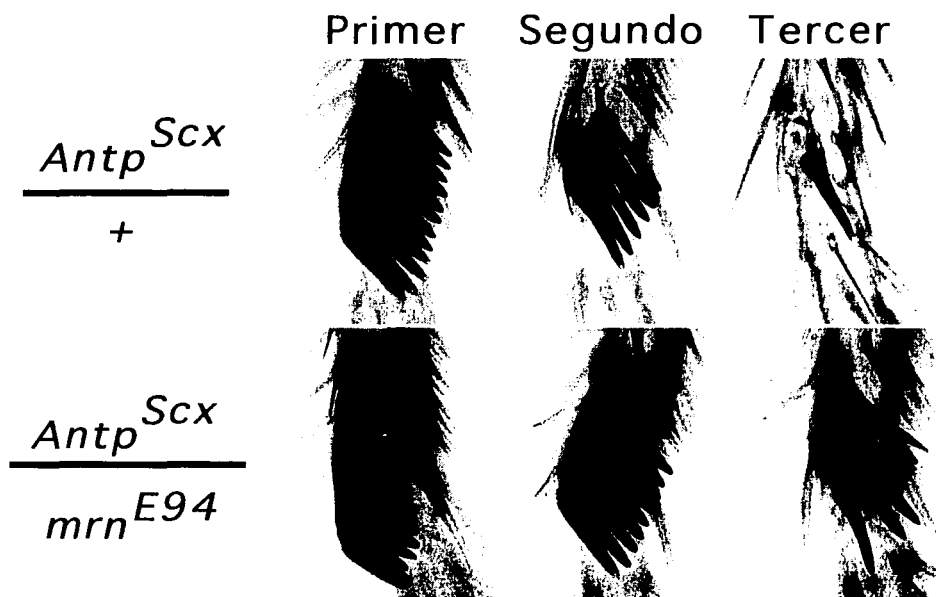


Figura 10. Algunas mutaciones puntuales en *mrn* aumentan del fenotipo provocado por la desrepresión de *Scr* en los segundos y tercer discos imagales. Como se ve en estas imágenes, la mutante puntual *mrn^{E94}* incrementa el número de dientes en los peines sexuales del segundo y tercer par de patas.

Genotipo	Expresividad $\&$ (%)
$+/Scr^{Msc}$	23
mrn^{E94}/Scr^{Msc}	29
mrn^{ex9-2}/Scr^{Msc}	31
mrn^{E67}/Scr^{Msc}	19
$+/Antp^{Scx}$	25
$mrn^{E94}/Antp^{Scx}$	50
$mrn^{ex9-2}/Antp^{Scx}$	37
$mrn^{E67}/Antp^{Scx}$	29
$+/Pc^3$	52
mrn^{E94}/Pc^3	37
mrn^{ex9-2}/Pc^3	52
mrn^{E67}/Pc^3	29

Tabla 3. *mrn* modifica el fenotipo de desrepresión de *Scr* provocado por las mutantes en *Scr*^{Msc} y *Antp*^{Scx}. El símbolo ($\&$) indica la expresividad que fue determinada como el número de dientes de los peines sexuales en el segundo y tercer par de patas comparado con el número en la primera pata que tiene un promedio de 10.8 dientes y que es el 100%. (Se contaron los dientes de 80 patas transformadas).

PUBLICACIONES

Gutiérrez, L., Zurita, M., Kennison, J.A. and Vázquez, M. 2003. The *Drosophila* trithorax gene *tonalli* (*tna*) interacts genetically with the Brahma remodeling complex and encodes an SP-RING finger protein. *Development*. 130: 343-354.

Gutiérrez, L., Merino, C., Vázquez, M., Reynaud, E. and Zurita, M. 2003. The RNA polymerase II 140^{wimp} mutant and mutations in the TFIIF subunit XPB, differentially affects homeotic gene expression in *Drosophila melanogaster*. (submitted).

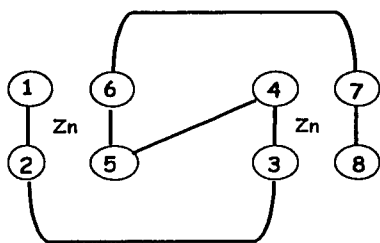
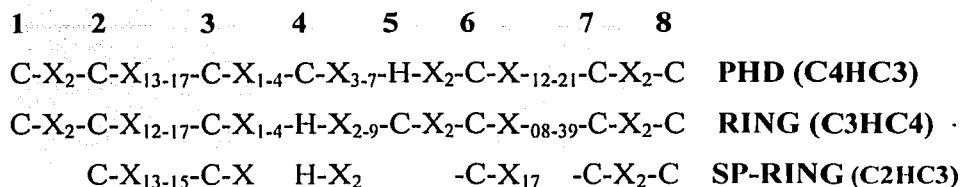
DISCUSION

1.- Tna y Tara como modificadores postraduccionales de la transcripción.

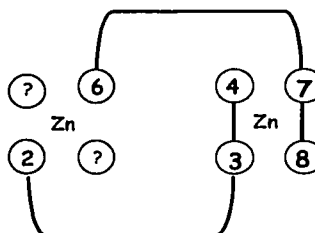
En este trabajo se propone que las modificaciones postraduccionales por sumo y/o ubiquitina podrían participar en la regulación de la expresión de los genes *Antp*, *Scr* y *Ubx*. La modificación por sumo en algunas proteínas favorece su estabilidad, antagoniza la ubiquitinación, y/o promueve la sublocalización nuclear de las proteínas sumoiladas (Müller et al, 2001). Estas actividades, no necesariamente excluyentes, podrían regular las función de complejos asociados a la cromatina y/o otros complejos transcripcionales . Las proteínas Tna y Tara serían factores que modificarían la actividad del complejo BRM durante la activación transcripcional de *Antp*. La isoforma TnaA se propone que puede ser un miembro de un subgrupo nuevo de E3 ligasas de Sumo cuyos sustratos serían las subunidades de los complejos de transcripción BRM, KIS, y MED (Gutiérrez et al., 2003). Las proteínas Tara tendrían el potencial de unirse a proteínas que albergan motivos tipo PHD-Bromodominio y RING (Calgaro et al, 2002). Se sabe que las isoformas SP100C y SP100-HMG, asociadas a los cuerpos nucleares PML, tienen dominios PHD-Bromodominio y HMG respectivamente y se pueden sumoilar (Seeler et al, 2001). No hay que olvidar que Sp100C funciona como un corregulador transcripcional (Seeler et al, 1998). El Bromodominio de hBrm podría regular su estabilidad y transporte nuclear (Muchardt y Yaniv, 1993) y el Bromodominio presente en factores acetiladores se une a las histonas y a factores de transcripción (Winston y Allis, 1999).

Los dominios RING y PHD (Figura 11) tienen estructuras parecidas y actúan, en algunos casos, como E3 ligasas de ubiquitina sobre sustratos específicos (Coscoy y Ganem, 2003; Jackson et al, 2000). Si nos fijamos en la Tabla 1 de la introducción podremos visualizar que muchos factores trx-G contienen alguno ó varios de estos dominios: e.g. Brm, Tou, Lid, Trx, Ash1, Ash2 y Bap111. No hay que olvidar que Trx y Ash1 también tienen actividad de metilación de histonas por medio de su dominio SET (Katsani et al, 2001; Czermin et al, 2002 y Beisel et al, 2002). El locus *tara* interactúa genéticamente con los genes *trxG brm*, *osa* y *tna*. Los homólogos de Tara en mamífero unen a factores que albergan motivos presentes en varios factores trx-G.

Por lo tanto Tara podría: a) Unirse físicamente a las subunidades sumoiladas de los complejos trx-G, b) Ser una subunidad de alguno(s) complejo(s) trx-G, c) Integrar las actividades modificadoras como remodelación, sumoilación, ubiquitinación, acetilación y metilación de histonas en regiones de la cromatina de genes activos y d) Regular la actividad de los factores de transcripción.



PHD y RING



SP-RING

Figura 11. Comparación entre los dominios PHD, RING y SP-RING. Los dominios PHD y RING tienen estructuras parecidas y conforman una estructura tipo "cross-brace" la cual coordina dos átomos de zinc. La estructura del dominio SP-RING no ha sido resuelta y podría tener relación con la estructura RING.

2.- El reclutamiento del complejo BRM, Tna y Tara a la cromatina activa.

Se sabe que el reclutamiento del complejo BRM y de los complejos tipo SWI/SNF a la cromatina de ciertos genes, depende de la interacción de dominios específicos de factores de transcripción con subunidades individuales de estos complejos. Por ejemplo, algunos factores con distintos motivos de unión a zinc (EKLF, GATA-1, Sp1, TFE3, NF-κB) pueden reclutar selectivamente la actividad remodeladora de los complejos SWI/SNF de mamífero. Por esto, se ha propuesto que uno de los posibles mecanismos de reclutamiento es por la interacción diferencial con factores de transcripción con dedos de zinc que unen a DNA (Kadam et al, 2000).

Se ha postulado que la proteína Osa podría estar involucrada en el proceso de reclutamiento selectivo del complejo BRM (Vázquez et al, 1999). El homólogo de Osa en humanos (BAF250) podría reclutar específicamente a un complejo relacionado a BRM (BAF) por medio de un motivo de unión a DNA conocido como ARID (Kortschak et al, 2000 y Nie et al, 2000). Aunque en *D. melanogaster*, Osa tiene efectos muy específicos *in vivo* (Vázquez et al, 1999) *in vitro* su actividad de unión a DNA es inespecífica y sólo tiene preferencia por algunas regiones ricas en adenina-timina (Collins et al, 1999). Lo anterior ha sugerido que el acceso de Osa a sus blancos *in vivo* dependería de la interacción con otros factores (Collins et al, 1999 y Vázquez et al, 1999). En base a lo anterior, podemos sugerir que deben existir uno o varios factores de unión a DNA, aún no identificados, que reclutan al complejo BRM a secuencias específicas. El escenario propuesto para la regulación transcripcional de *Antp* por BRM (Gutiérrez et al, 2003; Vázquez et al, 1999) tiene similitudes a la manera como se recluta el receptor de andrógenos al DNA. Este receptor cuando interactúa con la hormona se une a su DNA blanco. Su dominio de unión a DNA incluye a un motivo de unión a zinc [DBD/zinc finger region (ZFR)] que funciona como una interfase de interacción con proteínas coactivadoras y correpresoras ó con subunidades de los factores basales TFIIB, TFIIF y TFIID (Moilanen et al, 1999). En ratón se han identificado, *in vivo* e *in vitro*, cuatro proteínas nuevas que interactúan con la región DBD/ZFR de este receptor hormonal. La primera es una pequeña proteína con un dominio RING (SNURF), la segunda es una cinasa serina/treonina (ANPK), la tercera es la proteína ARIP3 que tienen actividad de E3 ligasa de sumo y la cuarta es ARIP4 que es una nueva ATPasa dependiente de DNA (Janne et al, 2000). ARIP4 es un miembro nuevo de la familia de remodeladores tipo Brm ó SWI2/SNF2 (Rouleau et al, 2002). Aunque no se sabe la función de SNURF, la presencia de un dominio RING atrae la idea de ser una ligasa E3 de ubiquitina.

El receptor de andrógenos se puede sumoilar por medio de las E3 ligasas de sumo ARIP3 y PIAS1 (Familia PIAS). La sumoilación de este receptor reprime la transcripción estimulada por la hormona (Nishida y Yasuda, 2002; Rouleau et al, 2002) y las mutaciones en su sitio aceptor para sumo aumentan su actividad transcripcional (Nishida y Yasuda, 2002; Rouleau et al, 2002). La ATPasa ARIP4 también se sumoila en células

de ratón (Rouleau et al, resultados no publicados). Cuando las cuatro proteínas que interactúan con el dominio DBD/ZFR se expresan en células cultivadas muestran un patrón punteado en el núcleo (Janne et al, 2000). Por lo tanto, se ha propuesto que la modificación reversible por sumo en el receptor de andrógenos y en ARIP4 tienen el potencial de actuar como una señal para el intercambio de estas proteínas entre la cromatina y el compartimiento nucleocitoplásmico [Poukka, Karvonen, Jäne y Palvino, (resultados no publicados)]. Estas y otras evidencias indican que las modificaciones postraduccionales por sumo son señales que regulan el balance del intercambio de factores transcripcionales entre los subcompartimientos nucleares y la cromatina y entre el citoplasma y el núcleo. Lo anterior no excluye que sumo regule la degradación y/o estabilidad de estos factores.

3.- El sistema de modificación postraduccionales sumo/ubiquitina y su relación con el código de histonas.

Las modificaciones covalentes de las histonas controlan muchos aspectos del funcionamiento de los cromosomas. Se sabe que la monoubiquitinación de la histona H2B es necesaria para la metilación de la lisina 4 en la histona H3. Esta modificación está asociada con la cromatina activa y es catalizada por Rad6 que es una E2 conjugante de ubiquitina (Robsky et al, 2000). Rad6 está involucrada en muchos procesos biológicos como la reparación de DNA, meiosis y silenciamiento de genes (Kupiec y Simchen, 1986). Es de esperarse que distintas E3 ligasas de ubiquitina determinen la especificidad de sustrato de Rad6. Dos trabajos recientes en levadura indican que el dominio RING de la E3 ligasa de ubiquitina conocida como Bre1 modifica a la histona H2B. Esta señal conduce a la metilación de las lisinas 4 y 79 en la histona H3 y Bre1 se asocia a través del dominio RING con RAD6 en un complejo molecular. Este evento es esencial para la modificación de las histonas pertinentes en la cromatina de un promotor específico (Hwang et al, 2003 y Wood et al, 2003). En levadura, la metilación de las lisinas 4 y 127 de la histona H3, que depende de Rad6, es catalizada por el complejo COMPASS (Robsky et al, 2000) el cual contiene un homólogo de la proteína Trx (Miller et al, 2001). En el caso de *D. melanogaster*, se requiere de un contexto adecuado de residuos

metilados en las histonas H3 y H4 para facilitar el reclutamiento del complejo BRM (Beisel et al, 2002). Lo anterior sugiere que las modificaciones covalentes por ubiquitina podrían contribuir para establecer señales de memoria en la cromatina activa. Enzimas de la vía de ubiquitina, con dominios tipo RING, podrían ser reclutadas a las regiones blanco del complejo BRM y promover entonces un conformación de cromatina activa. Por lo tanto, la sumoilación y la ubiquitinación actuarían regulando la actividad de sustratos diferentes pero necesarios para el mantenimiento de la expresión de genes HOM.

4.- El papel de los factores TFIH y RNAPolIII en la desrepresión de genes HOM.

Las interacciones regulatorias entre los genes HOM complica las interpretaciones sobre los efectos que tienen las mutaciones en modificadores de fenotipos homéoticos. Las proteínas Abd-A y Abd-B reprimen la transcripción del gene *Ubx* y la proteína Ubx reprime la transcripción del gene *Antp* (Kennison, 2003). En contraparte, la activación o represión de los genes *Scr*, *Abd-B* y *Dfd* parece no ser afectada por la expresión de otros genes HOM (Kennison, 2003).

En este trabajo [Gutiérrez et al, 2003 (sometido)], mostramos que la mutación *RpIII40^{wimp}* suprime los fenotipos provocados por la desrepresión de *Scr* en los segundo y tercer discos imagales. En contraste, *RpIII40^{wimp}* aumenta el fenotipo por la desrepresión de *Ubx* provocado por la mutación *Cbx¹Ubx¹*, este fenotipo consiste en la transformación parcial de ala hacia halterio. De manera equivalente, las mutaciones *hay^{nc2}* y *hay^{nc2rv4}* reducen la desrepresión de *Scr* en un contexto en particular y también aumentan el fenotipo de la mutación *Cbx¹Ubx¹*. El impacto de estas mutaciones es específico porque otras mutaciones en *RpIII40* y *hay* no provocan estos efectos. Además, la inhibición química de la actividad de la RNAPolIII, utilizando dosis bajas de actinomicina D, reducen globalmente la desrepresión *Scr*, *Ubx* y *Antp*. [Gutiérrez et al, 2003 (sometido)].

Un aumentador del fenotipo *Cbx¹Ubx¹* podría corresponder a una mutación en algún factor que promueva la activación de *Antp*. Los alelos en los genes *trx-G* (*brm*, *mor*, *osa*, *skd*, entre otros) aumentan el fenotipo *Cbx¹Ubx¹* [Stoller y Kennison, 1997

(comunicación personal) y Kennison, 2003] y este efecto es atribuido al hecho que, estos factores *trx-G* son más importantes para la expresión de *Antp* que para la de *Ubx* [Stoller y Kennison, 1997 (comunicación personal) y Kennison, 2003]. Es conocido que las mutaciones en los genes *brm*, *mor* y *osa* reducen la expresión de *Antp*, pero tiene una contribución menor en la expresión de *Ubx* (Tamkun et al, 1992; Brizuela y Kennison, 1997 y Vázquez et al, 1999). Ninguno de los alelos en *hay* y *RpIII40* modifica los fenotipos de provocados por mutaciones en *Antp*. No obstante, las mutaciones *RpIII40^{wimp}* y *RpIII40^{Z43}*, pero no otras, aumentan parcialmente el fenotipo provocado por la pérdida en la función de *Ubx* [Mortin et al, 1992 y Gutiérrez et al, 2003 (sometido)]. Por lo tanto, la reducción en la expresión de *Antp* no es la causa del aumento del fenotipo *Cbx¹Ubx¹* por las mutantes *RpIII40^{wimp}*, *hay^{nc2}* y *hay^{nc2rv4}*.

Alternativamente, podemos imaginar que las mutaciones *RpIII40^{wimp}*, *hay^{nc2}* y *hay^{nc2rv4}* reducen la expresión de los genes que contribuyen o influyen en la morfogénesis del ala. La mutación *RpIII40^{wimp}* reduce específicamente la transcripción de un subgrupo de genes de segmentación (Parkhurst y Ish-Horowicz, 1991) y algunos de ellos como *twist*, *knirps*, *snail* y *hairy*, participan durante la diferenciación del ala (Abu-Issa y Cavicchi, 1996; Hirose y Hayashi, 1996; Lunde et al, 1998; Butler et al, 2003 y Lunde et al 2003). Los individuos trans-heterocigos y trans-alélicos para mutaciones en *hay* y *cdk7* (TFIIH) muestran alas aberrantes y se ha sugerido que las células del ala contiene genes que son muy sensibles a la función de TFIIH en el control del ciclo celular, la transcripción y la reparación del DNA (Merino et al, 2002).

La desrepresión de *Scr*, en los segundo y tercer discos imagales, no es reprimida por la presencia de otras proteínas HOM como por ejemplo *Antp* y *Ubx* (Kennison, 2003). Por ende, la desrepresión del promotor de *Scr* en estos tejidos produce un fenotipo que es más fácil de interpretar. Así, la cantidad de dientes en los peines sexuales del segundo y tercer par de patas de los machos, refleja el nivel en la transcripción de *Scr* que se necesita para producir este fenotipo. Este fondo genético produce una condición limitante que es muy sensible a dosis de los mecanismos generales de la transcripción y también ha permitido identificar los factores que promueven la expresión o función de *Scr* durante el

crecimiento larvario. (Kennison, 2003). Casi todas las mutantes en *hay* y *RpIII40* suprimen o reducen los fenotipos provocado por la desrepresión de *Scr* y las mutaciones en los factores basales Taf60, Taf110, Taf250, TFIIA y TFIIF también tienen esta propiedad.

5.- Mrn como una posible subunidad regulatoria de TFIIH.

El carboxilo terminal de p52 de humano afianza la helicasa XPB en el complejo TFIIH (su homólogo en *D. melanogaster* es Hay). Es de esperarse que mutaciones en la proteína Mrn (homólogo de p52), altere la actividad de Hay y probablemente, el posicionamiento y asociación de TFIIH en el complejo de preiniciación y reparación de DNA. Las moscas que albergan mutaciones en *mrn*, son sensibles a radiación por rayos ultravioleta [Hiromi, 2003 (comunicación personal)] sugiriendo que son deficientes para reparar DNA dañado. Mutaciones en *hay* reducen la expresión ectópica de *Scr* y algunas mutaciones en *mrn*, la aumentan. Estas interacciones solamente se observan cuando el locus *Scr* se desreprime por medio de apareamiento cromosomal (transvección). Algunos escenarios podrían explicar estas observaciones. La proteína Mrn controlaría negativamente la actividad de TFIIH y posiblemente de Hay. Otra opción es que Mrn interactue con factores que participan en el trans-silenciamiento dominante de *Scr* y limite la disponibilidad de TFIIH para el promotor de *Scr* en el segundo y tercer discos imagales.

6.- Propiedades regulatorias de componentes de la RNAPolIII.

Se han descrito propiedades nuevas en las interacciones de la maquinaria basal de transcripción con los promotores y con factores promotor-específicos. Existen subcomplejos relacionados al factor TFIID que permiten una regulación más elaborada de la expresión de ciertos genes y algunos activadores afectan la capacidad del factor TFIIB para interactuar con un promotor (Zhao y Herr, 2002; Tjian y Levine, 2003). El factor TFIIH participa en la transcripción de los genes ribosomales dirigida por la RNA polimerasa I y la actividad de cinasa de TFIIH es requerida para el reclutamiento del complejo SET1; este complejo metila la lisina 4 de la histona H3 y esta modificación está

enriquecida en la región 5' de los genes transcritos (Iben et al, 2003; Reinberg y Hampsey, 2003).

Se ha propuesto que algunos de los fenotipos provocados por mutaciones en TFIIH, son el resultado de la contribución de los siguientes fenómenos:

1.- Una reducción en la cantidad de TFIIH que afecta los niveles de transcripción de diferentes genes. En individuos recesivos (TFIIH/TFIIH) se impide la actividad de genes que participan en el mantenimiento y la homeostásis celular. En individuos heterocigotos (TFIIH/+⁺) se afecta la expresión de algunos genes regulatorios y de diferenciación terminal. Solamente los individuos silvestres (+/+), podrían mantener la expresión ectópica de genes (Zurita y Merino, 2003).

2.- El efecto específico de mutaciones en TFIIH que afectan las interacciones con otros componentes de la transcripción. TFIIH mantiene una comunicación compleja con diferentes tipos de factores y las mutaciones en TFIIH alteran la regulación transcripcional de algunos genes (Zurita y Merino, 2003).

La expresión ectópica de genes como *Scr* ofrece un modelo simple para evaluar la actividad silvestre de los componentes y mecanismos generales que participan en la transcripción. También los genes *Dfd* y *Abd-B* se pueden expresar en condiciones limitantes y no son reprimidos o activados por otros factores HOM.

Por otra parte, los contactos específicos de los factores TFIIH y la RNApolIII con factores de transcripción, influyen en la expresión de un subgrupo de genes y por lo tanto, produce fenotipos específicos (Zurita y Merino, 2003). Algunas mutaciones específicas en *Rp1140* (*Rp1140^{wimp}* y *Rp1140²⁴³*) podrían afectar algún paso de la función de *Ubx* en el tercer segmento torácico y se ha especulado que las posibles interacciones físicas de *Ubx* con estas proteínas mutantes en *Rp1140* podrían alterar la expresión de genes regulados por *Ubx* [Mortin et al, 1992 y Gutiérrez et al, 2003 (sometido)]. En las alas, la expresión ectópica de *Ubx* promueve la inactivación de ciertos genes que también serían sensibles a las mutaciones *hay^{nc2}*, *hay^{nc2rv4}* y *Rp1140^{wimp}* [Gutiérrez et al, 2003 (sometido)]. Las mutaciones puntuales *hay^{nc2}*, *hay^{nc2rv4}*, *mrn^{E94}* y *mrn^{ex9-2}* (TFIIH)

producen fenotipos específicos en el transilenciamiento dominante de *Scr* [Gutiérrez et al, 2003 (manuscrito sometido) y Fregoso, 2003 (proyecto de Doctorado)].

A partir de una colección de mutaciones en las proteínas Hay, Mrn y Rpl1140, podemos sugerir la existencia de puntos de contacto con otros componentes de la transcripción. Estas interacciones impactarían diferencialmente la expresión de genes en contextos regulatorios específicos (Figura 12).

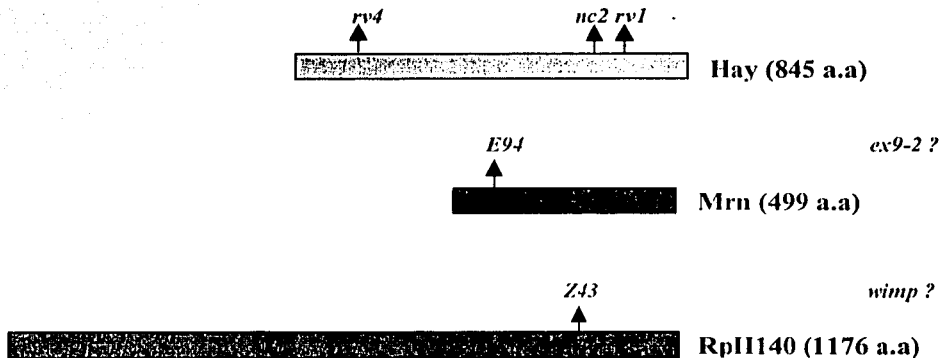


Figura 12. Mutaciones en las proteínas Hay, Mrn y Rpl1140 que provocan efectos diferenciales en la expresión de genes HOM. La mutación *nc2* provoca una sustitución de la arginina en la posición 652 de Hay hacia una cisteína (Mounkes et al, 1999). *rv4* y *rv1* generan sustituciones de los aminoácidos 220 y 657 de Hay hacia codones de término produciendo proteínas truncadas [Mounkes et al, 1999 y Merino, 2002 (Tesis de Doctorado)]. Las mutaciones *rv4* y *rv1* fueron generadas como revertantes de la mutación *nc2* (Mounkes et al, 1999). La mutación *E94* genera un codón de término en la posición 96 de la proteína Mrn [Fregoso, 2003. (Proyecto de Doctorado)]. *Z43* es un alelo que genera una sustitución de la arginina en la posición 940 de Rpl1140 hacia histidina (Chen et al, 1993). La secuencia de las mutaciones *ex9-2* en *mrn* y *wimp* en *Rpl1140* no ha sido determinada.

CONCLUSIONES

tna y *tara*

El locus *tna* codifica para un factor *trx-G* que se requiere para el mantenimiento de la expresión de los genes homeóticos *Scr*, *Antp* y *Ubx*.

Existe contribución materna de *tna* durante el desarrollo de *Drosophila*, pero la función cigótica de *tna* es necesaria para alcanzar las etapas tardías.

tna y *tara* interactúan con *brm* y *osa* para la expresión correcta del promotor 2 de *Antp*.

El locus *tna* contiene, al menos, dos transcritos generados por splicing alternativo que codifican para las proteínas TnaA (110kDa) y TnaB (60 kDa). Los transcritos *tnaA* y *tnaB* se expresan diferencialmente durante el desarrollo y se detectan en dosis altas en las etapas tardías.

La isoforma TnaA tiene un región de homología con otras proteínas eucarióticas que incluyen a dos factores en humano: KIAA1224 y KIAA1886. Esta región de homología se le nombró como XSPRING (eXtended SP-RING finger).

La región XSPRING de TnaA contiene el motivo SP-RING. Las proteínas que tienen este motivo funcionan como E3 ligasas de sumo y confieren especificidad sobre su sustrato.

Por lo anterior, proponemos que TnaA define a un nuevo subgrupo de E3 ligasas de sumo. La sumoilación puede regular: a) la interacción de factores de transcripción con los coreguladores b) el transporte y sublocalización nuclear o c) el antagonismo de la ubiquitinación.

Lo anterior abre la posibilidad que las subunidades de los complejos BRM y KIS sean blancos de sumoilación y sugiere la existencia de un nuevo nivel de regulación en la actividad de los complejos remodeladores de la cromatina.

Proponemos que Tara se une físicamente al Bromodominio de la proteína Brm. El homólogo de Tara en ratón se une a el PHD-Bromodominio de una factor que también

contiene un motivo RING. Los motivos PHD y RING han sido encontrados en proteínas que tienen actividad de E3 ligasas de ubiquitina.

Las modificaciones por sumo y ubiquitina podrían jugar un papel clave en la regulación de la expresión de genes homeóticos.

hay, mrn y RpII140

Existen mutaciones particulares en los genes *hay*, *mrn* y *RpII140* que modifican diferencialmente los fenotipos provocados por la desrepresión de los genes homeóticos *Scr* y *Ubx*.

En los individuos que albergan las mutaciones *RpII140*^{wimp} y *RpII140*^{Z43} se suprimen los fenotipos provocados por la pérdida en la función de *Pc* y se propone que reducen la actividad del promotor de *Scr* en los segundo y tercer disco imagales.

En los individuos que contienen proteínas mutantes para Hay y Mrn se modifica el fenotipo por la pérdida en el trans-silenciamiento dominante de *Scr*. Las proteínas Hay^{nc2} y Hay^{rv4} lo reducen y la proteína Mrn^{E94} lo aumenta.

Las proteínas silvestres Hay y Mrn se unen físicamente entre si y se postula que Mrn contacta físicamente ó es modificado por los componentes asociados a los elementos cromosomales que impiden la expresión de *Scr* en los segundo y tercer disco imagales. Además, Mrn podría funcionar como un regulador negativo de la función de Hay.

En los individuos que albergan las mutaciones *hay*^{nc2}, *hay*^{nc2rv4} y *RpII140*^{wimp} se aumenta la transformación de ala hacia halterio provocado por la desrepresión de *Ubx*. Se postula que estas proteínas mutantes reducen la expresión de un subgrupo de genes que participan en la formación del ala.

Por otra parte, creemos que las proteínas *RpII140*^{wimp} y *RpII140*^{Z43} afectan la actividad de unión a DNA de la proteína *Ubx*.

PERSPECTIVAS

Evaluar si la proteína TnaA tiene actividad de E3 ligasa de sumo en un sistema de reconstitución *in vitro*. Además, detectar si la proteína Tara se asocia con el bromodominio de Brm.

Identificar y aislar a los componentes celulares que se asocian con las proteínas TnaA, TnaB y Tara. Algunos de estos podrían corresponder a las subunidades de los complejos BRM, MED y KIS o a los componentes de la vías de sumoilación/ubiquitinación.

Analizar la distribución espacial y temporal de las proteínas Tara y Tna en el núcleo y citoplasma de las células de *Drosophila*.

Analizar el patrón de co-localización de los factores Tna, Tara y Brm en los sitios cromosomales de los genes ANTC y BXC.

Buscar elementos de DNA que respondan a factores trx-G en la región regulatoria del gene *Antp*. Específicamente la región genómica delimitada por las mutaciones *Antp^B* y *Antp^R*.

Evaluar si los complejos BRM y KIS sumoilados cambian sus actividades bioquímicas en un sustrato de cromatina.

Evaluar como se asocian los factores TFIIH y RplI140 a las regiones regulatorias que controlan la actividad transcripcional de los promotores ANTC y BCX.

Evaluar si existen interacciones proteína-proteína de los factores TFIIH y la RplI140 con subunidades de los complejos trx-G y Pc-G.

Evaluar como se modifica los fenotipos provocados por la desrepresión de *Scr* y *Ubx* en los individuos dobles mutantes *hay* y *mrn*.

Secuenciar la mutación *RplI140^{wimp}* y evaluar si modifica la actividad el reclutamiento de la proteína Ubx a sus secuencias blanco en los genes que forman las alas y los halterios.

BIBLIOGRAFIA

Abbot, M. y Kaufman, T. 1986. The relationships between the functional complexity and the molecular organization of the *Antennapedia* locus of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* (114): 919-942.

Abu-Issa, R. y Cavicchi, S. 1996. Genetic interactions among *vestigial*, *hairy* and *Notch* suggest a role of *vestigial* in the differentiation of epidermal and neural cells of the wing and haltere of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Neurogenetics* (10): 239-246.

Abzhanov, A., Holtzman, S. y Kaufman, T. 2001. The *Drosophila* proboscis is specified by two Hox genes, *Proboscipedia* and *Sex combs reduced*, via repression of leg and antennal appendage genes. *Development* (128): 2803-2814.

Agalioti, T., Chen, G. y Thanos, D. 2002. Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene. *Cell* (111): 381-392.

Armstrong, J. A., Papoulas, O., Daubresse, G., Sperling, A. S., Lis, J. T., Scott, M. P. y Tamkun, J. W. 2002. The *Drosophila* BRM complex facilitates global transcription by RNA polymerase II. *EMBO Journal* (21): 5245-5254.

Beisel, C., Imhof, A., Greene, J., Kremmer, E. y Sauer, F. 2002. Histone methylation by the *Drosophila* epigenetic transcriptional regulator Ash1. *Nature* (419): 857-862.

Beuchle, D., Strul, G. y Müller, J. 2001. Polycomb group proteins and heritable silencing of *Drosophila* Hox genes. *Development* (128): 993-1004.

Brizuela, B., Elfring, L. K., Ballard, J., Tamkun, J. W. y Kennison, J. A. 1994. Genetic analysis of the *brahma* gene of *Drosophila melanogaster* and polytene chromosome subdivisions 72AB. *Genetics* (137): 803-813.

Brizuela, B. y Kennison, J. A. 1997. The *Drosophila* homeotic gene *moira* regulates expression of engrailed and HOM genes in imaginal tissues. *Mechanisms of Development* (65): 209-220.

Butler, J. E. F. y Kadonaga, J. T. 2002. The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes and Development* (16): 2583-2592.

Butler, M.J., Jacobsen, T.L., Cain, D.M., Jarman, M.G., Hubank, M., Whittle, J.R.S., Phillips, R. y Simcox, A. 2003. Discovery of genes with highly restricted expression patterns in the *Drosophila* wing disc using DNA microarrays. *Development* (130): 659-670.

Calgaro, S., Boube, M., Cribbs, D. y Bourbon, H. 2002. The *Drosophila* gene *taranis* encodes a novel trithorax group member potentially linked to the cell cycle regulatory apparatus. *Genetics* (160): 547-560.

Capdevilla, M. P., Botas, J. y Garcia-Bellido, A. 1986. Genetic interactions between the Polycomb locus and the *Antennapedia* and *Bithorax* complexes of *Drosophila*. *Wilhelm Roux's Archives* (195): 417-432.

Carroll, S. y Scott, M. 1985. Localization of the Fushi tarazu protein during *Drosophila* embryogenesis. *Cell* (43): 47-57.

Cavalli, G. y Paro, R. 1999. Epigenetic inheritance of active chromatin after removal of the main transactivator. *Science* (286): 955-958.

Chen, Y., Weeks, J., Mortin, M. y Greenleaf, A. L. 1993. Mapping mutations in genes encoding the two large subunits of *Drosophila* RNA polymerase II defines domains essential for basic transcription functions and for proper expression of developmental genes. *Molecular and Cellular Biology* (13): 4214-4222.

Collins, R. T., Furukawa T., Tanese N, y Treisman, J.E. 1999. Osa associates with the Brahma chromatin remodeling complex and promotes the activation of some target genes. *EMBO Journal* (18): 7029-7040.

Coscoy, L. y Ganem, D. 2003. PHD domains and E3 ubiquitin ligases: viruses make the connection. *Trends in Cell Biology* (13): 7-12.

Cosma, M. P. 2002. Ordered recruitment: gene-specific mechanisms of transcription activation. *Molecular Cell* (10): 227-236.

Czermin, B., Melfi, R., McCabe, D., Seitz, V., Imhof, A. y Pirrotta, V. 2002. *Drosophila* Enhancer of Zeste/ESC Complexes have a histone H3 methyl transferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell* (111): 185-196.

Dahmus, M. E. 1995. Phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Biochimie and Biophysica Acta* (1261): 171-182.

Damelin, M., Simon, I., Moy, T. I., Wilson, B., Komili, S., Tempst, P., Roth, F. P., Young, R. A., Cairns, B. R. y Silver, P. A. 2002. The genome-wide localization of Rsc9, a component of the RSC chromatin-remodeling complex, changes in response to stress. *Molecular Cell* (9): 563-573.

David, G., Neptune, M. A. y DePinho, R. A. 2002. SUMO-1 modification of histone deacetylase 1 (HDAC1) modulates its biological activities. *Journal of Biological Chemistry* (28): 23658-23663.

Duncan, I. 2002. Transvection effects in *Drosophila*. *Annual Review of Genetics* (36): 521-556.

Fauvarque, M., Laurent, P., Boivin, A., Bloyer, S., Griffin-Shea, R., Bourbon, H-M. y Dura, J-M. 2001. Dominant modifiers of the *polyhomeotic* extra-sex-comb phenotype induced by marked P element insertional mutagenesis in *Drosophila*. *Genetic Research* (78): 137-148.

Featherstone, M. 2002. Coactivators in transcription initiation: here are your orders. *Current Opinion in Genetics and Development* (12): 149-155.

Felsenfeld, G. y Groudine, M. 2003. Controlling the double helix. *Nature* (421): 448-453.

Francis, N. y Kingston, R. E. 2001. Mechanisms of transcriptional memory. *Nature Reviews* (2): 409-421.

Francis, N., Saurin, A., Shao, Z. y Kingston, R. E. 2001. Reconstitution of a functional core polycomb repressive complex. *Molecular Cell* (8): 545-556.

Fregoso, 2003. Caracterización Genética y Molecular de p52 de *Drosophila*. (Proyecto de Doctorado).

Frischer, L. E., Hagen, F. S. y Garber, R. L. 1986. An inversion that disrupts the *Antennapedia* gene causes abnormal structure and localization of RNAs. *Cell* (47): 1017-1023.

García-Bellido, A. 1975. Genetic control of wing disc development in *Drosophila*. *Ciba Foundations Symposia* (29): 161-178.

Gutiérrez, L., Merino, C., Vázquez, M., Reynaud, E. y Zurita, M. 2003. The RNA polymerase II 140^{wimp} mutant and mutations in the TFIIH subunit XPB, differentially affects homeotic gene expression in *Drosophila melanogaster*. (sometido).

Gutiérrez, L., Zurita, M., Kennison, J. A. y Vázquez, M. 2003. The *Drosophila* trithorax group gene *tonalli* (*tna*) interacts genetically with the Brahma remodeling complex and encodes an SP-RING finger protein., *Development* (130): 343-354.

Harding, K. y Levine, M. 1988. Gap genes define the limits of *Antennapedia* and *Bithorax* gene expression during early development in *Drosophila*. *The EMBO Journal* (7): 205-214.

Hirose, S. y Hayashi, S. 1996. Determination of wing cell fate by the *escargot* and *snail* genes in *Drosophila*. *Development* (122): 1059-1070.

Hochstrasser, M. 2001. SP-RING for sumo: new functions bloom for a ubiquitin-like protein. *Cell* (107): 5-8.

Horard, B., Tatout, C., Poux, S. y Pirrotta, V. 2000. Structure of a Polycomb response element and in vitro binding of Polycomb Group Complexes containing GAGA factor. *Molecular and Cellular Biology* (20): 3187-3197.

Hsu, S.I.H., Yang, C.M., Sim, K.G., Hentschel, D.M. O'Leary, E. y Bonverte, J.V. 2001. Trip-Br: a novel family of PHD zinc-finger- and bromodomain-interacting proteins that regulate the transcriptional activity of E2F/DP-1. *EMBO Journal* (20): 2273-2285.

Hwang, W.W., Venkatasubrahmanyam, S., Ianculescu, A.G., Tong, A., Boone, C. y Madhani, H.D. 2003. A conserved RING finger protein required for histone H2B monoubiquitination and cell size control. *Molecular Cell* (11): 267-274.

Iben, S., Tschochner, H., Bier, M., Hoogstraten, D., Hozak, P. y Egly, J.M. 2002. TFIIH plays an essential role in RNA polymerase I transcription. *Cell* (109): 297-306

Ingham, P. 1988. The molecular genetics of embryonic pattern formation in *Drosophila*. *Nature* (335): 25-34.

Ingham, P. y Martinez-Arias, A. 1986. The correct activation of *Antennapedia* and *Bithorax* complex genes requires the fushi tarazu gene. *Nature* (324): 592-597.

Ito, T., Levenstein, M. E., Fyodorov, D. V., Kutach, A. K. y Kobayashi, R. 1999. ACF consist of two subunits, Acl1 and ISWI, that function cooperatively in the ATP-dependent catalysis of chromatin assembly. *Genes and Development* (13): 1529-1539.

Jackson, P. K., Eldridge, A. G., Freed, E., Furstenthal, L., Hsu, J., Kaiser, B. y Reimann, J. D. 2000. The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends in Cell Biology* (10): 429-439.

Janne, O., Moilanen, A., Poukka, H., Rouleau, N., Karvonen, U., Kotaja, N., Hakli, M. y Palvimo, J. 2000. Androgen-receptor-interacting nuclear proteins. *Biochemical Society Transactions* (28): 401-405.

Jawhari, A., Lainé, J., Dubaele, S., Lamour, V., Poterszman, F., Coin, F., Moras, D. y Egly, J. M. 2002. p52 mediates XPB function within the transcription/repair factor TFIIH. *The Journal of Biological Chemistry* (277): 31761-31767.

Jenuwein, T. y Allis, C. 2001. Translating the histone code. *Science* (293): 1074-1080.

Kadam, S., McAlpine, G. S., Phelan, M. L., Kingston, R. E., Jones, K. A. y Emerson, B. M. 2000. Functional selectivity of recombinant mammalian SWI/SNF subunits. *Genes and Development* (14): 2441-2451.

Kal, A. J., Mahmoudi, T., Zak, N. B. y Verrijzer, C. P. 2000. The *Drosophila* Brahma complex is an essential coactivator for the trithorax group protein Zeste. *Genes and Development* (14): 1058-1071.

Katsani, K. R., Arredondo, J. J., Kal, A. J. y Verrijzer, C. P. 2001. A homeotic mutation in the Trithorax SET domain impedes histone binding. *Genes and Development* (15): 2197-2202.

Kaufman, T., Seeger, M. y Olsen, G. 1990. Molecular and genetic organization of the *Antennapedia* gene complex of *Drosophila melanogaster*. *Advances in Genetics* (27): 309-362.

Kennison, J. A. 1995. The Polycomb and trithorax group proteins of *Drosophila*: Trans-regulators of homeotic gene function. *Annual Review of Genetics* (29): 289-303.

Kennison, J. A. 2003: Introduction to Trx-G and Pc-G genes. (sometido a *Methods in Enzimology*).

Kennison, J. A. y Russell, M. A. 1987. Dosage-dependent modifiers of homeotic mutations in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* (116): 75-79.

Kennison, J. A. y Tamkun, J. 1988. Dosage-dependent modifiers of Polycomb and Antennapedia mutations in *Drosophila*. *Proceedings of the National Acadademy Sciences of USA* (85): 8136-8140.

Kennison, J. A., Vázquez, M. y Brizuela, B. 1998. Regulation of the *Sex combs reduced* gene in *Drosophila*. *Annals of the New York Academy of Sciences* (842): 28-35.

Kirsh, O., Seeler, J. S., Pichler, A., Gast, A., Muller, S., Miska, E., Mathieu, M., Harel-Bellan, A., Kouzarides, T., Melchior, F. y Dejean, A. 2002. The SUMO E3 ligase RanBP2 promotes modification of the HDAC4 deacetylase. *EMBO Journal* (21): 2682-2691.

Klochender-Yeivin, A., Muchardt, C. y Yaniv, M. 2002. SWI/SNF chromatin remodeling and cancer. *Current Opinion in Genetics and Development* (12): 73-79.

Kortschak, R. D., Tucker, P. W. y Saint, R. 2000. ARID proteins come in from the desert. *Trends in Biochemical Sciences* (25): 294-299.

Kotaja, N., Aittomäki, S., Silvennoinen, O., Palvimo, J. y Jänne, O. 2000. ARIP3 (Androgen receptor-interacting protein 3) and other PIAS (Protein inhibitor of activated STAT) proteins differ in their ability to modulate steroid receptor-dependent transcriptional activation. *Molecular Endocrinology* (14): 1986-2000.

Kotaja, N., Karvonen, U., Jänne, O. y Palvimo, J. 2002. PIAS proteins modulate transcription factors by functioning as sumo-1 ligases. *Molecular and Cellular Biology* (22): 5222-5234.

Kupiec, M. y Simchen, G. 1986. Regulation of the Rad6 gene of *Saccharomyces cerevisiae* in the mitotic cell cycle and in meiosis. *Molecular and General Genetics* (203): 538-543.

Kutach, A. K. y Kadonaga, J. T. 2000. The downstream promoter element DPE appears to be widely used as the TATA box in *Drosophila* core promoters. *Molecular and Cellular Biology* (20): 4754-4764.

Laughon, A., Boulet, A. M., Bermingham, J. R., Laymon, R. A. y Scott, M. 1986. Structure of transcripts from the homeotic *Antennapedia* gene of *Drosophila melanogaster*: Two promoters control the major protein-coding region. *Molecular and Cellular Biology* (6): 4676-4689.

Lee, T. y Young, R. 2000. Transcription of the eukaryotic protein-coding genes. *Annual Review of Genetics* (34): 77-137.

Levine, S., Weiss, A., Erdjument-Bromage, H., Shao, Z., Tempst, P. y Kingston, R. E. 2002. The core of the Polycomb repressive complex is compositionally and functionally conserved in flies and humans. *Molecular and Cellular Biology* (22): 6070-6078.

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

Lohuizen, M. 1999. The trithorax-group and Polycomb-group chromatin modifiers: implications for disease. *Current Opinion in Genetics and Development* (9): 355-361.

Lunde, K., Biels, B., Nauber, U. y Bier, E. 1998. The *knirps* and *knirps*-related genes organize development of the second wing vein in *Drosophila*. *Development* (125): 4145-4154.

Lunde, K., Trimble, J.L., Guichard, A., Guss, K.A., Nauber, U. y Bier, E. 2003. Activation of the *knirps* locus links patterning to morphogenesis of the second wing vein in *Drosophila*. *Development* (130): 236-248.

Mann, R. y Carroll, S. 2002. Molecular mechanisms of selector gene function and evolution. *Current Opinion in Genetics and Development* (12): 592-600.

Merino, 2002. Análisis Genético y Molecular de *haywire* en *Drosophila melanogaster*. (Tesis de Doctorado).

Merino, C., Reynaud, E., Vázquez, M. y Zurita, M. 2002. DNA repair and transcriptional effects of mutations in TFIIF in *Drosophila* development. *Molecular Biology of the Cell* (13): 3256-3256.

Melchior, F. 2000. Sumo-nonclassical ubiquitin. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* (16): 591-626.

Miller, T., Krogan, N., Dover, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Johnston, M., Greenblatt, J. y Shilatifard, A. 2001. COMPASS: A complex of proteins associated with a trithorax-related SET domain protein. *Proceedings of the National Academy Sciences of USA* (98): 12902-12907.

Moilanen, A. M., Karvonen, U., Poukka, H., Yan, W., Toppari, J., Janne, O. A. y Palvimo, J. 1999. A testis-specific androgen receptor coregulator that belongs to a novel family of nuclear proteins. *Journal of Biological Chemistry* (274): 3700-3704.

Moreland, R. J., Tirode, F., Yan, Q., Conaway, J. W., Egly, J. y Conaway, R. 1999. A role for the TFIIH XPB DNA helicase in promoter escape by RNA polymerase II. *Journal of Biological Chemistry* (274): 22127-22130.

Mortin, M., Zuerner, R., Berger, S. y Hamilton, B. 1992. Mutations in the second-largest subunit of *Drosophila* RNA polymerase II interact with *Ubx*. *Genetics* (131): 859-903.

Mounkes, L. y Fuller, M. 1999. Molecular characterization of mutant alleles of the DNA repair/basal transcription factor haywire/ERCC3 in *Drosophila*. *Genetics* (152): 291-297.

Muchardt, C. y Yaniv, M. 1993. A human homologue of *Saccharomyces cerevisiae* SNF2/SWI2 and *Drosophila* *brm* genes potentiates transcriptional activation by the glucocorticoid receptor. *EMBO Journal* (12): 4279-4290.

Müller, J. 1995. Transcriptional silencing by the Polycomb protein in *Drosophila* embryos. *EMBO Journal* (14): 1209-1220.

Müller, J. y Bienz, M. 1992. Sharp anterior boundary of homeotic gene expression conferred by the Fushi tarazu protein. *The EMBO Journal* (11): 3653-3661.

Müller, J., Hart, C., Francis, N., Vargas, M., Sengupta, A., Wild, B., Miller, E., O'Connor, M., Kingston, R. E. y Simon, J. 2002. Histone methyltransferase activity of a *Drosophila* Polycomb Group repressor complex. *Cell* (111): 197-208.

Müller, S., Hoegge, C., Pyrowolakis, G. y Jentsch, S. 2001. Sumo, ubiquitin's mysterious cousin. *Nature Review Molecular Cell Biology* (2): 202-210.

Nakayama, J., Rice, J. C., Strahl, B. D., Allis, C. D. y Grewal, S. I. 2001. Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science* (292): 110-113.

- Narlikar, G., Fan, H-Y. y Kingston, R. E. 2002. Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* (108): 476-487.
- Nie, Z., Xue, Y., Yang, D., Zhou, S., Deroo, B. J., Archer, T. K. y Wang, W. 2000. A specificity and targeting subunit of a human SWI/SNF family-related chromatin remodeling complex. *Molecular and Cellular Biology* (23): 8879-8888.
- Nishida, T. y Yasuda, H. 2002. PIAS1 and PIASxalpha function as SUMO-E3 ligases toward androgen receptor and repress androgen receptor-dependent transcription. *Journal of Biological Chemistry* (277): 41311-41317.
- Orlando, V. 2002. Polycomb, Epigenomes, and control of cell identity. *Cell* (112): 599-606.
- Orlando, V. y Jones, K. 2002. Wild chromatin: regulation of eukaryotic genes in their natural chromatin context. *Genes and Development* (16): 2039-2044.
- Orphanides, G. y Reinberg, D. 2002. A unified theory of gene expression. *Cell* (108): 439-451.
- Papoulas, O., Beek, S. J., Moseley, S. L., McCallum, C. M., Sarte, M., Shearn, A. y Tamkun, J. W. 1998. The *Drosophila* trithorax group proteins BRM, ASH1 and ASH2 are subunits of distinct protein complexes. *Development* (125): 3955-3966.
- Park, J. M., Gim, B. S., Kim, J. M., Yoon, J. H., Kim, H-S., Kang, J-G. y Kim, Y-J. 2001. *Drosophila* mediator complex is broadly utilized by diverse gene-specific transcription factors at different types of core promoters. *Molecular and Cellular Biology* (21) 2312-2323.
- Parkhurst, S. y Ish-Horowicz, D. 1991. wimp, a dominant maternal-effect mutation, reduces transcription of a specific subset of segmentation genes in *Drosophila*. *Genes and Development* (5): 341-357.
- Petruk, S., Sedkov, Y., Smith, S., Tillib, S., Kraevski, V., Nakamura, T., Canaani, E., Croce, C. M. y Mazo, A. 2001. Trithorax and dCBP acting in a complex to maintain expression of a homeotic gene. *Science* (294): 1331-1334.
- Poux, S., Horard, B., Sigrist, C. J. A. y Pirrotta, V. 2002. The *Drosophila* Trithorax protein is a coactivator required to prevent re-establishment of Polycomb silencing. *Development* (129): 2483-2493.
- Poux, S., McCabe, D. y Pirrotta, V. 2001a. Recruitment of components of Polycomb Group chromatin complexes in *Drosophila*. *Development* (128). 75-85.

Poux, S., Melfi, R. y Pirrotta, V. 2001b. Establishment of a Polycomb silencing requires a transient interaction between PC and ESC. *Genes and Development* (15): 2509-2514.

Reinberg, D. y Hampsey, M. 2003. Tails of intrigue: Phosphorylation of RNA Polymerase II mediates histone methylation. *Cell* (113): 429-432.

Robsky, K., Recht, J. y Osley, M. A. 2000. Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast. *Science* (287): 7137-7148.

Rouleau, N., Domanskyi, A., Reeben, M., Moilanen, M., Havas, K., Kang, Z., Owen-Hughes, T., Palvimo, J. y Janne, O. 2002. Novel ATPase of SNF2-like protein family interacts with androgen receptor and modulates androgen-dependent transcription. *Molecular Biology of the Cell* (13): 2106-2119.

Sánchez-Herrero, E., Vernós, I. y Morata, G. 1985. Genetic organization of the *Drosophila* Bithorax complex. *Nature* (313): 108-113.

Sanders, S. L., Jennings, J., Canutescu, A., Link, A. J. y Weil, P. A. 2002. Proteomics of the eukaryotic transcription machinery: identification of proteins associated with components of yeast TFIID by multidimensional mass spectrometry. *Molecular and Cellular Biology* (22): 4723-4738.

Saurin, A., Shao, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. y Kingston, R. E. 2001a. A *Drosophila* Polycomb group complex includes Zeste and dTAFII proteins. *Nature* (412): 655-660.

Saurin, A. J., Shao, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. y Kingston, R. E. 2001b. A *Drosophila* Polycomb group complex includes Zeste and dTAFII proteins. *Nature* (412): 655-660.

Seeler, J. S., Marchio, A., Losson, R., Desterro, J. M., Hay, R. T., Chambon, P. y Dejean, A. 2001. Common properties of nuclear body protein SP100 and TIF1 α chromatin factor: role of SUMO modification. *Molecular and Cellular Biology* (21): 3314-3324.

Seeler, J. S., Marchio, A., Sitterlin, D., Transy, C. y Dejean, A. 1998. Interaction of SP100 with HPI proteins: a link between the promyelocytic leukemia-associated nuclear bodies and the chromatin compartment. *Proceedings of the National Academy Sciences of USA* (95): 7316-7321.

Shao, Z., Raible, F., Mollaaghababa, R., Guyon, J., Wu, C., Bender, W. y Kingston, R. E. 1999. Stabilization of chromatin structure by PRC1, a Polycomb Complex. *Cell* (98): 37-46.

Shimmell, M., Simon, J., Bender, W. y O'Connor, M. 1994. Enhancer point mutation results in a homeotic transformation in *Drosophila*. *Science* (264): 968-971.

Simon, J. y Tamkun, J. W. 2002. Programming off and on states in chromatin: mechanisms of Polycomb and trithorax group complexes. *Current Opinion in Genetics and Development* (12): 210-218.

Southworth, J. y Kennison, J. A. 2002. Transvection and silencing of the *Scr* homeotic gene of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* (161): 733-746.

Sternsdorf, T. K., Jensen, K. y Will, H. 1997. Evidence for covalent modification of the nuclear dot-associated proteins PML and Sp100 by PIC1/SUMO-1. *Journal of Cellular Biology* (139): 1621-1634.

Strul, G. y Bower, D. 1982. Early role of the *esc⁺* gene product in the determination of segments in *Drosophila*. *Cell* (31): 285-292.

Sung, P., Guzder, S. N., Prakash, L. y Prakash, S. 1996. Reconstitution of TFIIH and requirement of its DNA helicase subunits, Rad3 and Rad25, in the incision step of nucleotide excision repair. *Journal of Biological Chemistry* (271): 10821-10826.

Talbert, P. B. y Garber, R. L. 1994. The *Drosophila* homeotic mutation Nasobemia (*Anip^{Mt}*) and its revertants: an analysis of mutational reversion. *Genetics* (138): 709-720.

Tamkun, J. W., Deuring, R., Scott, M., Kissinger M, Pattatucci, A., Kaufman, T. y Kennison, J. A. 1992. *brhma*: a regulator of *Drosophila* homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Cell* (68): 561-572.

Tjian, R. y Levine, M. 2003. Transcriptional regulation and animal diversity. *Nature* (424): 147-151.

Tillib, S., Petruk, S., Sedkov, Y., Kuzin, A., Fujioka, M., Goto, T. y Mazo, A. 1999. Trithorax-and Polycomb-group response elements within an *Ultrabithorax* transcription maintenance unit consist of closely situated but separable sequences. *Molecular and Cellular Biology* (19): 5189-5202.

Tirode, F., Busso, D., Coin, F. y Egly, J. M. 1999. Reconstitution of the transcription factor TFIIH: assignment of functions for the three enzymatic subunits, XPB, XPD, and cdk7. *Molecular Cell* (3):87-95.

Treisman, J. E. 2001. *Drosophila* homologues of the transcriptional complex subunits TRAP240 and TRAP230 are required for identical processes in eye-antennal disc development. *Development* (128): 603-615.

Turner, B. 2002. Cellular memory and the histone code. *Cell* (111): 285-291.

Tussié-Luna, M. I., Bayarsaihan, D., Seto, E., Ruddle, F. H. y Roy, A. 2002a. Physical and functional interactions of histone deacetylase 3 with TFII-I family proteins and PIASxbeta. *Proceedings of the National Academy Sciences of USA* (99): 12807-12812.

Tussié-Luna, M. I., Michel, B., Hakre, S. y Roy, A. L. 2002b. The SUMO ubiquitin-protein isopeptide ligase family member Miz1/PIASxbeta/Siz2 is a transcriptional cofactor for TFII-I. *Journal of Biological Chemistry* (277): 43185-43193.

Vázquez, M., Moore, L. y Kennison, J. A. 1999. The trithorax group gene *osa* encodes an ARID-domain protein that genetically interacts with the brahma chromatin-remodeling factor to regulate transcription. *Development* (1): 733-742.

Winston, F. y Allis, C. 1999. The bromodomain: a chromatin-targeting module?. *Nature Structural Biology* (6): 601-604.

Wood, A., Krogan, N.J., Dover, J., Schneider, J., Heidt, J., Boateng, M.A., Dean, K., Golshani, A., Zhang, Y., Greenblatt, J.F., Johnston, M. y Shilatifard, A. 2003. Bre1, an E3 ubiquitin ligase required for recruitment and substrate selection of Rad6 at a promoter. *Molecular Cell* (11): 267-274.

Woychik, N. y Hampsey, M. 2002. The RNA polymerase II machinery: structure illuminates function. *Cell* (108): 453-463

Zurita, M. y Merino, C. 2003. The transcriptional complexity of the TFIIH complex. *Trends in Genetics* (en prensa).

Zhao, X. y Herr, W. 2002. A regulated two-step mechanism of TBP binding to DNA: a solvent-exposed surface of TBP inhibits TATA box recognition. *Cell* (108): 615-627.

PAGINACIÓN DISCONTINUA

The *Drosophila* trithorax group gene *tonalli* (*tna*) interacts genetically with the Brahma remodeling complex and encodes an SP-RING finger protein

Luis Gutiérrez¹, Mario Zurita¹, James A. Kennison² and Martha Vázquez^{1,*}

¹Departamento de Fisiología Molecular y Genética del Desarrollo, Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Morelos 62250, México

²Laboratory of Molecular Genetics, National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892, USA

*Author for correspondence (e-mail: mvazquez@ibt.unam.mx)

Accepted 21 October 2002

SUMMARY

The trithorax group genes are required for positive regulation of homeotic gene function. The trithorax group gene *brahma* encodes a SWI2/SNF2 family ATPase that is a catalytic subunit of the Brm chromatin-remodeling complex. We identified the *tonalli* (*tna*) gene in *Drosophila* by genetic interactions with *brahma*. *tna* mutations suppress *Polycomb* phenotypes and *tna* is required for the proper expressions of the *Antennapedia*, *Ultrabithorax* and *Sex combs reduced* homeotic genes. The *tna* gene encodes at least two proteins, a large isoform (TnaA) and a short isoform (TnaB). The TnaA protein has an SP-RING Zn finger, conserved in proteins from organisms ranging from yeast to human and thought to be involved in the

sumoylation of protein substrates. Besides the SP-RING finger, the TnaA protein also has extended homology with other eukaryotic proteins, including human proteins. We show that *tna* mutations also interact with mutations in additional subunits of the Brm complex, with mutations in subunits of the Mediator complex, and with mutations of the SWI2/SNF2 family ATPase gene *kismet*. We propose that Tna is involved in posttranslational modification of transcription complexes.

Key words: Homeotic gene regulation, *brahma*, Trithorax group, Sumoylation, Chromatin remodeling, SWI/SNF, *taranis*, *tonalli*, *Drosophila melanogaster*

INTRODUCTION

The trithorax and Polycomb group genes encode positive and negative factors required for the maintenance of homeotic gene expression (Francis and Kingston, 2001; Gellon and McGinnis, 1998; Kennison, 1995; Simon and Tamkun, 2002). Kennison and Tamkun (Kennison and Tamkun, 1988) first identified *brahma* (*brm*) as a trithorax group gene required for the maintenance of homeotic gene expression, but *brm* also regulates the expression or function of *engrailed* (Brizuela et al., 1994), *hedgehog* (Felsenfeld and Kennison, 1995), *wingless* (Collins and Treisman, 2000), and *E2F* (Stachling-Hampton et al., 1999). The Brm protein (Tamkun et al., 1992) is a SWI2/SNF2 family ATPase (Eisen et al., 1995). Brm is a subunit of a large protein complex that is a member of the SWI/SNF family of chromatin remodeling complexes (Papoulas et al., 1998). Several different mouse and human SWI/SNF complexes related to the Brm complex have been isolated and mutations of some subunits have revealed their roles in a variety of processes, including cell proliferation, differentiation, viral infection, and cancer (reviewed by Klochendler-Yeivin et al., 2002). In vitro studies show that SWI/SNF complexes can alter both nucleosome position and nucleosome conformation (reviewed by Flaus and Owen-Hughes, 2001; Vignali et al., 2000). The yeast SWI/SNF

complex is recruited to nucleosomes proximal to the promoter by transcriptional activators. This recruitment leads to localized nucleosome disruption. Retention of SWI/SNF complexes on the promoter requires either the continued binding of the transcriptional activator or the presence of acetylated histones (Cosma et al., 1999; Hassan et al., 2001). These changes facilitate the transcriptional activation or repression by gene-specific DNA-binding proteins. It is likely that the effects of SWI/SNF complexes will have important effects on inter-nucleosomal interactions that could have consequences for higher-order chromatin structure (Francis and Kingston, 2001).

Several trithorax groups genes in *Drosophila* encode proteins involved in chromatin remodeling, including *maira* (Brizuela and Kennison, 1997; Crosby et al., 1999), *snr1* (Dingvall et al., 1995; Rozenblatt-Rosen et al., 1998), *osa* (Collins et al., 1999; Collins and Treisman, 2000; Treisman et al., 1997; Vázquez et al., 1999), and *kismet* (Daubresse et al., 1999; Therrien et al., 2000). The Brm, Mor, and Snr1 proteins are probably part of a core complex that is required for chromatin remodeling activity, whereas other subunits probably regulate and/or target this activity (Collins et al., 1999; Kal et al., 2000; Papoulas et al., 1998).

In addition to chromatin remodeling complexes, the initiation of transcription in eukaryotes also requires the

function of several other large protein complexes that may act to either relieve repression or allow transcriptional activators to interact with RNA polymerase and other basal transcription factors. Among these other protein complexes, the Mediator and TATA-binding protein (TBP)-associated factors (TAFs) function as coactivators by relaying transcriptional activation signals from DNA-bound activators to the basal transcription machinery. The Mediator complex is found from yeast to human and functions as an interface between activators and RNA polymerase II to transduce regulatory information from enhancers to promoters. There is also some *in vitro* evidence to suggest that some specific Mediator subcomplexes act as transcriptional corepressors (Balciunas et al., 1999; Song and Carlson, 1998; Sun et al., 1998). In flies, the Mediator complex has been purified and its interactions with different promoters, sequence-specific transcription factors and basal transcription machinery has been characterized to some extent (Park et al., 2001). In addition, many subunits have been identified in the *Drosophila* genomic DNA sequence by their similarity to yeast or human Mediator subunits (Boube et al., 2000; Rachez and Freedman, 2001). The TRAP230 and TRAP240 subunits of the Mediator complex are encoded by the trithorax group genes: *kohtalo* (*kto*) (Treisman, 2001) and *skuld* (*skd*) [described as *blind spot* (*bli*) (Treisman, 2001) and *poils aux pattes* (*pap*) (Boube et al., 2000) (J. W. Southworth and J. A. Kennison, unpublished results)], *kto* and *skd* were first identified in the same genetic screen for regulators of homeotic genes as *brm* (Kennison and Tamkun, 1988).

In order to identify additional proteins that are required for the proper regulation of homeotic gene expression, we have screened for mutations that show genetic interactions with *brm* mutations in regulation of the *Antennapedia* (*Antp*) P2 promoter. We have previously described the isolation of mutations in the trithorax group gene *osa* in these screens (Vázquez et al., 1999). Here we report the isolation of mutations in two other genes, *taranis* (*tara*) and *tonalli* (*ma*). *tara* has been recently characterized as a new trithorax group gene required for homeotic gene expression (Calgaro et al., 2002; Fauvarque et al., 2001). In this work we show that *ma* is a novel trithorax group gene that is required to regulate the expression of the *Sex combs reduced* (*Ser*) and *Antp* homeotic genes. We also show that *ma* function is required at several developmental stages. The molecular characterization of two Tna protein isoforms reveals that *ma* could function in postranslational modification of chromatin-modifiers and/or transcriptional activator proteins.

MATERIALS AND METHODS

Fly strains

Flies were raised at 25°C on a yeast-sucrose-agar medium with either Nipagin or propionic acid or on a cornmeal-molasses-yeast-agar medium with Tegosept. Unless otherwise noted, all mutations and chromosome aberrations are described by Lindsley and Zimm (Lindsley and Zimm, 1992). *ma*¹, *tara*², and *tara*²⁰ are EMS-induced mutations recovered on the basis of the wings-out phenotype when transheterozygous to *brm*² (Vázquez et al., 1999). *tara*⁰³⁸⁸¹ is a P-element insertion allele. *ma*² [*P{PZ}1(3)r0751.075*], *ma*³ [*P{lacW}1(3)s0583/02*] and *ma*⁴ [*P{lacW}1(3)r0751.6731*] are P-element insertion alleles, that are lethal in combination with *ma*¹. The

EP(3)0374 is a *ma*⁴ line kindly provided by P. Rorth (Rorth et al., 1998). We will refer to *In(3R)Scr^{Msc}* simply as *Scr^{Msc}*.

Mutant phenotypes

The 'held-out wings' phenotype was scored if flies had both wings extended (Fig. 1A). For *Pc*³, *Pc*⁴, and *Scr^{Msc}*, the penetrance of the homeotic transformation was measured by the presence of ectopic sex comb teeth on the second and third legs of adult males. The expressivity of the homeotic transformation was determined by counting the number of ectopic sex comb teeth on the second and third legs and comparing it to control first legs, which have an average of 10.8 sex comb teeth per leg (Kennison and Russell, 1987). Wing extension, transformation of haltere to wing (Fig. 1B), and reductions in the numbers of sex comb teeth on the male first legs (Fig. 1C) were used to evaluate *Antp*, *Ultrabithorax* (*Ubx*) and *Scr* expressions, respectively.

Lethality of individuals carrying homozygous or heteroallelic combinations of *ma* alleles was determined by counting the *Tb*⁺ progeny from crosses between *ma* alleles balanced with *TM6B, Ilu* e *Th*.

Isolation of DNA from the *ma* genomic region

We identified three P-element insertion strains (*ma*², *ma*³ and *ma*⁴) that failed to complement *ma*¹ for viability. The insertion sites of these three P elements were mapped in contig Dm3049 (Adams et al., 2000) located in the 67F1-68A1 region. To isolate genomic DNA from the *ma* locus we carried out a standard plasmid rescue of genomic DNA adjacent to the P element from the *ma*² and *ma*³ strains (Sullivan et al., 2000). Both isolates were [³²P]dCTP-labeled and used as probes for Southern analyses of P1 clones from the 67F1-68A1 region. After standard restriction mapping and Southern hybridization of the positive P1 clones, we carried out further restriction mapping and Southern analysis of approximately 32 kb of the chromosomal region surrounding the *ma*² and *ma*³ insertion sites in the DS04626 P1 clone. Several fragments of this P1 clone were used as probes to analyze the transcripts from the *ma* genomic region and to screen cDNA libraries.

Nucleic acids analyses

To identify cDNAs representing the *ma* transcripts, we screened a cDNA library in the Uni-ZAP XR vector from 2- to 14-hour Canton-S embryos (Stratagene). Three positive clones were recovered and *in vivo* excised to isolate the phagemids containing the cloned insert. The largest cDNA clone (ZAP1 in Results, Fig. 3A) was sequenced to confirm its identity.

Several expressed sequenced tags (ESTs) were identified by identity searches carried out using the BLASTN and BLASTX programs (Altschul et al., 1997) as provided by the NCBI and BDGP databases. The cDNA clone LD16921 (from 0-22 h embryos) was reported with the nucleotide sequence from the 5' and 3' ends. With primers from these 5' and 3' sequences we amplified an RT-PCR fragment named PCR1 (see Fig. 3A). This fragment joins the most 5' untranslated exon to the Tna coding exons. PCR1 was amplified with the Expand High Fidelity polymerase (Roche) according to manufacturer's instructions with poly(A)⁺ RNA from 0-3-hour embryos, using as 5' and 3' 24mers primers with the sequences 5'CTGTCGCTTCTTCTTCTTCTTCTAC3' and 5'TGCCCTCGTAAC-CATTTCTGCTC3', respectively.

Southern and northern analyses were done as previously described (Vázquez et al., 1999). Five micrograms of poly(A)⁺ RNA from the indicated developmental stages were fractionated on a 1% agarose Mops/formaldehyde gel and transferred to a Hybond^{1M} N' nylon membrane (Amersham). RNA blots were probed with purified DNA fragments labeled with [³²P]dCTP by the random primer method (Prime-It II kit from Stratagene) and washed under conditions of high stringency (0.1× SSC, 0.1% sodium dodecyl sulfate, at 65°C).

We searched for *ma*-related proteins in the human genome using

the http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/ and Online Mendelian Inheritance in Man™ (McKusick, 2000) databases.

To identify the molecular lesion in the *ma*¹ mutant allele, we purified genomic DNA from individuals with the genotypes *ma*¹ *red e/Df(3L)vin2* or *ma*¹ *red e/Df(3L)vin2*. *Df(3L)vin2* is a chromosomal deletion that lacks the entire *ma* gene. The *ma* coding region was PCR amplified with Expand High Fidelity polymerase (Roche) using as 5' and 3' primers oligonucleotides with the sequences 5'ATGAACCA-GCAGGGCGGCTCCTCAAGGGCG3' and 5'CTAGTCGAATAAC-GTGGCCAGCAAGTCGT3', respectively. These primers amplify a 4.4 kb fragment with the entire *ma* open reading frame. One fragment from *ma*¹ and *ma*¹ (the wild-type chromosome in which the *ma*¹ mutation was induced) was sequenced in both strands and the sequences were compared. To verify the identity of the *ma*¹ mutation, a 578 bp fragment that includes the exon 5 genomic DNA (Fig. 4A) was amplified from five *ma*¹/*Df(3L)vin2* individuals using a 5' oligonucleotide with sequence from the end of exon 4 and a 3' oligonucleotide from the beginning of exon 6 as amplification primers. The sequences of these 5' and 3' primers are 5'GCTAT-GGTGGAGTCCGGAGGAG3' and 5'ATTCGTCGGAGACGGTGA-CGGTATG3', respectively. All five independently amplified 578 bp fragments contained the substitution of a cytosine for a thymidine that changes the glutamine codon at position 566 to a stop codon (Fig. 4C).

Germine clones

Germine mosaics were generated using the dominant female-sterile technique (Chou et al., 1993). *ma*¹, *ma*² and *ma*³ heterozygous females were mated to *w*; *Pf*w⁺, *ovo*^{D1}/*J*^{2X48}/*TM3*, *Sb* males and the progeny irradiated during the first larval instar (24-48 hours after egg laying) with 1000 rads of X-rays. Female offspring of the genotypes *+w*; *ma*¹ *red e/Pf*w⁺, *ovo*^{D1}/*J*^{2X48}, *+w*; *ma*² */Pf*w⁺, *ovo*^{D1}/*J*^{2X48} or *+w*; *ma*³ */Pf*w⁺, *ovo*^{D1}/*J*^{2X48} were crossed to males heterozygous for a *ma*¹ deficiency (*y w*; *Df(3L)xd6/TM6B, Hlu e Tb Dr*). Individuals produced by a female bearing a germ-line clone were dissected, mounted and examined under the light microscope.

RESULTS

tonalli and *taranis* enhance *brahma* mutant phenotypes

Flies heterozygous for some combinations of mutations in trithorax group genes have a held-out wings phenotype (Fig. 1A) that results from reduced expression of the *Antp* P2 promoter (Vázquez et al., 1999). On the basis of this phenotype we isolated several dominant enhancers of *brm*. Two of the new mutations are alleles of the trithorax group gene *taranis* (*tara*) (Fauvarque et al., 2001). These mutations, *tara*² and *tara*²⁰, show genetic interactions with multiple alleles of *brm*. In addition, we isolated one mutation in a novel gene that we named *tonalli* (*ma*). *tonalli* is 'fate' in náhuatl, an indigenous mexican language. We mapped *ma*¹ to polytene chromosome bands 67F3-4. Analyzing the available collection of P-element insertion lines from the BDGP we identified three P-element insertion strains [*Pf*{*PZ*}(3)*r1075*⁴⁰⁷⁵, *Pf*{*lacW*}(3)*s0583/02*, and *Pf*{*lacW*}(3)*r1075*^{1.6731}] that failed to complement *ma*¹. We will refer to these P-insertion mutations as *ma*², *ma*³ and *ma*⁴, respectively.

ma is a trithorax group gene

The *Antp* gene has two alternative promoters, P1 and P2. The *Antp*^{Ns} allele derepresses the *Antp* P2 promoter in the eye-antennal disc and expresses wild-type *Antp* transcripts from the

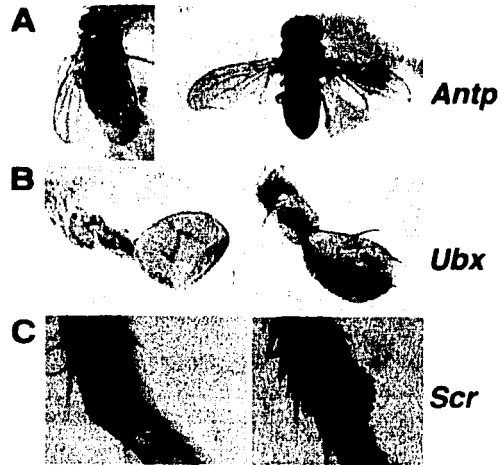


Fig. 1. *ma* mutant phenotypes mimic homeotic loss-of-function phenotypes. In all panels wild type is on the left and the mutant is on the right (A) The held-out wings phenotype of a *ma*¹/*brm*² double heterozygote indicative of loss of *Antp* P2 function. (B) The partial transformation of haltere to wing in a *ma*¹/*ma*⁴ mutant fly indicative of loss of *Ubx* function. (C) The reduction in the number of sex comb teeth on the first leg of a *ma*¹/*ma*⁴ mutant male indicative of loss of *Scr* function.

Antp promoter (Jorgensen and Garber, 1987; Talbert and Garber, 1994).

Derepression of the *Scr* gene causes the appearance of extra sex combs on the second and third legs of males. This derepression can be caused by gain-of-function alleles of *Scr*, such as *Scr*^{Msc} (reviewed by Southworth and Kennison, 2002), or by loss-of-function mutations in Polycomb group genes, such as *Pc*³ or *Pc*⁴.

Several trithorax group genes (including *brm*, *mor*, *osa*, *kis*, *skd* and *kto*) were first identified as suppressors of the extra sex combs phenotype caused by derepression of *Scr* or as suppressors of the antenna to leg transformation caused by derepression of *Antp* in the *Nasobemia* (*Ns*) allele of *Antp* and (Kennison and Tamkun, 1988). Since we identified the *ma* gene on the basis of genetic interactions with *brm*, we first tested whether *ma* mutations could also suppress these two homeotic derepression phenotypes. We found that all *ma* mutations strongly suppress the extra sex combs phenotype caused by *Pc*³, *Pc*⁴ or *Scr*^{Msc} (Table 1), but only weakly suppress the antenna to leg transformation caused by the *Antp*^{Ns} mutation (Table 2).

We also analyzed other *Antp* alleles affecting the expression from the P2 promoter. We have shown through this approach, that the P2 promoter expression is sensitive to *brm* and *osa* dosages (Vázquez et al., 1999). For example, *brm* and *osa* alleles enhance the held-out wings phenotypes caused by mutations affecting the *Antp* cis region located between the breakpoints of *In(3R)Antp*^b and *In(3R)Antp*^R aberrations. We tested for genetic interactions with all of the chromosome

Table 1. Effects of *tna* mutations on *Scr* homeotic derepression phenotypes induced by *Polycomb* and *Scr* mutations

Genotype	Transformed flies/total* (%)	Expressivity† (%)
+/ <i>Pc</i> ^d	37/40 (93)	14
<i>tna</i> ¹ / <i>Pc</i> ^d	8/20 (40)	4
+/ <i>Pc</i> ³	20/20 (100)	52
<i>tna</i> ¹ / <i>Pc</i> ³	16/20 (80)	6
<i>tna</i> ² / <i>Pc</i> ³	20/20 (100)	28
<i>tna</i> ³ / <i>Pc</i> ³	20/20 (100)	30
<i>tna</i> ⁴ / <i>Pc</i> ³	19/20 (100)	17
<i>tna</i> ⁵ / <i>Pc</i> ³	10/20 (50)	2
+/ <i>Scr</i> ^{Δbc}	20/20 (100)	23
<i>tna</i> ¹ / <i>Scr</i> ^{Δbc}	18/20 (90)	8
<i>tna</i> ² / <i>Scr</i> ^{Δbc}	19/20 (95)	7
<i>tna</i> ³ / <i>Scr</i> ^{Δbc}	16/17 (94)	9
<i>tna</i> ⁴ / <i>Scr</i> ^{Δbc}	19/20 (95)	6
<i>tna</i> ⁵ / <i>Scr</i> ^{Δbc}	0/20 (0)	0

*Numbers of male individuals showing sex comb teeth in the second and/or third leg.

†Expressivity was determined by counting the number of ectopic sex comb teeth on the second and third legs and comparing to control first legs with an average of 10.8 sex comb teeth each (100%).

^d*tna*¹ is *Df(3L)vin2*, a chromosomal deficiency for 67F2 to 68D6 that deletes the entire *tna* gene.

Table 2. Genetic interactions of *tna*¹ with *Antp* chromosomal aberrations that alter *Antp* P2 promoter function

Genotype	<i>Antp</i> ^{N3*}	<i>Antp</i> ^{73b*}	Flies with held-out wings/Total
+/+	236/249 (95)	253/253 (100)	—
<i>tna</i> ¹ /+	172/205 (84)	258/258 (100)	—
<i>tna</i> ² /+	41/47 (87)	53/53 (100)	—
<i>tna</i> ³ /+	13/75 (17)	46/46 (100)	—
<i>In(3R)Antp</i> ^h /+	—	—	5/62 (8)
<i>tna</i> ¹ / <i>In(3R)Antp</i> ^h	—	—	55/73 (75)
<i>In(3R)Antp</i> ^R /+	—	—	0/117 (0)
<i>tna</i> ¹ / <i>In(3R)Antp</i> ^R	—	—	84/130 (65)

*Numbers of individuals showing antenna to leg transformation divided by the total numbers of flies examined. The percentages are given after in parentheses.

¹*tna*¹ refers to *Df(3L)vin2*, a large deletion that removes the entire *tna* gene.

aberrations with breakpoints between the *Antp* P1 and P2 promoters that were previously used to test for interactions with *brm* and *osa* mutations (Vázquez et al., 1999). We found that *tna*¹ (but not the P element *tna* alleles) enhances the held-out wings phenotype when in combination with *In(3R)Antp*^h and *In(3R)Antp*^R lines (Table 2). We did not observe interactions with any of the other aberrations (data not shown). Thus, we conclude that as with *brm* and *osa*, there is a *tna*-sensitive region mapping between the 5' breakpoints of *In(3R)Antp*^h and *In(3R)Antp*^R.

tna, *tara*, *brm* and *osa* interact genetically

Since we isolated *tna* and *tara* mutations because they enhance the held-out wings phenotype of *brm*, we also looked for genetic interactions with *osa*, which is also required for *Antp* P2 function (Vázquez et al., 1999). We tested the EMS-induced

Table 3. Genetic interactions of *tna* and *tara* with some trithorax group genes

Genotype	Numbers of flies with held-out wings/Total	% Penetration
+/ <i>tna</i> ¹	19/115	17
+/ <i>tna</i> ³	0/120	0
+/ <i>tara</i> ²	0/129	0
+/ <i>tara</i> ²⁰	0/151	0
+/ <i>tara</i> ⁰³⁸⁸¹	9/184	5
<i>brm</i> ² /+	9/498	2
<i>brm</i> ² / <i>tna</i> ¹	43/43	100
<i>brm</i> ² / <i>tna</i> ³	0/100	0
<i>brm</i> ² / <i>tara</i> ²	7/31	23
<i>brm</i> ² / <i>tna</i> ³ <i>tara</i> ²	12/20	60
<i>brm</i> ² / <i>tara</i> ²⁰	3/37	8
<i>brm</i> ² / <i>tna</i> ³ <i>tara</i> ²⁰	40/53	75
<i>brm</i> ² / <i>tara</i> ⁰³⁸⁸¹	1/165	<1
<i>brm</i> ² / <i>tna</i> ³ <i>tara</i> ⁰³⁸⁸¹	21/71	30
<i>osa</i> ¹ /+	6/208	3
<i>osa</i> ¹ / <i>brm</i> ²	100/100	100
<i>osa</i> ¹ / <i>tna</i> ¹	35/35	100
<i>osa</i> ¹ / <i>tna</i> ³	0/69	0
<i>osa</i> ¹ / <i>tara</i> ²	41/57	72
<i>osa</i> ¹ / <i>tara</i> ²⁰	36/48	75
<i>osa</i> ¹ / <i>tara</i> ⁰³⁸⁸¹	33/105	31
<i>osa</i> ¹ / <i>tna</i> ³ <i>tara</i> ⁰³⁸⁸¹	22/59	37
+/ <i>tna</i> ³ <i>tara</i> ⁰³⁸⁸¹	0/137	0
<i>tna</i> ¹ / <i>tara</i> ²	36/36	100
<i>tna</i> ¹ / <i>tara</i> ²⁰	27/31	87
<i>tna</i> ¹ / <i>tara</i> ⁰³⁸⁸¹	106/123	80
<i>mor</i> ¹ / <i>tna</i> ¹	82/139	59
<i>mor</i> ² / <i>tna</i> ¹	97/123	79
<i>snr</i> ¹⁰³¹⁹ / <i>tna</i> ¹	41/120	34
<i>kis</i> ^{1.3416} / <i>tna</i> ¹	67/108	62
<i>kis</i> ¹ / <i>tna</i> ¹	75/137	55
<i>skd</i> ² / <i>tna</i> ¹	74/103	72
<i>skd</i> ^{L7062} / <i>tna</i> ¹	135/175	77
<i>skp</i> ^{K760} / <i>tna</i> ¹	107/219	49
<i>ktol</i> ¹ / <i>tna</i> ¹	41/120	34
<i>Trap8</i> ^{Pr2956} / <i>tna</i> ¹	41/152	27

For *mor*¹, *mor*², *snr*¹⁰³¹⁹, *kis*^{1.3416}, *kis*¹, *skd*², *skd*^{L7062}, *skp*^{K760}, *ktol*¹ or *Trap8*^{Pr2956} data from the controls (the same genotypes as in the table but lacking the *tna*¹ mutation) were not included, since no flies with the held-out phenotype were observed. At least 100 flies were examined for each control genotype.

alleles, *tna*¹, *tara*² and *tara*²⁰, and the P-element insertion alleles, *tna*³ and *tara*⁰³⁸⁸¹, for genetic interactions with *brm*, *osa*, and with each other (Table 3). We found that all three EMS-induced alleles interact strongly with *brm*², but that the two P-element insertion alleles do not show strong genetic interactions. The P-element insertion alleles do show genetic interactions with *brm*² in flies heterozygous for mutations in all three genes (*brm*, *tna* and *tara*). These results suggest that the P-insertion alleles are weaker than the EMS-induced alleles. We observed similar results previously with *brm* and *osa* (Vázquez et al., 1999). It is possible that the P-insertion mutations are not null alleles, but it is also possible that the EMS-induced alleles make mutant proteins that behave as dominant-negative mutations, still binding to interacting protein complexes and competing for binding of the wild-type alleles. All of the *tna* and *tara* mutations (except the P-insertion allele *tna*³) show strong genetic interactions with *osa*¹ (Table 3). All three *tara* alleles interact strongly with *tna*¹, with *tara*² showing the strongest interactions.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

tna interacts genetically with mutations in subunits of the Brm complex, the Mediator coactivator complex and with the Kismet SWI2/SNF2 family ATPase

Several members of the trithorax group proteins are subunits of chromatin remodeling or coactivator complexes. The Brm protein is the SWI2/SNF2-family ATPase subunit of the Brm chromatin remodeling complex (Tamkun et al., 1992). The trithorax group genes *mor*, *osa* and *snr1* encode other subunits of the Brm complex (Brizuela and Kennison, 1997; Collins et al., 1999; Collins and Treisman, 2000; Crosby et al., 1999; Dingwall et al., 1995; Kal et al., 2000; Papoulas et al., 1998; Rozenblatt-Rosen et al., 1998; Treisman et al., 1997; Vázquez et al., 1999). The *kismet* (*kis*) gene encodes another trithorax group SWI2/SNF2-family member and is probably the ATPase subunit of a different chromatin remodeling complex (Daubresse et al., 1999; Therrien et al., 2000). It is thought that chromatin remodeling complexes may interact physically with the basal transcription machinery, with transcriptional coactivators or corepressors, or with proteins involved in histone modification, such as acetyl-transferases and deacetylases. One of the transcriptional coactivator complexes with which chromatin remodeling complexes might interact is the Mediator complex (Rachez and Freedman, 2001). The *kohtalo* (*kto*), *skuld* (*skd*), and *Trap80* trithorax group genes encode subunits of the Mediator coactivator complex (Kennison and Tamkun, 1988; Boube et al., 2000; Treisman, 2001) (J. W. Southworth and J. A. K., unpublished results).

We tested whether *tna* mutations could genetically interact with mutations in the trithorax group genes encoding subunits of the Brm or Kis chromatin remodeling complexes or the Mediator coactivator complex to give the same held-out wings phenotype that we observed in the *brm1+; osa1+* transheterozygous combinations (Vázquez et al., 1999). We also looked for genetic interactions between *tna* and several other trithorax group mutations that probably do not encode subunits of the Brm, Kis or Mediator complexes. The results are shown in Table 3. We found that *tna1* shows strong genetic interactions with some mutations in the Brm complex (*brm2*, *osa1*, *mor1* and *mor2*), with *kis* mutations (*kis1* and *kis13416*), and with some mutations in the Mediator complex (*skd2*, *skd1L7062* and *skd1K760*). There were no strong interactions with the *snr10319* mutation in the Brm complex or the *kto1* and *Trap80²⁹⁵⁶* mutations in the Mediator complex. We also observed no strong genetic interactions with *ash21*, *trx1*, *trx00347*, *urt2* or *sls1* trithorax group mutations (data not shown).

The zygotic and maternal functions of *tna*

Transheterozygous combinations among *tna1*, *tna2*, *tna3* and *tna4* alleles result in death at the third instar larval, pupal or pharate adult stages. Heteroallelic pharate individuals (dissected from the pupal cases) present transformations typical of loss-of-function of the Antennapedia and Bithorax complex homeotic genes (Table 4). In some cases, we observed partial haltere to wing transformation that results from loss of function for the *Ultrabithorax* (*Ubx*) homeotic gene (Fig. 1B). In 100% of the male flies we observed a strong reduction in the number of bristles in the male sex comb (the sex comb teeth) (Fig. 1C). This is the phenotype observed in partial loss of function in the *Scr* homeotic gene. Thus, we found that the

Table 4. Homeotic transformations in pharate adult *tna* mutants

Genotype	Number of flies with transformed tissue/Total (%)	
	First leg* (<i>Scr</i>)	Haltere† (<i>Ubx</i>)
<i>tna1/tna2</i>	33/34 (97)	33/74 (45)
<i>tna1/tna3</i>	33/40 (83)	36/80 (45)
<i>tna1/tna4</i>	36/36 (100)	47/74 (64)
<i>tna2/tna3</i>	24/24 (100)	0/24 (0)
<i>tna2/tna4</i>	30/30 (100)	3/64 (5)
<i>tna3/tna4</i>	40/40 (100)	1/80 (1)

*Transformed tissue in the first leg measured by the reduction in numbers of sex comb teeth. A wild-type first leg has an average of 10.8 sex comb teeth, while most of the *tna* mutant males had only 5-7 sex comb teeth per leg.
†Transformed wing tissue in the haltere.

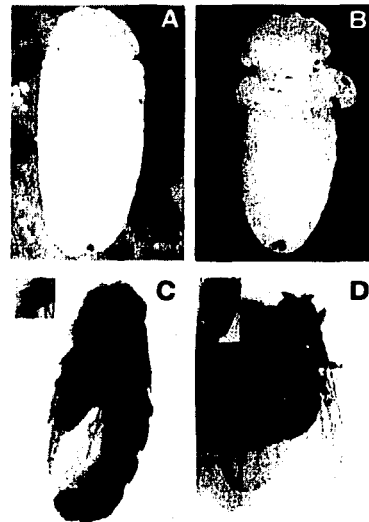


Fig. 2. Phenotypes from maternal loss of *tna* function. Prepupa (A) and young pupa (B) that lack both maternal and zygotic *tna* functions. These individuals are *tna1/D(3L)Xsd6 [tna-]* and very few individuals reach the pharate adult stage without paternal rescue. One of the males that reached the pharate adult stage is shown in C. The first leg has a smaller sex comb with fewer sex comb teeth (inset in C) suggesting a reduction in *Scr* function. (D) A *tna1/+* male that lacked maternal *Tna* function but was rescued by the paternally-inherited wild-type allele. The paternally rescued males have sex combs with normal numbers of sex comb teeth (inset in D).

tna zygotic function is required for proper expression of at least three homeotic genes, *Antp*, *Ubx*, and *Scr*.

At least 50% of the *tna* mutant transheterozygotes (and 85% for some heteroallelic combinations) reach the pupa stage. This late stage of lethality suggests that maternal *tna* function might be sufficient for early development. To determine if this is so we generated homozygous germ cells for the *tna1*, *tna2* and *tna3* alleles. We used mitotic recombination and a transgene

carrying the dominant female-sterile mutation *ovo^{D1}* (Chou et al., 1993) to produce embryos that lacked wild-type maternal *ma* functions. The same results were obtained with all three *ma* alleles and individuals representative of this experiment are shown in Fig. 2. When both maternal and zygotic *ma* functions are lacking, most individuals die as third instar larvae. For *ma¹*, a few mutant individuals reach late developmental stages (Fig. 2A-C) if they lack both maternal and zygotic *ma* functions. These pharate individuals have fewer sex comb teeth in the

male first legs (Fig. 2C) and show a haltere to wing transformation. In contrast, if only the zygotic function is lacking (and the maternal function is normal), the *ma* mutants die, predominantly as pupae. Individuals with no maternal *ma* can be completely rescued by a wild-type allele inherited from the father, giving rise to normal (and fertile) adults (Fig. 2D). Thus, we can conclude from these experiments that there is maternal *ma* contribution but the zygotic function is sufficient to reach late developmental stages, at least with the three alleles that we have tested.

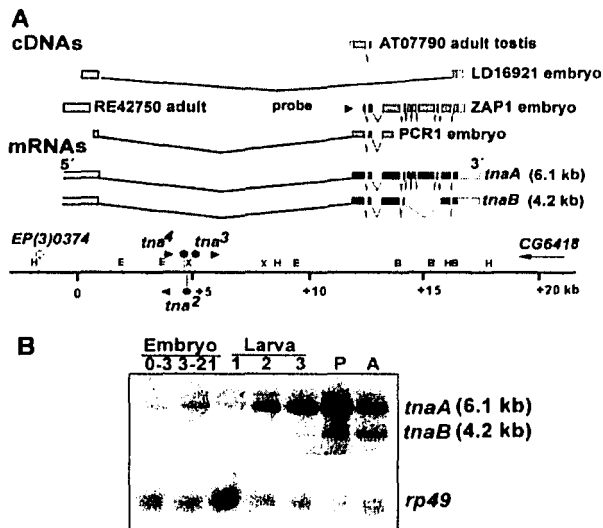


Fig. 3. Molecular organization and developmental expression of the *ma* locus. (A) The *ma* genomic region is represented at the bottom of the panel. The *ma⁻* P-element insertion sites are indicated by gray circles. The arrows by the insertions represent the orientation of the respective P-element with respect to the *ma* transcription direction. The *ma¹* EP0374 insertion site is shown as a white circle. The restriction sites are: B, *Bam*HI; X, *Xba*I; E, *Eco*RI; H, *Hind*III. CG6418 is an RNA helicase transcribed towards the 3' end of the *ma* locus. The transcripts (mRNAs) are depicted in the middle of the panel. The BDGP, release 2-predicted transcripts containing the translated exons (black rectangles for shared, grey rectangles for the non-shared exons between *maA* and *maB*) are shown. We have added the 5' untranslated exon and the 3' poly(A)⁺ regions (white rectangles) deduced from our analysis of the locus. The 5' UTR exon is open on the left to indicate that the *ma* transcription initiation start site has not been determined. The indicated sizes of both transcripts are in agreement with the northern analysis shown in B. The upper part A (cDNAs) shows representative cDNAs isolated from the *ma* locus. AT07790 is one of several ESTs identified in adult testis. RE42750 is an EST from adult heads. The ZAP1 embryo cDNA clone was isolated from the UNI-ZAP library from 0-12-hour embryos (see Material and Methods) and was the probe for the northern blot shown in B. The PCR1 embryo cDNA clone was RT-PCR amplified with 5' and 3' primers sequences from the reported LD16921 embryonic clone (see Material and Methods). (B) RNA poly(A)⁺ was prepared from 0-3-hour and 3-21-hour embryos (0-3 and 3-21), first, second and third instar larvae (L1, L2, L3), pupae (P) and adults (A). Samples were blotted and run under standard conditions. The blot was probed with the ZAP1 cDNA (A). The blot was washed and rehybridized using a probe for *rp49* as a loading control. The sizes of the detected bands are indicated.

Molecular analyses of *tna*

The closest *ma¹* insertion line, EP(3)0374 (Fig. 3A, open circle), has an EP element 6 kb upstream of the *ma⁻* P-element insertion sites (Fig. 3A, full circles). Thus, at least part of the gene could be between the *ma⁻* P and *ma¹* EP element insertion sites.

To isolate genomic DNA from the *ma* region we selected P1 clone DS04626, which includes the genomic DNA flanking the sites of the *ma²*, *ma³* and *ma⁴* P-element insertions. We did a chromosomal walk from DS04626 and tested several genomic probes to identify putative *ma* transcripts (data not shown). The *ma⁻* insertion sites are within the first large intron of an annotated gene, CG7958. We will present the evidence below that CG7958 is *ma*, but we will first describe our efforts to characterize the structure and limits of the transcription unit (Fig. 3A). There is another gene (CG6418, which may encode an RNA-binding protein) about 1.8 kb downstream of the last exon of *ma*. The 3' end of the *ma* transcription unit should be within this 1.8 kb region. Although there is an annotated gene (CG12523) about 60 kb upstream of the predicted 5' exon of *ma*, the first predicted gene (CG6449) for which there is EST evidence is about 160 kb upstream of *ma*. Although the *ma* promoter should be somewhere within this large genomic region, we have not yet identified the transcriptional start site. There is one P-element insertion available within this large region, EP(3)0374, which is about 1.6 kb upstream of the predicted *ma* 5' exon. This P-element insertion complements the *ma* mutations, i.e., it is *ma¹*.

Our northern analyses identified two transcripts (6.1 and 4.2 kb in size) within the *ma* region, which derive by alternative splicing (see below). To characterize the structure of these transcripts, we isolated cDNA clones from an embryonic library. ZAP1, which is the longest, is shown in Fig. 3A. We also characterized cDNA clones from the BDGP. The BDGP clone LD16921, which was isolated from a 0- to 24-hour mixed stage embryonic library, was particularly useful and is also shown in Fig. 3A. We were able to amplify several RT-PCR fragments using, as a 5' primer, an oligonucleotide with the 5'LD16921 sequence and as 3' primers oligonucleotides with the sequence of diverse translated *ma* exons (see Materials and Methods). One of these fragments, PCR1, is a cDNA made from poly(A)⁺ RNA purified from 3-24-hour embryos. To corroborate its identity it was cloned and sequenced (Fig. 3A). There are at least two alternative untranslated 5' exons. The 5' exon of the embryonic LD16921 cDNA clone (and the adult cDNA

clones RE42750 and RE27454) differs from the 5' exon found in several testis ESTs (AT07790, Fig. 3A). There is also alternative splicing within the translated exons (described in detail below).

The *tonalII* transcripts are differentially expressed during development

We performed northern blot analyses with RNA samples purified from different developmental stages using the ZAP1 cDNA clone (Fig. 3A) as a probe. This clone was isolated from a λ ZAP embryonic library and overlaps all of the *ma* translated exons. We found two signals (6.1 and 4.2 kb) (Fig. 3B) that correspond to major *ma* transcripts. The 6.1 kb transcript was present at all stages, but its expression increased at the second larval instar and reached its maximum in the pupal stage. The 4.2 kb transcript was first detected in third instar larvae, but it was most abundant in the pupal and adult stages.

One of the Tna protein isoforms belongs to an SP-RING Zn-finger domain family

The northern and sequence analyses of *ma* predict at least two alternative transcripts (CT41698 and CT23982 from BDGP, release 2) (Fig. 3A, mRNAs) encoding products of 1109 and 610 residues (Fig. 4A). The long form of the protein (TnaA) is translated from 10 coding exons and may have three different amino termini (CG7958-RA, -RB and -RC, BDGP, release 3). The mRNA for the short form (TnaB) lacks exons 5-8 and part of exon 9. Both proteins have similar amino termini, which have two Gln-rich regions, but they do not share the same carboxyl termini; the alternative splicing of the short form generates a frameshift that changes the open reading frame after the alternative splice (Fig. 4A). This frameshift generates a stop codon in the middle of exon 9.

Exon 7 is present only in TnaA and encodes a possible bipartite nuclear location signal and an SP-RING (Siz/PIAS-RING) (Hochstrasser, 2001) putative zinc finger (Fig. 4, see below).

Blast analyses of the TnaA protein sequence allowed us to identify four regions (Fig. 4A). Region I and IV (residues 1-494, and residues 799-1109, respectively) do not show homology to any other reported protein in any organism. Region I contains two blocks of glutamine residues.

Region III (647-798) includes the SP-RING finger (residues 718-760), which is present in several proteins from organisms ranging from yeast to human (Fig. 4B). One family of SP-RING finger proteins are the PIAS [protein inhibitor of activated STAT (signal transducer and activator of transcription)] family. One of the PIAS proteins, Miz1 (ARIP3/PIASX α) (Wu et al., 1997) has also been identified as a cofactor of homeotic gene function in mice. In the *Drosophila* genome, the only other SP-RING finger proteins are ZimpA and ZimpB (zinc finger-containing, Miz1, PIAS3-like) (Mohr and Boswell, 1999). The Zimp proteins belong to the PIAS family and are encoded by the *Sit(var)2-10* locus (Hari et al., 2001). Region III also includes the putative bipartite nuclear location signal (residues 668-686, Fig. 4C).

Although there are many proteins with similarities to Regions II (residues 495-646) or III (residues 647-798), there are only a few proteins that have similarity to both. These include proteins from the mouse (EST B6863016), *Xenopus*

laevis (EST BJ075201), *Gallus gallus* (EST AJ396794), *Caenorhabditis elegans* (predicted protein NM_069604), *Arabidopsis thaliana* (AB011483), and human (K1AA1224 and K1AA1886). The two human proteins (retinoic acid-induced K1AA1224, EMBL AB033050, and K1AA1886, GenBank source AL136572) are 60% identical to TnaA in a region spanning almost 300 residues (from TnaA residues 495 to 798) (Fig. 4A,C). We searched the OMIM database (McKusick, 2000) but did not find any associated diseases attributed to mutations in the K1AA1224 (10q23.2) and K1AA1886 (7p15.1) genes to date. This family of proteins differs from the PIAS family in having Region II. We believe that the 300 amino acid domain spanning both Regions II and III identifies a new signature that we have named the XSPRING (eXtended SP-RING finger) domain (Fig. 4A,C).

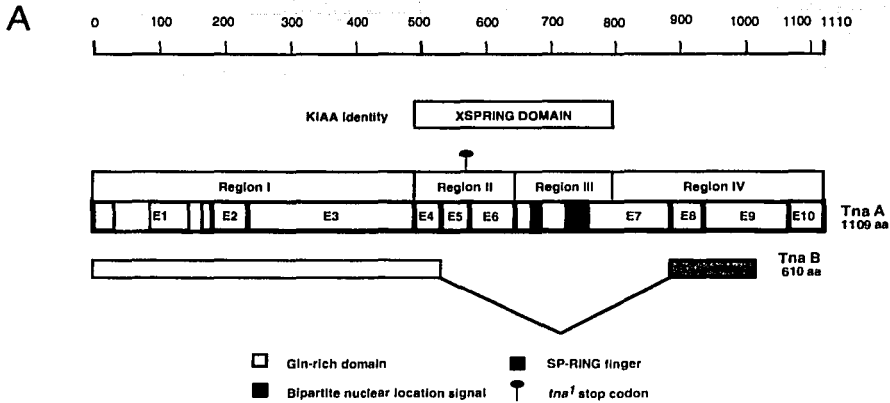
The TnaB form shares regions I and II with TnaA, but has a unique carboxyl terminus. It does not show any additional homology to other known or predicted proteins.

The *tna¹* allele carries a mutation that affects only the TnaA protein product

The *ma* locus produces at least two different proteins, TnaA and TnaB. We are interested in characterizing the functions of each one of these forms and in dissecting more accurately whether the *ma* mutant phenotypes are caused by the failure of one or both Tna proteins. Individuals with the EMS-induced *ma¹* allele have different phenotypes from those resulting from the P-element insertion alleles (*ma²*, *ma³* and *ma⁴*). *ma¹* is the allele that interacts strongest with several trithorax group mutations to reduce *Antp* P2 function and cause a held-out wings phenotype (Fig. 1A, Tables 2 and 3). The *ma¹* allele is also the allele that shows the strongest loss-of-function *Ubx* phenotype (Fig. 1B, Table 4) when heterozygous with the P-element insertion alleles or the deletions. Thus, we characterized molecularly the nature of the mutation in *ma¹* (see Materials and Methods). We purified DNA from *ma¹/Df(3L)vin2* individuals that survive until third instar larvae, PCR amplified, and sequenced the *ma¹* genomic region. We found only one change within the entire open reading frame of the *ma¹* mutant chromosome, a transition (C to T) that changes glutamine 566 (Fig. 4C) to a stop codon. This change would generate a truncated product at the end of exon 5 (Fig. 4A) that will resemble the amino-terminal region of the TnaB protein without its carboxyl terminus. These data suggest that *ma¹* should affect only TnaA, with TnaB still functional. The truncation of the TnaA protein may be responsible for the phenotypes we observe with the *ma¹* allele. The fact that this truncated form resembles the amino terminus of the wild-type TnaB, together with the *ma¹* genetic data, leads us to suggest that TnaB cannot substitute for TnaA. As TnaB mRNA appears for the first time late in development, the role of TnaB could be to negatively modulate the TnaA function.

DISCUSSION

To study the mechanism of action of the Brm complex on different homeotic genes, we have characterized genes that interact with Brm in regulating the expression of the *Antp* P2 promoter in the imaginal wing disc. Reduced expression of the *Antp* P2 promoter in the imaginal wing disc causes flies to



B

	718	760	779
TnaA	SLKCPITKSRIRLPARGHECKHVQCFDLEAYLMINSERGSWRCPECKSAITDTLEIDQYIWAII		
KIAA1224	SLKCPITFRRIQLPARGHDCRHVQCFDLESYLQNCERGTWRCPVNKTALLEGLEVDQYMWGIL		
KIAA1886	SLKCPITFRRIQLPARGHDCRHVQCFDLESYLQNCERGTWRCPVNKTALLEGLEVDQYMWGIL		
Su (var)	SLNCPGLGKMKMLPCRASTCSHLQCFDASLYLQMNERRKPTWNCVCDKFAIYDNLVIDGYFQEV		
Miz1	SLMCPGLGKMRLLTPCRAVTCSTHLQCFDAALYLQMNERRKPTWNCVCDKFAIYDNLVIDGYFQEV		
PIAS1	SLLCPLGKMRLLTPCRAVTCSTHLQCFDAALYLQMNERRKPTWNCVCDKFAIYDNLVIDGYFQEV		
KCh	SLMCPGLGKMRLLTPCRAVTCSTHLQCFDAALYLQMNERRKPTWNCVCDKFAIYDNLVIDGYFQEV		
PIAS3	SLMCPGLGKMRLLTPCRAVTCSTHLQCFDAALYLQMNERRKPTWNCVCDKFAIYDNLVIDGYFQEV		
PIASy	SLLCPLVMKRLSVPCEAETCAHLQCFDAALYLQMNERRKPTWNCVCDKFAIYDNLVIDGYFQEV		
CEW10D5	SLLDPLCKTRMTTPSRCQDCTHLQCFDLSYLMNERRKPTWNCVCDKFAIYDNLVIDGYFQEV		
VIC1A	SLNCPISFTRI KTFVGRSCRHVQCFDFDNFKINSKRKRPWCPCPNQVSYTEIRLDRNMI EIL		
SEP-INT	PASVQSVNATPLTIERG-DKSTHKKPLHLKVCQPORNTIQITVACCCSHLFLVLGLVHRPVSRLVQGLLKKRLLPAAICITIKKRFSSVAASA		
NFI1/SIZ2	SLQCPISCTRMKYPSKINCKHLQCFDALNFLHSQSOVPTWCQPCIQHPIDFQDLKSEFVDNII		
SIZ1	SLQCPISVTRMKYPSKINCKHLQCFDALNFLHSQSOVPTWCQPCIQHPIDFQDLKSEFVDNII		
	SL.cpl.k.r...P.r...CkHLQCFda...l.....ptw.CPvc.k.a.y..l.id.....il		

C

	451	495	518
Tona11	SHQCFYKNSQGSNMQQAKRCRACGAGAVATTONPQKQYQYQHSFPVQGNPTPLTPACSV-PY		
KIAA1224	ANPNRPLTSPNYIQGRNPSQSSQGYDPTVIMVQYFYKPGFQGNPTYSUSSYSSTSSQGVNRPVWPVYARYHSVPVQGNPTPLTPACSV-PY		
KIAA1886	ANPNRPLTSPNYIQGRNPSQSSQGYDPTVIMVQYFYKPGFQGNPTYSUSSYSSTSSQGVNRPVWPVYARYHSVPVQGNPTPLTPACSV-PY		
	566	595	
SP	PD KP	E RLTFYVRDG L PFL HNL VSNRV L V TL R DLEQ KC H DRQGN	
Tona11	VEPN-----PDIKPMDNSE-----EMRLTFYVRDGIILAPFRLHNLVSNRVVHLKQVVTPLMWDLEQKCFHODRQGN		
KIAA1224	LEPSQDYQPFYFDFKPMALPHFASRHHQ--ELRLTFYVRDGVLEKFFRLHNLVSNRVVHLKQVVTPLMWDLEQKCFHODRQGN		
KIAA1886	HEPQVYKSPFLPDLKPLNLSHSSSSGQCEKRLTFYVRDGVLEKFFRLHNLVSNRVVHLKQVVTPLMWDLEQKCFHODRQGN		
	692	692	
Tona11	P V VS NATPL IER NT L LK VQPORNT Q T CCCCCHLFLVLGLVHRPVSRLVQ L K LLP EH KIKRN S		
KIAA1224	PASVQSVNATPLTIERG-DKSTHKKPLHLKVCQPORNTIQITVACCCSHLFLVLGLVHRPVSRLVQGLLKKRLLPAAICITIKKRFSSVAASA		
KIAA1886	PASVQSVNATPLTIERG-DKSTHKKPLHLKVCQPORNTIQITVACCCSHLFLVLGLVHRPVSRLVQGLLKKRLLPAAICITIKKRFSSVAASA		
	789		
Tona11	Q K SLKCPIT RI LPARGH C H QCFDLE YLM N ERG WRCP C K A LE DQY IL S E		
KIAA1224	QPDATPQQQQQQCCGQAKISLKCPITKSRIRLPARGHDCRHVQCFDLEAYLMINSERGSWRCPECKSAITDTLEIDQYIWAII		
KIAA1886	IP-GTPIWDEQVQTAIKVSLKCPITFRRIQLPARGHDCRHVQCFDLESYLQNCERGTWRCPVNKTALLEGLEVDQYMWGIL		
	884		
Tona11	ID W P	D	GR84
KIAA1224	IYDSSAMRLOHRCQMPNAPPSNVPNPSGSGNSGSGSNVPLPVRQELCDDI-AKMSFGSTLPTWASQAQMSNPHDMSIASGQNM		
KIAA1886	TIDPTCWRPVPVFKSDIKKIDPDI PSKREYTHSPQMIMSNVDEHIALGQGPSY-PLPFPQ-T-----NSDYSI--GQNY		
	972		
Tona11	G G G	EK	N
KIAA1224	GQGNQGNHQRNNSYKFGSGNDGSGGLGGKAVNSLQGLNAMEKSLSDQ----MPHTHTPQAAHMPHT--CGPVSVSSHMEPISGQTP		
KIAA1886	QGHGTFDFPHNGIGTSMHDMH--GPPULSHIYDMFNMAA--LEKLSH-PHQETNPHAGSSDQ--HPSIQGLVPHIPSSGPPPLHSGA		
	1066		
Tona11	PS G	L	
KIAA1224	NANGSGATNSGQNN--SSTGNSIYQTPGT-PSRQCGQGGSGNADSQQQQEQILNLSMSSQTKLKFESDLSAELQSDAAAAAINDTAIDLNL		
KIAA1886	PPPPSQPRPQPAAPSHSHSLDTFN--PSSALEQAGAKASDMPFSI--PFAI-----NSDNDLLSLEH		
	1109		
Tona11	L P E LSYL P PDL P N DDLL		
KIAA1224	LQDVD-PHEILSYLDPQDPLTIPFSGSSNMSADLLATLFD		
KIAA1886	LPELTHPDELLSYLDP-PDL--PS-----NSDNDLLSLEH		

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Fig. 4. The Tonalli proteins. (A) The two alternatively spliced forms predicted by the BDGP, release 2, are shown. In the upper part is a scale that indicates the amino acid residues. In the TnaA protein the exons are indicated as E. E1 to E4 are exons shared between the TnaA and the TnaB forms. The glutamine rich domains are indicated by lightly shaded boxes. The bipartite nuclear location signal is indicated by the hatched box. The SP-RING finger is indicated by a black box. The TnaB carboxyl termini is indicated by the grey box and is different from the one in TnaA. The XSPRING domain, which is present in the human KIAA proteins and in proteins in other organisms, is indicated by the box above the proteins. (B) Multiple alignment of the SP-RING finger region in different proteins. KIAA1224 and KIAA1886 human proteins (accession numbers in Results); Su(var), *D. melanogaster* Su(var)2-10/ZimpA/B (gb/AAD29287.1); Miz1, (Mx-interacting-zinc finger) from mouse (gb/AAB96678.1); PIAS1 from mouse (gb/AAC36702.1); KCh, K⁺ channel-associated protein from rat (gb/AAC40114.1); PIAS3 from mouse (dbj/BAA78533.1); PIASy from human (gb/AAC36703.1); CEW10D5 predicted protein from *C. elegans* (pir/T26331); VICIA, *Vicia faba* transcription factor (pir/T12184); SER-INT, a *Schizosaccharomyces pombe* homologue (pir/T37748) of *Saccharomyces cerevisiae* Siz proteins; NFI/SIZ2, CDC12 and septin-interacting protein in *S. cerevisiae* (gb/AAA86121.1); SIZ1, septin-interacting protein from *S. cerevisiae* (pir/S69691). The bottom line is the identical (in uppercase letters) and most common (lowercase) residues in all sequences. (C) Multiple alignment of *Drosophila* TnaA, human KIAA1224, and human KIAA1886 XSPRING domains (495-798). The glutamine 566 that changes for a stop codon in *ma¹* is indicated by the residue number. The bipartite nuclear location signal residues are underlined. The SP-RING finger residues are indicated with asterisks. Consensus sequence of the same amino acid present in the three proteins is indicated.

extend their wings out from the body (a held-out wings phenotype). While flies heterozygous for a null *brm* allele usually hold their wings properly, they often extend their wings when also heterozygous for *brm*-interacting mutations. We have previously used this genetic screen to isolate mutations in the *osa* gene (Vázquez et al., 1999), which encodes a subunit of the Brm chromatin remodeling complex. Here we report the isolation of mutations in two additional *brm*-interacting genes, *tara* and *tna*. *tara* is pleiotropic and has been identified in several other genetic screens (e.g. Fernandez-Funez et al., 2000). Of particular importance to our own results was the recent identification of *tara* as a dominant suppressor of the extra-sex-combs phenotype displayed by loss-of-function mutations in the Polycomb group gene *polyhomeotic* (Fauvarque et al., 2001) and its modification of phenotypes associated with ectopic expression of the homeotic gene *proboscipedia* (*pb*) (Calgaro et al., 2002). The published results, as well as the results presented here, suggest that *tara* and *tna* are both members of the trithorax group of homeotic gene regulators.

tara encodes twin proteins, Tara- α and Tara- β , which have a cyclinA-binding motif (also present in the cell cycle regulatory transcription factors E2F1-3), a SERTA domain [which is the largest conserved region among TRIP-Br (transcriptional regulator interacting with the PHD-bromodomain) proteins] and a PHD-bromo interaction domain (Calgaro et al., 2002). Trip-Br1/p34^{SEI-1} is a Tara-related protein in mice that is a cyclin-dependent kinase regulator (Sugimoto et al., 1999) and a transcriptional regulator. Trip-Br1/p34^{SEI-1} can interact with PHD and/or bromodomains

(Hsu et al., 2001). It has been proposed that this family of proteins could link the cell cycle with chromatin remodeling (Sugimoto et al., 1999).

Individuals with low dosages of *tara* (Calgaro et al., 2002) or *tna* (this work) have a held-out wings phenotype. As we have isolated *tara* mutations because they interact genetically with *brm* mutations, the simplest hypothesis is that Tara proteins physically interact with Brm proteins through the Brm bromodomain.

One Tna protein isoform is related to the PIAS family

Analysis of *tna* ESTs shows that there are at least two different 5' ends (represented by RE42750 and AT07790), suggesting that the *tna* gene may have alternative promoters. The *tara* gene also appears to have two promoters (Calgaro et al., 2002). In addition to the possibility of two promoters, alternative splicing within the *tna* open reading frame gives rise to at least two different protein isoforms, TnaA and TnaB.

The TnaA isoform has an SP-RING (Siz/PIAS RING) finger (Saurin et al., 1996), which is present in the PIAS [protein inhibitor of activated STAT (signal transducer and activator of transcription)] family of proteins. PIAS proteins are co-regulators of many gene-specific transcription factors. For example, PIAS proteins co-repress STAT factors (which act as signal transducers of cytokine receptors) to transcriptionally activate specific target genes (Chung et al., 1997; Liu et al., 1998). PIAS proteins also coactivate steroid receptor-dependent transcription (Kotaja et al., 2000; Tan et al., 2000). The PIAS protein Miz1/ARIP3/PIAS α possesses intrinsic transcriptional-activating function (Kotaja et al., 2000), interacts with the homeobox protein Msx2 to enhance its affinity for DNA (Wu et al., 1997) and is an androgen receptor (AR)-interacting protein (ARIP). The *Drosophila zimp* (zinc finger-containing, Miz1, PIAS3-like) gene encodes proteins with similarity to the Miz1/PIAS3 protein (Mohr and Boswell, 1999). The *zimp* gene is also known as *Su(var)2-10* (Hari et al., 2001). In addition to the SP-RING zinc finger domain, the Su(var)2-10 proteins have a putative DNA-binding domain (the SAP domain) that is found in diverse nuclear proteins. The Su(var)2-10 proteins regulate chromosome structure and chromosome condensation, and function in interphase nuclei (Hari et al., 2001). Recently a SUMO-protein ligase (E3) activity has been found in several SP-RING finger proteins (Johnson and Gupta, 2001; Sachdev et al., 2001) (reviewed by Hochstrasser, 2001).

tna and a role for sumoylation in regulating homeotic gene expression

SUMO (small ubiquitin-related modifier) is a ubiquitin-like protein (UBL) that is covalently attached to other proteins in a manner analogous to that of ubiquitin (reviewed by Muller et al., 2001). Conjugation of SUMO-1 to all protein targets requires the E1-activating heterodimer Aos1/Uba2 and the single E2-conjugating Ubc9 enzyme. The target specificity is conferred by the SUMO E3 ligases. There are at least two types of SUMO E3 ligases that are structurally unrelated. The first type is represented by the PIAS family of SP-RING finger proteins. The second type is represented by RanBP2, a nuclear pore complex protein. TnaA has an SP-RING finger within the larger XSPRING domain (Fig. 4B). The XSPRING domain is present in a new group of human, mouse and *Arabidopsis*

proteins and may be the signature for a new subgroup of SUMO E3 ligases within the PIAS family.

Although the role of sumoylation is not clear, it has been suggested that sumoylation could be an address tag for protein targeting. Most of the identified substrates of sumoylation are nuclear proteins, and the sumoylated forms are often found in specific subnuclear protein complexes. Preferential accumulation sites for sumoylated proteins are the PML nuclear bodies. PML, a protein found in PML nuclear bodies, is a RING-finger protein. Another core component of PML nuclear bodies is Sp100, a protein that interacts with HP1 and HMGI/2 families and a major cellular substrate for sumoylation. *In vitro*, sumoylated Sp100 has a higher affinity for the HP1 protein (Seeler et al., 2001). Relocalization of proteins to nuclear bodies after sumoylation can modulate transcriptional activity (Fogal et al., 2000; Ishov et al., 1999; Lechembre et al., 2001; Li et al., 2000; Schmidt and Muller, 2002). It has been suggested that nuclear bodies might stimulate SUMO conjugation, and that proteins transiently associated with nuclear bodies include SUMO targets (Muller et al., 2001). Thus, sumoylation can modulate the interaction of transcription factors with transcriptional coregulators. In *Drosophila*, the transcriptional repressor Tramtrack 69 protein (Ttk69), which inhibits neuronal differentiation, has been identified as a SUMO substrate (Lechembre et al., 2000). The Dorsal protein also undergoes sumoylation, which facilitates its nuclear import (Bhaskar et al., 2000).

The SUMO ligation target consensus sequence is Ψ KxE (where Ψ is an aliphatic residue) surrounding the substrate lysine(s) that is sumoylated. Although this consensus sequence is short, all of the proteins encoded by the trithorax group genes that interact genetically with *ma* (including TnaA itself) (Table 3) have one or more blocks of this consensus sequence (L. G. and M. V., unpublished results). However, some trithorax group genes that do not interact with *ma*, such as *trithorax* (*trx*), also encode proteins with the 'sumoylation consensus'. Sumoylation of the HDAC4 deacetylase is catalysed by the RanBP2 SUMO E3 ligase. While HDAC4 has several 'sumoylation consensus' sequences, only one functions *in vitro* and *in vivo* (Kirsh et al., 2002). The possibility that subunits of the Brm and/or Kismet complexes might be targets for sumoylation opens the window for a new level of regulation of the activity of chromatin remodeling complexes. This level of regulation could involve the modification of their subnuclear localization within the nucleus, although mutation of the SUMO acceptor site in HDAC4 did not change its subcellular distribution (Kirsh et al., 2002). Alternatively, is that sumoylation could target the homeotic function itself or its cofactors.

Another possible role for sumoylation is as an antagonist of ubiquitylation. Ubiquitylation is a key regulator of transcription (reviewed by Conaway et al., 2002) and it has been suggested that sumoylation could be an inhibitor of ubiquitylation. The RING (reviewed by Jackson et al., 2000) and PHD (Lu et al., 2002) fingers have been described in proteins that have E3 ubiquitin ligase activities. In that sense it is intriguing that Trip-Brl (the *tara* homolog in mice) (Hsu et al., 2001) was identified because it binds the PHD-bromodomain of Krip1/TIF1 β which also has an RBCC (RING finger- β boxes-goiled goil) RING finger (Saurin et al., 1996). Krip1/TIF1 β has a dual role because it has been described as

a corepressor of a subset of Krüppel-type zinc finger proteins (Witzgall et al., 1994) and as a hormone-dependent coactivator that interacts with several nuclear hormone receptors (Chang et al., 1998; Le Douarin et al., 1996). Mutations in a ubiquitin-conjugating enzyme (UbcD1) have been shown to affect homeotic gene silencing (Fauvarque et al., 2001). Since *ma* mutations affect homeotic gene activation, antagonism between the ubiquitylation and sumoylation post-translational modifications may play a key role in homeotic gene regulation. Antagonism of ubiquitylation and targeting nuclear sublocalization are not mutually exclusive roles for sumoylation, and it is possible that both will be found to have roles in regulating the functions of chromatin remodeling and/or transcriptional co-activator complexes.

We thank Y. Hiroimi for his advice on the plasmid rescue, C. Thummel and P. Rorth for providing P1 clones and EP lines, and the Bloomington *Drosophila* Stock Center for providing stocks. This work was supported by funds from CONACyT grant No. 31781-N and DGAPA grant IN-200799 to M. V. and Howard Hughes Medical Institute grant 55003712 to M. Z.

REFERENCES

- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F. et al. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**, 2185-2195.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-3402.
- Balcinuit, D., Galman, C., Ronne, H. and Bhorklund, S. (1999). The Med1 subunit of the yeast mediator complex is involved in both transcriptional activation and repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 376-381.
- Bhaskar, V., Valentine, S. A. and Courey, A. (2000). A functional interaction between dorsal and components of the Smt3 conjugation machinery. *J. Biol. Chem.* **275**, 4033-4040.
- Boube, M., Faucher, C., Joulla, L., Cribbs, D. L. and Bourbon, H. M. (2000). *Drosophila* homologs of transcriptional mediator complex subunits are required for adult cell and segment identity specification. *Genes Dev.* **14**, 2906-2917.
- Brizuela, B. J., Elfring, L., Ballard, J., Tamkun, J. W. and Kennison, J. A. (1994). Genetic analysis of the *brahma* gene of *Drosophila melanogaster* and polytene chromosome subdivisions 72A3. *Genetics* **137**, 803-813.
- Brizuela, B. J. and Kennison, J. A. (1997). The *Drosophila* homeotic gene *noira* regulates expression of engrailed and HOM genes in imaginal tissues. *Mech. Dev.* **65**, 209-220.
- Calgano, S., Boube, M., Cribbs, D. L. and Bourbon, H. (2002). The *Drosophila* gene *taraxis* encodes a novel trithorax group member potentially linked to the cell cycle regulatory apparatus. *Genetics* **160**, 547-560.
- Chang, C.-J., Chen, T.-L. and Lee, S.-C. (1998). Coactivator TIF1 β interacts with transcription factor C/EBP β and glucocorticoid receptor to induce α 1-acid glycoprotein gene expression. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 5880-5887.
- Chou, T. B., Noll, E. and Perrimon, N. (1993). Autosomal P[*ovaD1*] dominant female-sterile insertions in *Drosophila* and their use in generating germ-line chimeras. *Development* **119**, 1359-1369.
- Chung, C. D., Liao, J., Liu, B., Rao, X., Jay, P., Bertha, P. and Shuai, K. (1997). Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science* **278**, 1803-1805.
- Collins, R. T., Furukawa, T., Tanese, N. and Treisman, J. E. (1999). Osa associates with the Brahma chromatin remodeling complex and promotes the activation of some target genes. *EMBO J.* **18**, 7029-7040.
- Collins, R. T. and Treisman, J. E. (2000). Osa-containing Brahma chromatin remodeling complexes are required for the repression of Wingless target genes. *Genes Dev.* **14**, 3140-3152.
- Conaway, R. C., Brower, C. S. and Conaway, J. W. (2002). Emerging roles of ubiquitin in transcription regulation. *Science* **296**, 1254-1258.

- Cosma, M. P., Tanaka, T. and Nasmyth, K. (1999). Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle- and developmentally regulated promoter. *Cell* 97, 299-311.
- Crosby, M. A., Miller, C., Alon, T., Watson, K. L., Verrijzer, C. P., Goldman-Levi, R. and Zak, N. B. (1999). The trithorax group gene *moira* encodes a Brahma-associated putative chromatin-remodeling factor in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell Biol.* 19, 1159-1170.
- Daubresse, G., Deuring, R., Moore, L., Papoulas, O., Zakrajsek, I., Waldrip, W. R., Scott, M. P., Kennison, J. A. and Tamkun, J. W. (1999). The *Drosophila kismet* gene is related to chromatin-remodeling factors and is required for both segmentation and segment identity. *Development* 126, 1175-1187.
- Dingwall, A. K., Beck, S. J., McCallum, C. M., Tamkun, J. W., Kalpana, G. V., Goff, S. P. and Scott, M. P. (1995). The *Drosophila snr1* and *Brm* proteins are related to yeast SWI/SNF proteins and are components of a large protein complex. *Mol. Biol. Cell* 6, 777-791.
- Eisen, J. A., Sweder, K. S. and Hanawalt, P. C. (1995). Evolution of the SNF2 family of proteins: subfamilies with distinct sequences and functions. *Nucleic Acids Res.* 23, 2715-2723.
- Fauvarque, M. O., Laurenti, P., Boivin, A., Bloyer, S., Griffin-Shea, R., Bourbon, H. M. and Dura, J. M. (2001). Dominant modifiers of the polyhomeotic extra-sex-combs phenotype induced by marked P element insertional mutagenesis in *Drosophila*. *Genet. Res.* 78, 137-148.
- Felsenfeld, A. L. and Kennison, J. A. (1995). Positional signaling by hedgehog in *Drosophila* imaginal disc development. *Development* 121, 1-10.
- Fernandez-Funez, P., Niño-Rosales, M. L., de Gouyon, B., She, W. C., Luchak, J. M., Martinez, P., Turlegano, E., Benito, J., Capovilla, M., Skinner, P. J. et al. (2000). Identification of genes that modify ataxin-1-induced neurodegeneration. *Nature* 408, 101-106.
- Flaus, A. and Owen-Hughes, T. (2001). Mechanisms for ATP-dependent chromatin remodelling. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11, 148-154.
- Fogal, V., Gostissa, M., Sandy, P., Zecchi, P., Sternsdorf, T., Jensen, K., Pandolfi, P. P., Will, H., Schneider, C. and del Sal, G. (2000). Regulation of p53 activity in nuclear bodies by a specific PML isoform. *EMBO J.* 19, 6185-6195.
- Francis, N. J. and Kingston, R. E. (2001). Mechanisms of transcriptional memory. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 409-421.
- Gellon, G. and McGinnis, W. (1998). Shaping animal body plans in development and evolution by modulation of *Hox* expression patterns. *BioEssays* 20, 116-125.
- Hari, K. L., Cook, K. R. and Karpen, G. H. (2001). The *Drosophila Su(var)2-10* locus regulates chromosome structure and function and encodes a member of the PIAS protein family. *Genes Dev.* 15, 1334-1348.
- Hassan, A. H., Neely, K. E. and Workman, J. L. (2001). Histone acetyltransferase complexes stabilize SWI/SNF binding to promoter nucleosomes. *Cell* 104, 817-827.
- Hochstrasser, M. (2001). SP-RING for SUMO: new functions bloom for a ubiquitin-like protein. *Cell* 107, 5-8.
- Hsu, S. I. H., Yang, C. M., Sim, K. G., Hentschel, D. M., O'Leary, E. and Bonventre, J. V. (2001). TRIP-B: a novel family of PHD zinc-finger- and bromodomain-interacting proteins that regulate the transcriptional activity of E2F-1/DP-1. *EMBO J.* 20, 2273-2285.
- Ishov, A. M., Sotnikov, A. G., Negorev, D., Vladimirova, O. V., Neff, N., Kamitani, T., Yeh, E. T., Strauss, J. F. r. and Maul, G. G. (1999). PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein Daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1. *J. Cell Biol.* 147, 221-234.
- Jackson, P. K., Eldridge, A. G., Freed, E., Furstenthal, L., Hsu, J. Y., Kaiser, B. K. and Reimann, J. D. (2000). The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol.* 10, 429-439.
- Johnson, E. S. and Gupta, A. A. (2001). An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins. *Cell* 106, 735-744.
- Jørgensen, E. M. and Garber, R. L. (1987). Function and misfunction of the two promoters of the *Drosophila Antennapedia* gene. *Genes Dev.* 1, 544-555.
- Kal, A. J., Mahmoudi, T., Zak, N. B. and Verrijzer, C. P. (2000). The *Drosophila* Brahma complex is an essential coactivator for the trithorax group protein zeste. *Genes Dev.* 14, 1058-1071.
- Kennison, J. A. (1995). The Polycomb and trithorax group proteins of *Drosophila*: trans-regulators of homeotic gene function. *Annu. Rev. Genet.* 29, 289-303.
- Kennison, J. A. and Russell, M. A. (1987). Dosage-dependent modifiers of homeotic mutations in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 116, 75-86.
- Kennison, J. A. and Tamkun, J. W. (1988). Dosage-dependent modifiers of *Polycomb* and *Antennapedia* mutations in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 8136-8140.
- Kirsh, O., Seeler, J. S., Pichler, A., Gast, A., Muller, S., Miska, E., Mathieu, M., Harel-Bellan, A., Kouzarides, T., Melchior, F. et al. (2002). The SUMO E3 ligase RanBP2 promotes modification of the HDAC4 deacetylase. *EMBO J.* 21, 2682-2691.
- Klochender-Yeivin, A., Muchardt, C. and Yaniv, M. (2002). SWI/SNF chromatin remodeling and cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 73-79.
- Kotaja, N., Aittomaki, S., Silvennoinen, O., Palvimo, J. J. and Janne, O. A. (2000). ARIP3 (androgen receptor-interacting protein 3) and other PIAS (protein inhibitor of activated STAT) proteins differ in their ability to modulate steroid receptor-dependent transcriptional activation. *Mol. Endocrinol.* 14, 1986-2000.
- Le Douarin, B., Nielsen, A. L., Garnier, J.-M., Ichinose, H., Jeanmougin, F., Losson, R. and Chambon, P. (1996). A possible involvement of TIF1 α and TIF1 β in the epigenetic control of transcription by nuclear receptors. *EMBO J.* 15, 6701-6715.
- Lechambre, F., Badenhorst, P., Muller, S., Travers, A., Schweisguth, F. and Dejean, A. (2000). Covalent modification of the transcriptional repressor tramtrack by the ubiquitin-related protein Smt3 in *Drosophila* flies. *Mol. Cell Biol.* 20, 1072-1082.
- Lechambre, F., Muller, S., Pandolfi, P. P. and Dejean, A. (2001). Regulation of Pax3 transcriptional activity by SUMO-1-modified PML. *Oncogene* 20, 1-9.
- Li, H., Leo, C., Zhu, J., Wu, X., O'Neil, J., Park, E. J. and Chen, J. D. (2000). Sequestration and inhibition of Daxx-mediated transcriptional repression by PML. *Mol. Cell Biol.* 20, 1784-1796.
- Lindsley, D. L. and Zimm, G. G. (1992). The genome of *Drosophila melanogaster*. San Diego, Calif.: Academic Press.
- Liu, B., Liao, J., Rao, X., Kushner, S. A., Chung, C. D., Chang, D. D. and Shuai, K. (1998). Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 10626-10631.
- Lu, Z., Xu, S., Joazeiro, C., Cobb, M. H. and Hunter, T. (2002). The PIID domain of MEK1 acts as an E3 ubiquitin-ligase and mediates ubiquitination and degradation of ERK1/2. *Mol. Cell* 9, 945-956.
- McKusick, V. A. (2000). Online Mendelian Inheritance in Man, OMIMTM. (ed. McKusick-Nathans) Institute for Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD) and National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, MD).
- Mohr, S. E. and Boswell, R. E. (1999). *Zimp* encodes a homologue of mouse Miz1 and PIAS3 and is an essential gene in *Drosophila melanogaster*. *Gene* 229, 109-118.
- Muller, S., Hoegge, C., Pyrowolakis, G. and Jentsch, S. (2001). SUMO, ubiquitin mysterious cousin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 202-210.
- Papoulas, O., Beck, S. J., Moseley, S. L., McCallum, C. M., Sarte, M., Shearn, A. and Tamkun, J. W. (1998). The *Drosophila* trithorax group proteins BRM, ASH1 and ASH2 are subunits of distinct protein complexes. *Development* 125, 3955-3966.
- Park, J. M., Gim, B. S., Kim, J. M., Yoon, J. H., Kim, H. S., Kang, J. G. and Kim, Y. J. (2001). *Drosophila* Mediator complex is broadly utilized by diverse gene-specific transcription factors at different types of core promoters. *Mol. Cell Biol.* 21, 2312-2323.
- Rachez, C. and Freedman, L. P. (2001). Mediator complexes and transcription. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 274-280.
- Rorth, P., Szabo, K., Bailey, A., Laverty, T., Rehm, J., Rubin, G. M., Wigmann, K., Milan, M., Benes, V., Ansong, W. et al. (1998). Systematic gain-of-function genetics in *Drosophila*. *Development* 125, 1049-1057.
- Rozenthal-Rosen, O., Rozobskaita, T., Burakov, D., Sedkov, Y., Tillib, S., Blechman, J., Nakamura, T., Croce, C. M., Maza, A. and Canaani, E. (1998). The C-terminal SET domains of ALL-1 and Trithorax interact with In1 and Snr1 proteins, components of the SWI/SNF complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 4152-4157.
- Sachdev, S., Bruhn, L., Sieber, H., Pichler, A., Melchior, F. and Grosschedl, R. (2001). PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies. *Genes Dev.* 15, 3088-3103.
- Saurin, A. J., Borden, K. L. B., Boddy, M. N. and Freemont, P. S. (1996). Does this have a familiar RING? *Trends Biochem. Sci.* 21, 208-214.
- Schmidt, D. and Muller, S. (2002). Members of the PIAS family act as SUMO ligases for c-Jun and p53 and repress p53 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 2872-2877.

- Seeler, J. S., Marchio, A., Losson, R., Desterro, J. M., Hay, R. T., Chambon, P. and Dejean, A. (2001). Common properties of nuclear body protein SP100 and TIF1alpha chromatin factor: role of SUMO modification. *Mol. Cell Biol.* **21**, 3314-3324.
- Simon, J. A. and Tamkun, J. W. (2002). Programming off and on states in chromatin: mechanisms of Polycomb and trithorax group complexes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**, 210-218.
- Song, W. and Carlson, M. (1998). Srb/mediator proteins interact functionally and physically with transcriptional repressor Sn1. *EMBO J.* **17**, 5757-5765.
- Southworth, J. W. and Kennison, J. A. (2002). Transvection and silencing of the *Sex combs reduced* homeotic gene of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **161**, 733-746.
- Stachling-Hampton, K., Ciampa, P. J., Brook, A. and Dyson, N. (1999). A genetic screen for modifiers of E2F in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **153**, 275-287.
- Sugimoto, M., Nakamura, T., Ohtani, N., Hampson, L., Hampson, I. N., Shimamoto, A., Furuchi, Y., Okumura, K., Niwa, S., Taya, Y. et al. (1999). Regulation of CDK4 activity by a novel CDK4-binding protein, p34(SEI-1). *Genes Dev.* **13**, 3027-3033.
- Sullivan, W., Ashburner, M. and Hawley, R. S. (2000). *Drosophila Protocols*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sun, X., Zhang, Y., Cho, H., Rickert, P., Lees, E., Lane, W. and Reinberg, D. (1998). NAT, a human complex containing Srb polypeptides that functions as a negative regulator of activated transcription. *Mol. Cell* **2**, 213-222.
- Talbert, P. B. and Garber, R. L. (1994). The *Drosophila* homeotic mutation *Nasobemia* (*Antp^{NS}*) and its revertants: and analysis of mutational reversion. *Genetics* **138**, 709-720.
- Tamkun, J. W., Deuring, R., Scott, M. P., Kissinger, M., Pattatucci, A. M., Kaufman, T. C. and Kennison, J. A. (1992). *brahma*: a regulator of *Drosophila* homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Cell* **68**, 561-572.
- Tan, J., Hall, S. H., Hamil, K. G., Grossman, G., Petrusz, P., Liao, J., Shual, K. and French, F. S. (2000). Protein Inhibitor of Activated STAT-1 (Signal Transducer and Activator of Transcription-1) is a nuclear receptor coregulator expressed in human testis. *Mol. Endocrinol.* **14**, 14-26.
- Therrien, M., Morrison, D. K., Wong, A. M. and Rubin, G. M. (2000). A genetic screen for modifiers of a kinase suppressor of Ras-dependent rough eye phenotype in *Drosophila*. *Genetics* **156**, 1231-1242.
- Treisman, J. (2001). *Drosophila* homologues of the transcriptional coactivation complex subunits TRAP240 and TRAP230 are required for identical processes in eye-antennal disc development. *Development* **128**, 603-615.
- Treisman, J. E., Luk, A., Rubin, G. M. and Heberlein, U. (1997). *eyelid* antagonizes *wingless* signaling during *Drosophila* development and has homology to the Bright family of DNA-binding proteins. *Genes Dev.* **11**, 1949-1962.
- Vázquez, M., Moore, L. and Kennison, J. A. (1999). The trithorax-group gene *osa* encodes an ARID-domain protein that interacts with the Brahma chromatin-remodeling factor to regulate transcription. *Development* **126**, 733-742.
- Vignali, M., Hassan, A. H., Neely, K. E. and Workman, J. L. (2000). ATP-dependent chromatin remodeling complexes. *Mol. Cell Biol.* **20**, 1899-1910.
- Witzgall, R., O'Leary, E., Leaf, E., Ónalde, D. and Bonventre, J. V. (1994). The Krüppel-associated box-A (KRAB-A) domain of zinc finger proteins mediates transcriptional repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 4514-4518.
- Wu, L., Wu, H., Sangiorgi, F., Wu, N., Bell, J. R., Lyons, G. E. and Maxson, R. (1997). Miz1, a novel zinc finger transcription factor that interacts with Msx2 and enhances its affinity for DNA. *Mech. Dev.* **65**, 3-17.

**The RNA polymerase II 140^{wimp} mutant and mutations in the TFIID subunit XPB,
differentially affects homeotic gene expression in *Drosophila melanogaster*.**

Luis Gutiérrez¹, Carlos Merino¹, Martha Vázquez, Enrique Reynaud and Mario Zurita*.
Department of Developmental Genetics and Molecular Physiology. Instituto de
Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca Morelos 62250,
México.

Keywords: TFIID; Homeotic genes; Transcription; RNA polymerase

***Corresponding author:**

M. Zurita

Tel: 52-555-6227359

FAX: 52-777-172388

Email: marioz@ibt.unam.mx

Contract Grant Sponsors: Howard Hughes Medical Institute, CONACyT and
Papiit/UNAM.

¹These authors contributed equally to this work

Summary: Mutations in the XPB and XPD helicases of the DNA repair/transcription factor TFIIH are involved in several human genetic disorders. An unanswered problem concerning the complexity of the phenotype-genotype relationship is why mutations in TFIIH produce specific phenotypes and not many others? In order to investigate this question we are using *Drosophila* as model. In *Drosophila* mutations in the XPB homologue, *haywire* (*hay*), mimic some of the manifestations observed in humans. In this work, we report that in addition to these phenotypes, mutations in *hay* and in the 140 kDa subunit of the RNA polymerase II (*RpIII40^{wimp}*) act as dominant modifiers of the derepression of the *Sex combs reduced* (*Scr*) and *Ultrabithorax* (*Ubx*) genes. In addition, *RpIII40^{wimp}* also generates typical loss of function phenotypes of *Ubx*. Interestingly contrary to *RpIII40* mutant alleles, *hay* alleles only affects the derepression of *Scr* in the context of the *Antp^{Scr}* mutation but not other *Scr* derepression phenotypes like *Polycomb* loss function. On the other hand, all the derepression backgrounds are also sensitive to the total reduction of transcription levels by growth the flies with actinomycin D. We also show that different promoter control regions have differential sensitivity to different *hay* alleles. All these results supports that even that TFIIH is a basal transcription factor, mutations in *hay* have a more specific effect in the transcription of some genes than others.

INTRODUCTION.

General transcription factors (TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF and TFIIH) function in intimate association with the RNA polymerase II (RNA pol II) recognising the promoter, forming the open complex and allowing transcriptional elongation (Butler and Kadonaga, 2002). Some of these factors are composed of several subunits that interact not only among themselves, but also with other transcription factors required to activate specific genes during cell differentiation, in particular situations of space and time (Dvir *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2000). In addition, the interaction between the basal transcriptional machinery with the mediator and complexes involved in chromatin remodelling has also been documented (Boube *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2002; Pokholok *et al.*, 2002). Interestingly, recent evidence indicates that the RNA pol II core promoter can interpret

regulatory information (for review see Butler and Kadonaga, 2002; Blackwood and Kadonaga, 2002). Thus, there is a complicated cross talk between the different players involved in the synthesis of mRNA. Based on this information, it has been proposed that all the different steps in RNA pol II transcription can be interconnected from the beginning to the end (Orphanides and Rainberg, 2002).

On the other hand, it has been shown that mutations that affect components of the transcription initiation and elongation machinery can cause genetic diseases in humans. The most documented transcriptional diseases are the ones caused by defects in the TFIIF factor. TFIIF is composed by nine polypeptides that are part of two subcomplexes. The core complex contains six subunits (XPB, XPD, p62, p52, p44 and p34) whereas the cyclin-activating- kinase complex contains three (Cdk7, CycH and MAT1). However the XPD helicase interacts *in vitro* with either of the two subcomplexes (Egly, 2000). The core of TFIIF is also part of the Nucleotide Excision Repair (NER) machinery and it has been recently reported that it may also participate in Base Excision Repair (BER) (Le Page *et al.*, 2000).

During transcription, the helicase activity of TFIIF is involved in the formation of the open complex. The kinase activity of TFIIF phosphorylates the CTD domain of the polymerase allowing transcriptional elongation (Gerber *et al.*, 1995). Mutations in either the XPB or XPD genes can produce three hereditary human disorders known as xeroderma pigmentosum (XP), patients with a combined symptoms of Xeroderma pigmentosum and Cockayne syndrome (XP/CS) and Trichothiodystrophy (TTD) (Lehmann 1998; Lehmann 2001). Interestingly, the clinical manifestations of patients with different mutations in XPD or XPB are allele-dependent (Lehmann, 1998; de Boer and Hoeijmakers, 1999; Nance and Berry, 1992; Cleaver, 2000; Rolig and McKinnon, 2000; Lehmann, 2001).

It has been proposed that some of the manifestations observed in XP, CS and TTD patients are caused by deficiencies in transcription (Itin and Pittelkow, 1990). Since TFIIF is a basal transcription factor and since mutations in it cause transcriptional defects, the following intriguing questions emerge: how is it possible to have viable organisms with mutations in TFIIF components that affect general RNA pol II transcription? And why different alleles produce specific phenotypes and not others?

One possible explanation is that depending on the nature of the mutant allele, an incorrect interaction of TFIIH with specific factors affects the transcription of some particular genes. A second possibility, that does not exclude the first one, is that in these mutants general transcriptional levels are affected revealing specific phenotypes caused by the reduction of products from genes that require the highest levels of transcription (Botta *et al.*, 2002; Lehmann, 2002; Keriell *et al.*, 2002; Zurita and Merino, 2003).

In *Drosophila*, mutations in the gene *haywire* (*hay*), the *Drosophila* XPB homologue, mimic some of the phenotypes observed in humans (Mounkes *et al.*, 1992). An advantage for the study of *hay*, has been the existence of the conditional allele *hay^{nc2}*. *hay^{nc2}* is semilethal as homozygous and was initially identified as antimorphic by its dominant enhancer interaction with mutants in a gene that encodes a testis specific tubulin (*B2t*) (Regan and Fuller, 1988). Other *hay* alleles were isolated as revertants of *hay^{nc2}* by their inability to interact with *B2t* (Regan and Fuller, 1988), however, most of these alleles do not act as revertants in other *hay* functions (Merino *et al.*, 2002). Some *hay* heteroallelic combinations are viable and produce adults which have evident phenotypes caused by transcriptional defects that affect the cuticle and the macro and microchaetae (Merino *et al.*, 2002). On the other hand, it has been shown that mutations in some subunits of the RNA pol II have specific effects in genes that are developmentally regulated, including the *Ultrabithorax* gene (Mortin *et al.*, 1988; Mortin, 1990; Mortin *et al.*, 1992). Of particular interest for this work is a mutation in the *Drosophila* 140 RNA pol II subunit, named *RpIII40^{wimp}*. *RpIII40^{wimp}* is an allele that has a dominant maternal effect on some segmentation genes but not in others. It has been suggested that the locus selectivity of the *wimp* mutant reflects promoter specific mechanisms of transcriptional activation (Parkhurst and Ish-Horowitz, 1991). In this work, we report that in addition to the defects previously reported for mutations in *hay*, some *hay* alleles are suppressors of the *Sex combs reduced* gain of function mutation *Antp^{Scx}*, but not of *Scr^{Msc}* or *Polycomb* mutants. On the contrary *RpIII40^{wimp}* is strong suppressor of these three *Sex combs reduced* gain of function mutants. On the other hand both *hay* and *RpIII40^{wimp}* modify *Ubx* derepression phenotypes. In addition, *RpIII40^{wimp}* also enhance typical *Ubx* loss of function phenotypes. Interestingly, the non-specific inhibition of global transcription caused by actinomycin D also suppresses all of the

reported derepression phenotypes. Finally, we found that the transcriptional phenotype of *hay* mutations reflects differences among the regulatory regions of a particular gene. These results support the idea that, although the reduction of global transcription by mutations in *hay* can participate in the generation of specific phenotypes, there is a locus selectivity by different mutations that affect TFIID.

RESULTS AND DISCUSSION.

Effects of *haywire* alleles and *RpIII140*^{wimp} on *Sex comb reduced* derepression mutations.

Screens for dosage-dependent modifiers of dominant homeotic genes have been used to identify genes involved in the determination of segment identity. For example, the derepression of *Scr* in cells that form the second and third thoracic legs causes these cells to differentiate into structures of the first leg. A characteristic row of bristles called "sex combs" is present only in the first thoracic pair of legs in an adult wild type male. The appearance of ectopic sex comb teeth on the second and third legs can be caused by gain of function alleles of *Scr* (eg. *Scr*^{Msc} and *Antp*^{Scx}) or by loss of function mutations in the Polycomb group genes (eg. *Pc*³) (Duncan and Kaufman, 1975; Kennison and Tamkum, 1988; Lewis, 1980; Simon and Tamkum, 2002). This is also the case for the *Antp* gene which is transcribed from two alternative promoters, P1 and P2. The *Antp*^{Ns} allele derepresses the *Antp* P2 promoter in the eye-antennal disc causing an antenna to leg transformation in these cells (Talbert and Garber, 1994). Several of the trithorax genes mutations (trx-G) were identified as suppressors of *Antp* and *Scr* phenotypes (Kennison and Tamkum, 1988). In order to evaluate the role of individual subunits TFIID and RNA pol II on the expression of the homeotic genes, we set out to compare the ability of *hay* and *RpIII140* alleles to suppress *Pc*³, *Scr*^{Msc}, *Antp*^{Scx}, and *Antp*^{Ns} mutations. We found that all the *RpIII140* alleles suppress the extra sex combs phenotype caused by *Scr*^{Msc}, *Antp*^{Scx} and *Pc*³ (Figure 1, Table 2,) at least as much as other trx-G mutations (Gutiérrez et al., 2003). On the other hand, the *hay*^{nc2} and *hay*^{nc2rv4} alleles were weak suppressors of the *Antp*^{Scx} phenotype, but not for *Pc*³ (Figure 1, Table 2). It has been suggested that the

Antp^{Scx} mutation interferes with a possible pairing-dependent mechanism to repress *Scr* expression (Southworth and Kennison, 2002). Not any *hay* and *RpIII40* alleles suppresses the antenna to leg transformation caused by the *Antp^{Ns}* mutation.

Scr or *Antp* gain-of-function phenotypes provide a very sensitive assay for homeotic function and *hay* and *RpIII40* mutations have no homeotic phenotypes in wild-type flies. Therefore, the activity and/or amount of Hay and RplI140 subunits is sufficient for *Antp* function but insufficient for *Scr* function under more limiting conditions. This effects may be caused by differential cellular concentration of the TFIID and RNA pol II complexes during larval growth and/or to differential rate of homeotic gene activation.

***hay* alleles and *Rp140^{wimp}* are modifiers of the *Cbx¹Ubx¹* mutation.**

It has been reported that some loss of function mutations in the *Ultrabithorax (Ubx)* gene produce a partial transformation from haltere to wing such as *Ubx¹*. It has been shown that this phenotype is caused by the reduced transcription of the *Ubx* gene (Bender *et al.*, 1983). Accordingly, the ectopic *Ubx* expression in wing imaginal discs induces the reverse phenotype with a partial transformation from wing to haltere. This phenotype is observed in individuals carrying the *Cbx¹Ubx¹* allele, which is subject of transvection, the ability of cis-regulatory elements to regulate the transcription of the promoter on the homologous chromosome (White and Akam, 1985). Since *hay* and *RpIII40* alleles were modifiers of *Scr* gain of function phenotypes, we analysed the effect of these mutations on the *Cbx¹Ubx¹* phenotypes.

Surprisingly, *hay^{nc2}*, *hay^{nc2rv4}* and *RpIII40^{wimp}* alleles enhance the partial wing to haltere transformation caused by the *Cbx¹Ubx¹* mutation (Table 2 and Figure 2). On the other hand, the other tested *RpIII40* alleles were suppressors of the *Cbx¹Ubx¹* phenotype in the wing (Table 2), suggesting that a different effect on this derepression phenotype can be obtained by components of the basal transcription machinery. The enhancement of the *Cbx¹Ubx¹* phenotype by *hay* and *RpIII40* alleles could be explained if these mutations affect *Ubx* silencing in the wing disc or by inactivating targets genes directly repressed by *Ubx*, such as *Antp*. In these two cases an increase in the *Cbx¹Ubx¹* ectopic transformation would be observed (Stoller and Kennison, personal communication). However, not any

hay and *RpIII40* alleles modifies *Antp* loss or gain-of-function phenotypes (data not shown).

Genetic and molecular evidence suggests that the alleles *RpIII40^{wimp}*, *hay^{nc2}* and *hay^{nc2rv4}* encode, respectively, altered RpII140 and Hay proteins that reduce the expression of a subset of genes (Parkhurst and Ish-Horowicz, 1991; Mounkes and Fuller, 1999; Merino *et al.*, 2002 and our unpublished results). From our results we propose that at least some subunits of the RNA pol II and the TFIIH complex have an important contribution to regulate the expression of a subset of wing-promoting-genes.

***RpIII40^{wimp}* enhance loss of function mutations in *Ubx*.**

Since *hay* alleles and the *RpIII40^{wimp}* were modifiers of the *Cbx¹Ubx¹* phenotype, we decided to analyse if these mutants have an effect on loss of function mutations of *Ubx*. In order to analyse this possibility we crossed *hay^{nc2}*, *hay^{nc2rv4}* and *RpIII40^{wimp}* mutants to the *Ubx¹* allele, which produce a partial transformation of haltere to wing. We found that the *RpIII40^{wimp}* mutant but not *hay* is a weak enhancer *Ubx¹* phenotypes which includes the partial haltere to wing transformation, loss of haltere and third legs malformations. (Table 2 and Figure 2). Interestingly, a related but not identical phenotype called "the *Ubx* effect" has been observed with mutations of the RpII215 subunit which only produce the haltere to wing transformation (MORTIN *et al.* 1988; MORTIN 1990; MORTIN *et al.* 1992). These data indicate that *RpIII40^{wimp}* is a new allele that affect negatively the *Ubx* function. This *Ubx* effect only affects adult structures, since *RpIII40^{wimp}* has a dominant maternal-effect that does not affect the establishment of *Ubx* function in the embryo (PARKHURST and ISH-HOROWICZ 1991). We propose a physically interaction between the *Ubx* and *RpII140^{wimp}* proteins that interferes the *Ubx* binding to regulatory DNA of target genes. Thus, the pleiotropic phenotypes by *RpII140^{wimp}* on *Ubx* function may result from an increase in transcription of genes repressed by *Ubx* (wing-promoting-genes) and the decrease in transcription of those genes that are positively regulated by *Ubx* (haltere and third leg-promoting-genes). Alternatively, RNA polymerase II mutations might reduce the level of *Ubx* protein by lowering *Ubx* transcription.

Non-specific transcription inhibition by actinomycin D suppresses all homeotic derepression mutations.

Some derepressed phenotypes might be the result of sensitivity to the total transcriptional activity and not necessarily result from a problem in specific interactions with transcription factors. Therefore, we decided to analyse if the non-specific chemical inhibition of transcription has the ability to suppress ectopic homeotic transformations. To answer this question we used actinomycin D (act D). Act D is a potent drug that inhibits transcription by the three RNA polymerases (I, II, III), however at low doses preferentially inhibits RNA pol II transcription (Yu, 1980). We fed *Pc*^{3/+}, *Scr*^{Msc/+}; *Antp*^{Scx/+}; *Cbx*¹, *Ubx*^{1/+} and *Antp*^{Ns/+} flies with different act D concentrations (see methods), and determined the number of transformed individuals. In all cases we observed a dose response suppression of the ectopic phenotype when the flies were fed with increasing concentrations of the drug (Figure 3). However, we were not able to get total suppression of any ectopic transformation before act D killed the flies (15 ug/ml). In our conditions no defects were observed in wild type individuals feed with act D with the different concentrations used. The suppression of these phenotypes was not due to a preferential dead of the mutant flies by act D, since a clear reduction in the number of extra sex combs was found in *Pc*, *Antp*^{Scx} and *Scr*^{Msc} flies. Interestingly the loss of function phenotypes of *Scr*^{Msc} and *Cbx*¹*Ubx*¹ are not enhanced by the exposure of these mutants to act D. This is in agreement with previous studies that show that alpha-amanitin did not alter the *Ubx* phenotype caused by *RplII215*^d (Burke et al., 1996). In addition, these results show that the global reduction of transcription can contribute to the modification of the phenotypes observed and show that the ectopic expression of genes is particularly sensitive to the global transcriptional levels. Therefore, genetic modifiers of phenotypes produced by the ectopic expression of some genes under limiting conditions may not be caused by the action of specific factors, but by defects in global transcription. It has been reported that a delay in development may have an effect on the ectopic transformations produced by some homeotic genes. For instance Minute mutants have a similar effect as act D (Kennison and Russell, 1987; Fauvarque et al., 2001). Interestingly we only observed a delay in development when the flies are incubated in

medium with 10 ug/ml of act D, but not with lower doses that partially suppress the ectopic homeotic transformations (data not shown). Indicating that at these doses the suppression effect is not due to a developmental delay. On the other hand, the delay in development at higher concentrations of act D must be due to the effect of the drug on general transcription. In such a case this effect can also occur in mutants that affect any kind of transcription factor that also delays development and in consequence suppress ectopic homeotic transformations. It is important to note that contrary to the effect of act D, that suppress all the derepression phenotypes analysed here, both *hay^{nc2}*, *hay^{nc2rv4}* and *RpIII40^{wimp}* were not able to suppress *Antp^{Ns}* and *hay* was not able to suppress *Pc³*. This observation supports that there is a preferential effect on some promoters by mutations in the *hay* and *RpIII40* genes. It is also important to mention that in the case of *Cbx¹Ubx¹*, the enhancement of the ectopic phenotype observed when the *hay* and *RpIII40^{wimp}* mutants were tested, was not observed in these animals when treated with act D. This suggests that in the *hay* and *RpIII40^{wimp}* point mutations carried by these alleles, a more specific effect can be exerted on some genes than in others. Therefore the enhancement of the *Cbx¹Ubx¹* phenotype by *RpIII40^{wimp}* and *hay* is not due to a general reduction of transcription, but to a more complicated mechanism that may involve *Ubx* downstream genes. This effect could be dependent on the nature of the allele and the segmental cellular context.

Mutations in *hay* do not have the same effect on different promoter control regions.

In order to determine if the *hay* mutations analysed in this work have a preferential effect on specific promoter control regions, we used four independent transgenic lines (lines 1-4) that express the mini-*white* gene from the minimal *hsp70* promoter (*P[hsp70-w]*) (Brand and Perrimon, 1993). These lines have only one P element insertion in different chromosomes and express *white* at different levels, depending on their insertion site (Fig 4). The *white* expression levels can easily be assayed by quantifying of the amount of red pigment (drospterine) in the adult eyes using spectrophotometry. These four lines were crossed with the *hay^{nc2}*, *hay^{nc2rv1}* and *hay^{nc2rv4}* flies, *hay^{nc2rv1}* resemble a deficiency in the *hay* gene (our unpublished results). Heads of several heterozygous flies of the same age

of the progeny of each parental strain were dissected and assayed for *white* activity. The quantification was performed at least ten times for each transgenic line (see materials and methods). The drosopetine levels of the transheterozygous flies (*P[hsp70-w]/hay*) were compared to the normalized levels of an identical transgene without the *hay* allele obtained in the same cross for each line. We found that in two lines (lines 2 and 3) *hay*^{nc2rv4} causes suppression of *white* activity; this suppression was not observed with *hay*^{nc2} and *hay*^{nc2rv1} alleles (Fig. 4). In line 1, a small increase of *white* activity was observed in the presence of *hay*^{nc2} and *hay*^{nc2rv4}. In line number 4 there was an important increase of the activity in the presence of the same alleles, but not with *hay*^{nc2rv1}. Therefore, some *hay* mutations cause an increase in *white* gene expression from some transposon insertions, but a decrease in others. These suggest that mutations in *hay* differentially affect transcription in a way that depends on the sequences or chromosomal context that surrounds the core promoter. Considering that TFIID is a general transcription factor, in theory, the effect of mutations in it may cause a general reduction in transcription, however the observed phenotypes suggest that these mutations may affect differentially and in an allelic specific manner the expression of different genes. The increase in the *white* expression observed with some *hay* alleles can be explained if this differential effect, produce the decrease in transcription of particular genes that in consequence allows others to increase transcription. Also we can not discard the possibility that TFIID function to increase the transcription of some genes and to decrease the transcription of others. It is interesting to note that these mutations in TFIID have similar effects on TATA plus promoters like the *hsp70* (Amin *et al.*, 1994) and TATA less promoters like the ones present in the homeotic genes (Kutach and Kadonaga 2000).

Concluding remarks. Basal transcription factors including RNA polymerase II and TFIID are fundamental for the proper regulation of gene expression during development. These factors interact with specific transcriptional activators that ensure correct spatio-temporal expression. Both, TFIID and the RNA polymerase II, are composed of several subunits that may interact physically with several other complexes involved in transcription. Different mutations in these factors may specifically disrupt some of these

interactions. As a consequence, it is not difficult to imagine that mutations in a particular region of one of the components of these factors may affect the expression of some genes and not of others. This has already been reported for the *RpIII40^{wimp}* mutant (Parhurst and Ish-Horowicz, 1991). In this work, we have found that a similar situation could occur with TFIIH subunits. On the other hand, a multi-subunit complex like TFIIH may have conformational changes mediated by its interactions with other transcription factors. Some conformational changes may be more affected than others in the presence of some alleles. We demonstrated that different genes, including the *Drosophila* homeotic genes, were differentially susceptible to point mutations in the XPB homologue, *hay*. Although a general reduction in the global transcription may produce phenotypes by affecting genes that require high levels of transcription, in *Drosophila*, specific sets of genes are affected in an allele-specific manner by TFIIH mutants. From this considerations we propose that mutations in components of the basal transcription machinery not only may produce a reduction of global transcription, but also differential alterations in the regulation of gene expression. What genes are more affected by these defects in gene regulation depends on the nature of the mutation in the basal transcription factor, in this case TFIIH. Interestingly, experiments in human cell lines have demonstrated that mutations in XPD affect the Cdk7 dependent phosphorylation of some hormone nuclear receptors, suggesting that this may be one of the ways in which these mutations produce specific phenotypes observed in patients (Keriel *et al.*, 2002). In conclusion we have presented evidence that mutant versions of subunits of what it is considered basal transcription machinery may cause antagonistic phenotypes depending on the gene used as reporter of expression. This behaviour may also reflect the different cis-regulatory information harboured in each gene. Therefore, the results observed in this work, using *Drosophila*, have important implications in the interpretation of phenotypes observed in humans affected in TFIIH.

METHODS.

Fly strains. Flies were raised at 25°C on a yeast-sucrose agar medium with either Nipagin or propionic acid. Unless otherwise noted all mutations and chromosome

aberrations are described in Lindsley and Zimm, 1992. Control strains in all the experiments were *OreR*, *ru¹ h¹ th¹ st¹ cu¹ sr¹ e^s ca¹* or *w¹¹¹⁸* stocks. *hay* alleles used in this work were *hay^{nc2}*, *hay^{nc2rv1}* and *hay^{nc2rv4}* (Mounkes and Fuller, 1999; Table 1). The dominant suppression or enhancement of homeotic mutations was meiotically mapped for *hay* and *RpIII40^{wimp}* mutations by crossing females heterozygous for the aforementioned mutations and the chromosome *ru¹ h¹ th¹ st¹ cu¹ sr¹ e^s ca¹* or *OreR* to males heterozygous for a third chromosome carrying *ru¹ h¹ th¹ st¹ cu¹ sr¹ e^s Pr ca¹*. Single recombinant males were selected and the recombinant chromosomes balanced and tested for dominant homeotic mutations *Pc³*, *Scr^{Msc}*, *Antp^{Scx}*, *Cbx¹Ubx¹*, *Ubx¹* and *Antp^{Ns}*. A list with the description of the alleles used in this work is shown in Table 1.

Phenotypic analysis of homeotic transformations. Cuticle preparations and homeotic phenotypes were scored under the microscope. The following criteria has been used extensively to measure homeotic phenotypes. For *Antp* gain of function phenotype, the penetrance is the number of specimens showing antenna to leg transformations divided by the total number of scored flies. The expressivity of *Scr^{Msc}* and *Pc³* was determined by counting the number of ectopic sex combs teeth on the second and third legs of at least twenty males and comparing them to control first legs containing an average of 10.8 sex comb teeth each (100%) (Kennison and Tamkum, 1988). The penetrance of the *Cbx¹Ubx¹* phenotype was measured as the number of flies showing necrosis of the wing blade as well as a complete loss of alula divided by the total number of flies scored in each experiment (White and Akam, 1985). In the case of the actinomycin D treatment, the severity of this transformation was measured as a partial suppression of the previously described phenotypes as the percentage of partially transformed alula that lost their wing bristles.

Quantitative measurement of red-eye pigments. A P-element containing the mini *white* gene under the control of a minimal *hsp70* promoter was used for transgenic fly generation. Transgenic flies were constructed following a standard protocol (Spradling and Rubin, 1982). Four independent transgenic lines, that only have a single P element, were crossed with *hay* mutant flies. The flanking sequences of the P element insertions

were obtained after inverse PCR amplification of these genomic regions using the protocol reported by Huang *et al.*, (2000). Red-eye pigments from five days old flies for each transgenic line were isolated and quantified separately following the reported protocol (Sullivan *et al.*, 2000). At least ten measurements were done per genotype. Males and females were processed separately. Values are expressed as means +/- S.E.M. Comparisons between means were performed using analysis of variance. As a control for these experiments, the red-eye colour from the same transgenic flies without the *hay* mutations was quantified.

Homeotic phenotype suppression using actinomycin D. Fly medium was prepared following the standard recipe. Actinomycin D (Sigma) was added to the medium at 1, 5, 10 and 15 µg/ml final concentrations. Crosses were grown in actinomycin D-medium supplement media at 25°C. After eclosion, the homeotic phenotypes were scored as previously described.

ACKNOWLEDGMENTS.

This work was greatly facilitated by the sharing of mutants stocks and unpublished results from many sources, including Margaret Fuller, Mark Mortin, Sam Stoller and James A. Kennison. We thank Virginia Barajas for technical support and Patricia León for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- Amin J, Fernandez M, Ananthan J, Lis JT, Voellmy, R. 1994. Cooperative binding of heat shock transcription factor to the Hsp70 promoter in vivo and in vitro. *J Biol Chem.* 269: 4804-4811.
- Bender W, Akam M, Karch F, Beachy PA, Peifer M, Spier, P, Lewis EB, Hogness DS. 1983. Molecular genetics of the Bithorax complex in *Drosophila melanogaster*. *Science* 221: 23-29.

- Blackwood E M, Kadonaga, JT. 2002. Going the distance: A current view of enhancer action. *Science* 2281: 60-63.
- Boube M, Joulia L, Cribbs DL, Bourbon HM. 2002. Evidence for a mediator of RNA polymerase II transcriptional regulation conserved from yeast to man. *Cell* 26: 143-51.
- Botta E, Nardo T, Lehmann AR, Egly JM, Pedrini AM, Stefanini M. 2002. Reduced level of the repair/transcription factor TFIIH in trichothiodystrophy. *Human Mol. Genet.* 11: 2919-2928.
- Brand R, Perrimon R. 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118: 401-415.
- Burke L P, Jones T, Mortin MA. 1996 Transcriptional competition and homeosis in *Drosophila*. *Biochem Genet.* 34: 45-59.
- Butler JEF, Kadonaga, JT. 2002. The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression *Genes Dev.* 16: 2583-2592.
- Cleaver JE. 2000. Common pathways for ultraviolet skin carcinogenesis in the repair and replication defective groups Xeroderma pigmentosum *J. Derm. Sci.* 23: 1-11.
- de Boer J, Hoeijmakers JHJ. 1999. Cancer from outside, aging from the inside: Mouse models to study the consequences of defective nucleotide excision repair *Biochimie* 81: 127-137.
- Dvir A, Conaway JW, Conaway RC. 2001. Mechanism of transcription initiation and promoter escape by RNA polymerase II *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11: 209-214.
- Duncan IW, Kaufman, TC. 1975. Cytogenetic analysis of chromosome 3 in *Drosophila melanogaster*: mapping of the proximal portion of the right arm. *Genetics* 80: 733-752.
- Egly JM. 2000. TFIIH: from transcription to clinic *FEBS letters* 24884: 124-128.
- Fauvarque MO, Laurenti P, Boivin A, Bloyer S, Griffin-Shea R, Bourbon HM, Dura JM. 2001. Dominant modifiers of the polyhomeotic extra-sex-combs phenotype induced by marked P element insertional mutagenesis in *Drosophila*. *Genet Res.* 2001 7:137-48.

- Gerber H, Hagmann M, Seipel K, Georgiev O, West MAL, Litingtung Y, Schaffner W, Corden JL. 1995. RNA polymerase II C-terminal domain required for enhancer-driven transcription. *Nature (London)* 374: 660-662.
- Gutiérrez, L, Zurita, M, Kennison, JA and Vázquez, M. 2003. The *Drosophila* trithorax group gene tonalli (tna) interacts genetically with the Brahma remodeling complex and encodes a SP-RING finger protein. *Development*. 130; 343-354,
- Huang A M, Rehm JE, Rubin, GM. 2000. Recovery of DNA sequences flanking P-element insertions: Inverse PCR and plasmid rescue. In *Drosophila* Protocols, Sullivan, W., Ashburner, M. and Hawley R. S. Eds. pp 429-437. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Itin PH, Pittelkow MR. 1990. Tricothiodystrophy: review of sulfur-deficient brittle hair syndromes and association with the ectodermal dysplasias. *J. Am. Acad. Dermatol.* 20: 705-717.
- Johnson KM, Wang J, Smallwood A, Arayata C, Carey, M. 2002. TFIID and human mediator coactivator complexes assemble cooperatively on promoter DNA *Genes Dev.* 15: 1852-1863.
- Kennison JA, Russell MA. 1987. Dosage-dependent modifiers of homeotic mutations in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 116: 75-86.
- Kennison JA, Tamkun JW. 1988. Dosage-dependent modifiers of *Polycomb* and *Antennapedia* mutations in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8136-8140.
- Keriel A, Sary A, Sarasin A, Rochette-Egly C, Egly JM. 2002. XPD mutations prevent TFIID-dependent transactivation by nuclear receptors and phosphorylation of RAR α *Cell* 109: 125-135.
- Kutach AK, Kadonaga JT. 2000. The downstream promoter element DPE appears to be as widely used as the TATA box in *Drosophila* core promoters. *Mol. Cell Biol.* 20: 4754-4764.
- Lee T I, Young RA. 2000. Transcription of eukaryotic protein-coding genes *Annu. Rev. Genet.* 34: 77-137.

- Le Page F, Kwoh E, Avrutskaya A, Gentil A, Leadon S, Sarasin A, Cooper P.2000. Transcription-coupled repair of 8-oxoGuanine: requirement for XPG, TFIIH, and CSB and implications for Cockayne syndrome *Cell* 101: 159-171.
- Lehmann AR. 1998. Dual functions of DNA repair genes: molecular, cellular and clinical implications *BioEssays* 20: 146-155.
- Lehmann AR. 2001. The Xeroderma pigmentosum group D (XPD) gene: one gene, two functions, tree diseases *Genes Dev.* 15:15-23.
- Lehman AR. 2002. Ageing: Repair and transcription keep us from premature Ageing *Current Biology* 12: 550-551.
- Lewis EB. 1980. Report of New Mutants *Drosophila melanogaster* *Dros. Inf. Serv.* 55: 207-208.
- Lindsley D, Zimm, GG. 1992. The genome of *Drosophila melanogaster*. San Diego, Calf. Academic Press.
- Merino C, Reynaud E, Vázquez M, Zurita, M. 2002. DNA Repair and Transcriptional Effects of Mutations in TFIIH in *Drosophila* Development *Mol. Biol. Cell* 13: 3246-3256.
- Mortin MA, Joon Kim W, Huang J. 1988. Antagonistic Interactions between alleles of the Rp215 locus in *Drosophila melanogaster* *Genetics* 119: 863-873.
- Mortin MA. 1990. Use of second-site suppressor mutations in *Drosophila* to identify components of the transcriptional machinery *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4864-4868.
- Mortin AM, Zuerner R, Berger S, Hamilton, BJ. 1992. Mutations in the second largest subunit of *Drosophila* RNA polymerase II Interact with *Ubx*. *Genetics* 131: 895-903.
- Mounkes LC, Jones RS, Bee-Choo L, Gelbart W, Fuller MT. 1992. A *Drosophila* model for Xeroderma pigmentosum and Cockayne's syndrome: *haywire* encodes the fly homologue of *ERCC3*, a human excision repair gene. *Cell* 71: 925-937.
- Mounkes LC, Fuller, MT. 1999 Molecular Characterization of mutant alleles of the DNA repair/basal transcription factor *haywire/ERCC3*, in *Drosophila* *Genetics* 152: 291-297.

- Nance MA, Berry SA 1992. Cockayne Syndrome: review of 140 cases. *Am J. Med. Genet.* 42: 68-84.
- Orphanides G, Raienberg D 2002. A unified theory of Gene Expression *Cell* 108: 439-451.
- Rolig RL, McKinnon, PJ. 2000. Linking DNA damage and neurodegeneration T. *Neurobiol. Sci.* 23: 417-423.
- Parkhurst SM, Ish-Horowicz D 1991. wimp, a dominant maternal-effect mutation, reduces transcription of a specific subset of segmentation genes in *Drosophila* *Genes Dev.* 5: 341-357.
- Pokholok DK, Hannett NM, Young RA. 2002. Exchange of RNA polymerase II initiation and elongation factors during gene expression in vivo. *Mol Cell* 9: 799-809.
- Simon J A, Tamkun, JW. 2002 Programming off and on states in chromatin: mechanisms of Polycomb and trithorax group complexes *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12: 210-218.
- Southworth, J and Kennison, J.A. 2002. Transvection and silencing of the *Scr* homeotic gene of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 161: 733-746.
- Spradling AC, Rubin, GM. 1982 Transposition of cloned P-elements into *Drosophila* germline chromosomes, *Science* 218: 341-347.
- Sullivan W, Ashburner M, Hawley, RS. 2000. *Drosophila* Protocols Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Talbert BP, Garber, LR. 1994. The *Drosophila* homeotic mutation *Nasobaemia* (*AntpNs*) and its revertants: an analysis of mutational reversion. *Genetics* 138: 709-720.
- White RAH, and Akam, ME. 1985. *Contrabithorax* mutations cause inappropriate expression of *Ultrabithorax* products in *Drosophila*. *Nature* (London) 318: 567-569.
- Yu FL. 1980 Selective inhibition of rat liver nuclear RNA polymerase II by actinomycin D *in vivo*. *Carcinogenesis* 1: 577-581.
- Zurita, M. and Merino , C. 2003. The transcriptional complexity of the TFIID complex. *Trends in Genetics* (in press).

Table 1. Mutant alleles used in this work.

Genotype	Description	Source.
<i>ru¹, h¹, hay^{nc2}, vi¹/TM6B, Tb¹, Dr¹</i>	hypomorphic/antimorphic	M. Fuller lab.
<i>ru¹, h¹, hay^{nc2rv4}, vi¹/TM6B, Tb¹, Dr¹</i>	antimorphic <i>hay</i> allele	M. Fuller lab
<i>ru¹, h¹, hay^{nc2rv1}, vi¹/TM6B, Tb¹, Dr¹</i>	hypomorphic <i>hay</i> allele	M. Fuller lab
<i>ru¹, h¹, th¹, st¹, cu¹, sr¹, e^s, ca¹/TM6B, Tb¹, Dr¹</i>		M. Fuller lab
<i>ru¹, h¹, hay^{nc2}, cu¹, sr¹, e^s, ca¹/TM6B, Tb¹, Dr¹</i>	hypomorphic/antimorphic	This work
<i>ru¹, h¹, hay^{nc2rv4}, cu¹, sr¹, e^s, ca¹/TM6B, Tb¹, Dr¹</i>	antimorphic <i>hay</i> allele	This work
<i>ru¹, h¹, hay^{nc2rv1}, cu¹, sr¹, e^s, ca¹/TM6B, Tb¹, Dr¹</i>	hypomorphic <i>hay</i> allele	This work
<i>cu¹ Rp11140^{wimp}/TM3, Sb¹</i>	maternal effect allele	This work
<i>ru¹, h¹, th¹, st¹, eu¹, Rp11140^{wimp}, sr¹, e^s, ca¹/TM3, Sb¹</i>	maternal effect allele	B.D.S.C.
<i>ru¹, h¹, th¹, st¹, cu¹, Rp11140^{Z43}, red¹, e</i>	lethal recessive allele	M. Mortin lab
<i>Rp11140^{Z45}, red¹, e¹</i>	lethal recessive allele	M. Mortin lab
<i>y¹, w¹; Rp11140^{A5}, red¹, e¹</i>	lethal recessive allele	M. Mortin lab
<i>ru¹ h¹ Ubx¹, e¹/TM3, sb¹, Ser¹</i>	amorphic allele	B.D.S.C.
<i>Antp^{NS}/TM6B, Tb¹</i>	visible dominant allele	J.Kennison lab
<i>ln(3R)Scy^{Msc}, ru¹, Scy^{Msc}, pum^{Msc}, ss¹, e¹/TM3, Sb</i>	ln(3R)84B1-2;84F1-2	B.D.S.C.
<i>ln(3R)P(Pc³), Pc³/TM1</i>	antimorphic allele	B.D.S.C.
<i>Ubx^{Cbx1}, Ubx¹, gl³/TM1</i>	neomorphic allele	B.D.S.C
<i>ru¹, h¹, st¹, kni^{r1-1}, Antp^{Sex} p^r e¹/TM3, Sb¹</i>	visible dominant allele	B.D.S.C

B.D.S.C.= Bloomington *Drosophila* Stock center

Table 2. *Rp1140^{wimp}*, *hay^{nc2}* and *hay^{nc2rv4}* modify gain of function of homeotic phenotypes

Genotype	<i>Anip^{Sex}</i> (a)	<i>Scr^{Aisc}</i> (a)	<i>Pc³</i> (a)	<i>Chx¹Ubx¹</i> (b)	<i>Ubx¹</i>
+/+	25	23	51	60/307 (19)	1/502 (<1)
<i>ru¹, h¹, th¹, st¹, cu¹, sr¹, e^s, ca¹</i>	19	1	15	16/141 (11)	0/340 (0)
<i>ru¹, h¹, hay^{nc2}, cu¹, sr¹, e^s, ca¹</i>	11	1	16	107/234 (46)	0/123 (0)
<i>ru¹, h¹, hay^{nc2rv4}, cu¹, sr¹, e^s, ca¹</i>	12	3	21	73/138 (53)	0/98 (0)
<i>ru¹, h¹, hay^{nc2rv1}, cu¹, sr¹, e^s, ca¹</i>				26/164 (16)	0/158 (0)
<i>ru¹, h¹, th¹, st¹, cu¹, Rp1140^{wimp}, sr¹, e^s, ca¹</i>	3	<1	1	68/142 (48)	
<i>cu¹, Rp1140^{wimp}</i>	11	1	8	54/106 (45)	31/195 (16) (d)
<i>ru¹, h¹, th¹, st¹, cu¹, Rp1140^{Z43}, red¹, e¹</i>		5	8	0/89 (0)	56/56 (100) (c)
<i>Rp1140^{Z45}, red¹, e¹</i>		10	27	0/131 (0)	0/123 (0)
<i>y¹, w¹; Rp1140^{A5}, red¹, e¹</i>			31	0/112 (0)	0/137 (0)

Reciprocal crosses for almost genotypes produce similar penetrance and expressivity. The original chromosome *ru¹, h¹, th¹, st¹, cu¹, Rp1140^{wimp}, sr¹, e^s, ca¹* fails to complement *Ubx¹* but the recombinant *cu¹, Rp1140^{wimp}* chromosome does. In all genotypes the maternal chromosome is indicated first. The full genotypes are indicated in Table 1.

- (a) Expressivity was determined by counting the number of ectopic sex comb teeth on the second and third legs of twenty males and comparing to control first legs with an average of 10.8 sex comb teeth each (100%).
- (b) Number of flies showing necrosis of the wing blade as well as a complete loss of allula divided by the total number of flies. Percentages are given in parentheses.
- (c) Penetrance of the *Ubx¹* phenotype caused by the *Rp1140^{Z43}* mutation (partial haltere to wing transformation).
- (d) Penetrance of several *Ubx¹* phenotypes caused by the *Rp1140^{wimp}* mutation. This includes partial haltere to wing transformation (3%), third leg malformation (8%) and loss of haltere (5%).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figure 1. Effect of *hay* and *RpIII40^{wimp}* mutants on ectopic *Scr* homeotic transformations. The relevant genotypes are indicated in the figure. A) Suppression effect of *RpIII40^{wimp}* and partial suppression effect of *hay* mutations on the ectopic appearance of sex combs in the second and third pair legs in *Antp^{Sex}* flies. B) Suppression effect of *RpIII40^{wimp}* mutation, but not for *hay* alleles on the appearance of sex combs in the second and third pair legs in *Pc³* flies.

Figure 2. Effect of *hay* and *RpIII40^{wimp}* mutants on *Ubx* homeotic transformations. The relevant genotypes are indicated in the figure. A) Enhancement by the *RpIII40^{wimp}* mutation on *Ubx* loss-of-function phenotypes. First panel indicates a partial haltere to wing transformation, the second panel shows a malformed third leg and the third panel displays the lack of haltere. B) Effect of *hay* and *RpIII40^{wimp}* mutations on ectopic *Ubx* homeotic transformations. In the presence of the *hay^{nc2}*, *hay^{nc2rv4}* and *RpIII40^{wimp}* alleles the *Cbx¹Ubx¹* effect is dramatically increased. Note the high degree of necrotic tissue in the *hay^{nc2}/Cbx¹Ubx¹* wing and the transformation of wing to haltere in the *RpIII40^{wimp}/Cbx¹Ubx¹* organism.

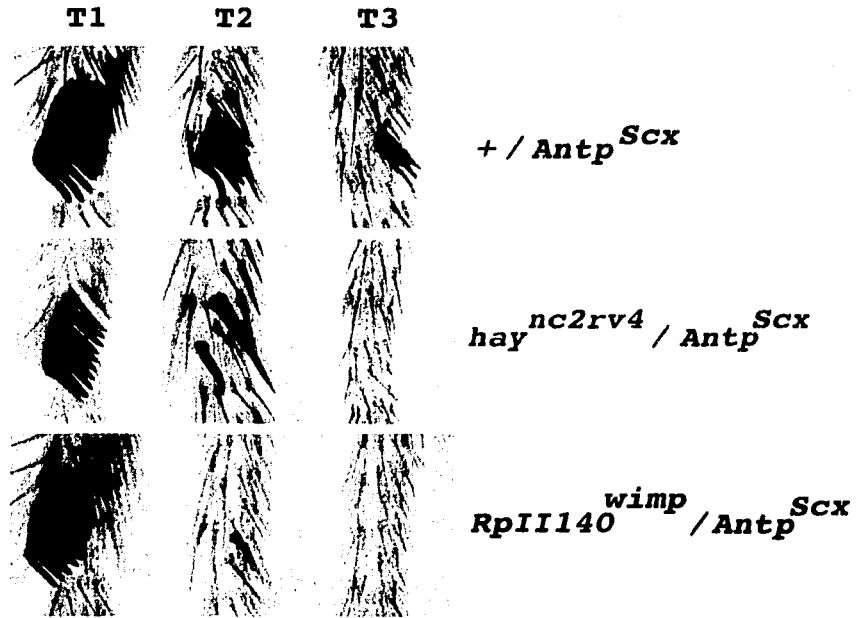
Figure 3. Suppression effect by actinomycin D on ectopic homeotic transformations. A) Suppression of sex combs in second and third legs in *Scr^{Δsc}* and *Pc³* (B) flies. The expressivity was quantified as a function of act D concentration. C) Act D suppression of allule loss in *Cbx¹Ubx¹* organisms. The percentage of organisms with loss of the allule structures was determined. D) Act D suppression of antenna to leg transformations in *Antp^{Ns}* flies. The number of individuals showing transformation is shown as a percentage. The viability is presented as the percent of adult organisms obtained at each act D concentration from at least 500 embryos.

Figure 4. *white* activity determination in transgenic lines in the presence of *hay* alleles. A) Chromosomal and gene location of the different insertion lines. The name of the gene and the cytological position in which the P element was inserted is indicated in the figure. The vertical arrow indicates the position in the corresponding gene of the P element. The exon-intron organisation for each gene is as it is reported in *Gadfly* in the

BDGP page. B) White activity measures of the different transgenic lines in the presence of different *hay* alleles. The *white* activity was quantified measuring the drosopterine pigment at least ten times for each transgenic line. The activity is represented in relative units and adjusted to 1, which is the activity obtained in the correspondent parental line. The genotypes are indicated in the figure and each transgenic line (1-4) is indicated at the bottom of the columns. The values are means +/- S.E.M. (n=15-20). Asterisks denote a significant difference from the parental line, $P < 0.001$.

Fig. 1

A



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

B



$+ / Pc^3$

hay^{nc2rv4} / Pc^3

$RpIII140^{wimp} / Pc^3$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig 2.

A



RpII140 wimp / Ubx¹

B

Cbx¹ Ubx¹ / +



Cbx¹ Ubx¹ / hay^{nc2}



Cbx¹ Ubx¹ / RpII140^{wimp}



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig 3.

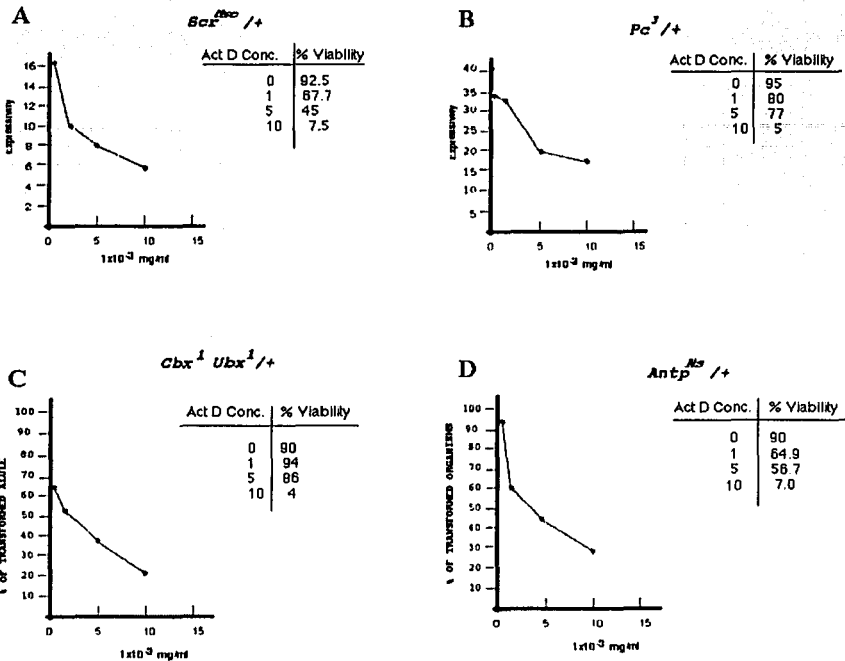
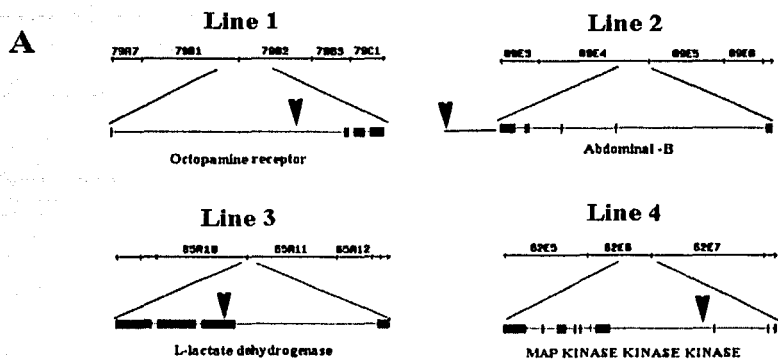
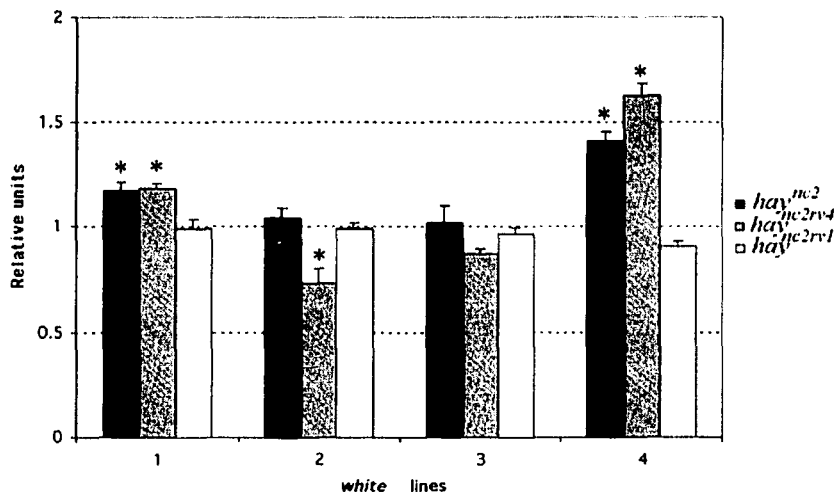


Fig 4.



B



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN