

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
POSGRADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y MOLECULAR DE
p52 EN *Drosophila melanogaster***

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS
P R E S E N T A:
M. en C. MARIANA CONSUELO FREGOSO LOMAS

BAJO LA TUTORÍA DEL
Dr. MARIO E. ZURITA ORTEGA
CUERNAVACA, MORELOS - JUNIO 2007



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.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por albergarme tan cálidamente durante toda mi vida académica y por brindarme una gran cantidad de oportunidades de desarrollo de excelente calidad

Al Instituto de Biotecnología, por ser mi segundo hogar durante los años más importantes de mi desarrollo profesional

Al Dr. Mario Zurita, por aceptarme en su laboratorio para la realización de este trabajo, por todo el apoyo y la confianza

A los miembros del jurado: La Dra. Alejandra Covarrubias, la Dra. Catarina Sacristán, el Dr. Félix Recilla, el Dr. Federico Sánchez y el Dr. Mario Zurita, por la revisión de este manuscrito y sus atinados comentarios

INDICE GENERAL

(pág.)

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

(1) ABSTRACT

(2) RESUMEN

(3) INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

(3) -*TFIIH, estructura y función*

(3) -*Transcripción por la RNA polimerasa II*

(7) -*Transcripción por la RNA polimerasa I*

(7) -*Reparación del DNA*

(9) -*Mutaciones en TFIIH y las enfermedades que causan en humanos*

(12) -*D. melanogaster como modelo biológico para el estudio de enfermedades complejas*

(14) -*TFIIH en Drosophila melanogaster*

(15) -*La subunidad p52 de TFIIH*

(17) JUSTIFICACIÓN

(18) HIPÓTESIS

(19) OBJETIVOS

(20) MATERIAL Y MÉTODOS

(20) -*Líneas de Drosophila melanogaster empleadas*

(20) -*Ensayo de complementación de mutantes marionette*

(21) -*Ensayo de sensibilidad a irradiación con luz UV*

(21) -*Disección de tejidos y tinciones*

(21) -*Generación y análisis de moscas transgénicas*

(22) -*Rescate de letalidad y fertilidad de mutantes marionette con diferentes líneas transgénicas*

(23) -*Inmunohistoquímica y cuantificación del nivel de fluorescencia en núcleos de glándulas salivales de mutantes Dmp52 y wt*

(24) -*Preparación de cromosomas mitóticos de neuroblastos larvarios*

(24) -*Producción de Baculovirus recombinantes*

(25) -*Purificación de complejos TFIIH recombinantes*

(25) -*Preparación de extracto de células de insecto infectadas con baculovirus*

- (25) --Cromatografía por columna de Heparina
- (26) --Inmunoprecipitación de TFIIH
- (26) -Ensayo de transcripción *in vitro*
- (27) -Ensayo de reparación por escisión de nucleótidos *in vitro* (doble incisión)
- (28) -Ensayo de interacción de proteínas
- (28) -Ensayo de actividad de ATPasa
- (30) RESULTADOS
- (30) -el gen "marionette" codifica para el homólogo de p52 en *Drosophila melanogaster*
- (34) -Defectos en el desarrollo de mutantes en *Dmp52*
- (40) -El homólogo de p52 en humanos rescata parcialmente algunos fenotipos producidos por mutaciones en *Dmp52*
- (42) -Mutaciones en *Dmp52* afectan los niveles nucleares de TFIIH
- (45) -Las mutantes en *Dmp52* presentan aberraciones cromosómicas
- (47) -Mutaciones puntuales en *Dmp52* afectan la actividad de ATPasa de XPB y por lo tanto las actividades de transcripción y reparación de TFIIH
- (55) DISCUSIÓN
- (55) Mutantes de p52 desestabilizan la estructura y afectan la actividad de TFIIH
- (56) -Los fenotipos de las mutantes *marionette* son equivalentes a los que presentan los pacientes con TTD y XP
- (59) -Las mutantes en TFIIH de *Drosophila* son pleiotrópicas
- (61) CONCLUSIONES
- (62) PERSPECTIVAS
- (63) ANEXOS
- (63) I. La sobre-expresión de p8 trans-complementa las mutantes *Dmp52* y aumenta la resistencia basal a irradiación ultravioleta
- (66) II. Publicación
- (67) ABREVIATURAS
- (69) REFERENCIAS

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

(pág.)

- (4) Figura 1. *Estructura y funciones celulares de TFIIH*
- (6) Figura 2. *Modelo de función y ensamblaje por pasos del complejo de pre-iniciación (PIC)*
- (9) Figura 3. *Modelo de reparación por escisión de nucleótidos*
- (15) Figura 4. *Fenotipos de moscas heteroalélicas mutantes en hay*
- (32) Figura 5. *Descripción genética y molecular de los alelos Dmp52 y ensayo de complementación de mutantes*
- (33) Figura 6. *Ensayo de sensibilidad a radiación con luz UV-B*
- (37) Figura 7. *Fenotipos en el desarrollo asociados a mutaciones en Dmp52*
- (38) Figura 8. *Defectos en quetas y cutícula de moscas adultas mutantes en marionette*
- (39) Figura 9. *Fenotipo de moscas adultas asociado a mutaciones en Dmp52*
- (44) Figura 10. *Los niveles de proteína de XPB y XPD disminuyen en las mutantes en Dmp52*
- (46) Figura 11. *Mutaciones en Dmp52 causan aberraciones cromosómicas*
- (48) Figura 12. *Proteínas mutantes de hp52 analizadas in vitro*
- (53) Figura 13. *Mutaciones en hp52 causan una disminución en la estimulación de la actividad de ATPasa de XPB y un defecto en la REN*
- (54) Figura 14. *La integración de XPB al complejo TFIIH es específica y dependiente de p52*
- (65) Figura 15. *Trans-complementación de mutantes mrn con la sobreexpresión de DmTTDA/p8 silvestre.*

- (11) **Tabla I.** *Principales manifestaciones clínicas de la tricotiodistrofia (TTD), el xeroderma pigmentosum (XP) y el síndrome de Cockayne (SC)*
- (41) **Tabla II.** *Rescate de la letalidad de los alelos *mrn* homocigos por diferentes líneas transgénicas*
- (41) **Tabla III.** *Rescate de la esterilidad de los organismos heteroalélicos EP3605/*mrn* por diferentes líneas transgénicas*

ABSTRACT

Mutations in the XPB, XPD and p8 subunits of the transcription/DNA repair factor TFIIH that contains 10 subunits, are genetically linked to human diseases, including cancer. However, no reports of mutations in other TFIIH subunits have been documented in higher eukaryotes. In this thesis work we have analyzed at genetic, molecular and biochemical levels the *Drosophila* p52 (*Dmp52*) subunit of TFIIH. *Dmp52* is encoded by the gene *marionette* in *Drosophila*. A defective *Dmp52* produces UV light-sensitive flies with specific phenotypes during development; organisms are smaller than their wild type siblings, and typically present chromosomal instability accompanied by tumors. Interestingly, the human homologue of *Dmp52* partially rescues these phenotypes. In addition, some of the defects observed in the fly caused by mutations in *Dmp52* can generate trichothiodystrophy (TTD) and cancer-like phenotypes. Biochemical analysis of *Dmp52* point mutations introduced in the human p52, at homologous positions to defects in *Dmp52*, destabilize the interaction between p52 and XPB another TFIIH subunit, thus compromising the assembly of TFIIH. In this study we have also found that p52 regulates XPB's ATPase activity and consequently both of its transcriptional and NER functions.

RESUMEN

El factor TFIIH está formado por 10 subunidades y su participación es esencial en los procesos de transcripción y reparación del DNA. Mutaciones en las subunidades XPB, XPD y p8 se han asociado a enfermedades hereditarias incluyendo el cáncer. Sin embargo, no se conocen mutaciones en otros componentes de TFIIH en organismos eucariotes. En este trabajo reportamos el análisis genético, molecular y bioquímico del homólogo de la subunidad p52 en *Drosophila melanogaster* (*Dmp52*). Encontramos que *Dmp52* está codificado por el gen *marionette* en *Drosophila* y que mutaciones en *Dmp52* producen moscas sensibles a la irradiación con luz UV y otros fenotipos específicos durante el desarrollo. Por ejemplo: los organismos son más pequeños que los silvestres y presentan tumores e inestabilidad cromosómica. El homólogo en humanos de *Dmp52* rescata parcialmente estos fenotipos. Algunos de los defectos observados en las moscas mutantes en *Dmp52* son similares a los fenotipos que presentan los pacientes con Tricotodistrofia y Xeroderma pigmentosum. En el análisis bioquímico observamos que las mutaciones puntuales de *Dmp52* introducidas en el p52 de humano en posiciones homólogas, desestabilizan la interacción entre p52 y la helicasa XPB, por lo tanto comprometiendo la estabilidad del complejo. Este estudio aporta datos novedosos sobre la caracterización de la función de p52 dentro del complejo TFIIH, como reguladora de la actividad de ATPasa de XPB, y por lo tanto de la actividad de transcripción y reparación de TFIIH.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

TFIIH estructura y función

TFIIH es un factor multiprotéico involucrado en diversos mecanismos celulares fundamentales (Fig. 1). Entre ellos se encuentra la transcripción por la RNA polimerasa I y II (RNA pol I y II) (basal e inducida), la reparación por escisión de nucleótidos (REN), y el control del ciclo celular (Egly, 2001; Iben et al., 2002; Chen et al., 2003; Zurita y Merino, 2003; Fisher, 2005). Este factor está formado por 10 proteínas que pueden organizarse en subcomplejos. Por un lado el subcomplejo llamado “Core” (Central) que contiene la helicasa de DNA, XPB (con actividad en dirección 3´-5´) y los polipéptidos p62, p52, p44, p34 y p8/TTDA. Por otro lado, el subcomplejo de cinasa dependiente de ciclina (CAK) que está compuesto por tres proteínas: la cinasa Cdk7, la ciclina Cych, y la proteína MAT1, que estabiliza al complejo y permite la interacción con el resto de TFIIH. La helicasa de DNA XPD (con actividad en dirección 5´-3´) interactúa con ambos subcomplejos (Le Roy et al., 1998; Tirode et al., 1999; Egly, 2001; Giglia-Mari et al., 2004). El subcomplejo CAK sólo participa en la transcripción del DNA. CDK7 fosforila el extremo carboxilo terminal (CTD) de la subunidad grande de la RNA pol II para iniciar la elongación y, aparentemente posee un papel importante en la transición de la fase S a la M en el control del ciclo celular (Larochelle et al., 1998).

Transcripción por la RNA polimerasa II

El proceso celular encargado de transmitir la información genética contenida en el DNA mediante la síntesis de los RNAs mensajeros (RNAm) se denomina transcripción. Este proceso, mediado por la RNA pol II se divide en tres fases: *la iniciación*, *la elongación* y *la terminación*. El factor TFIIH participa en las dos primeras. La fase de

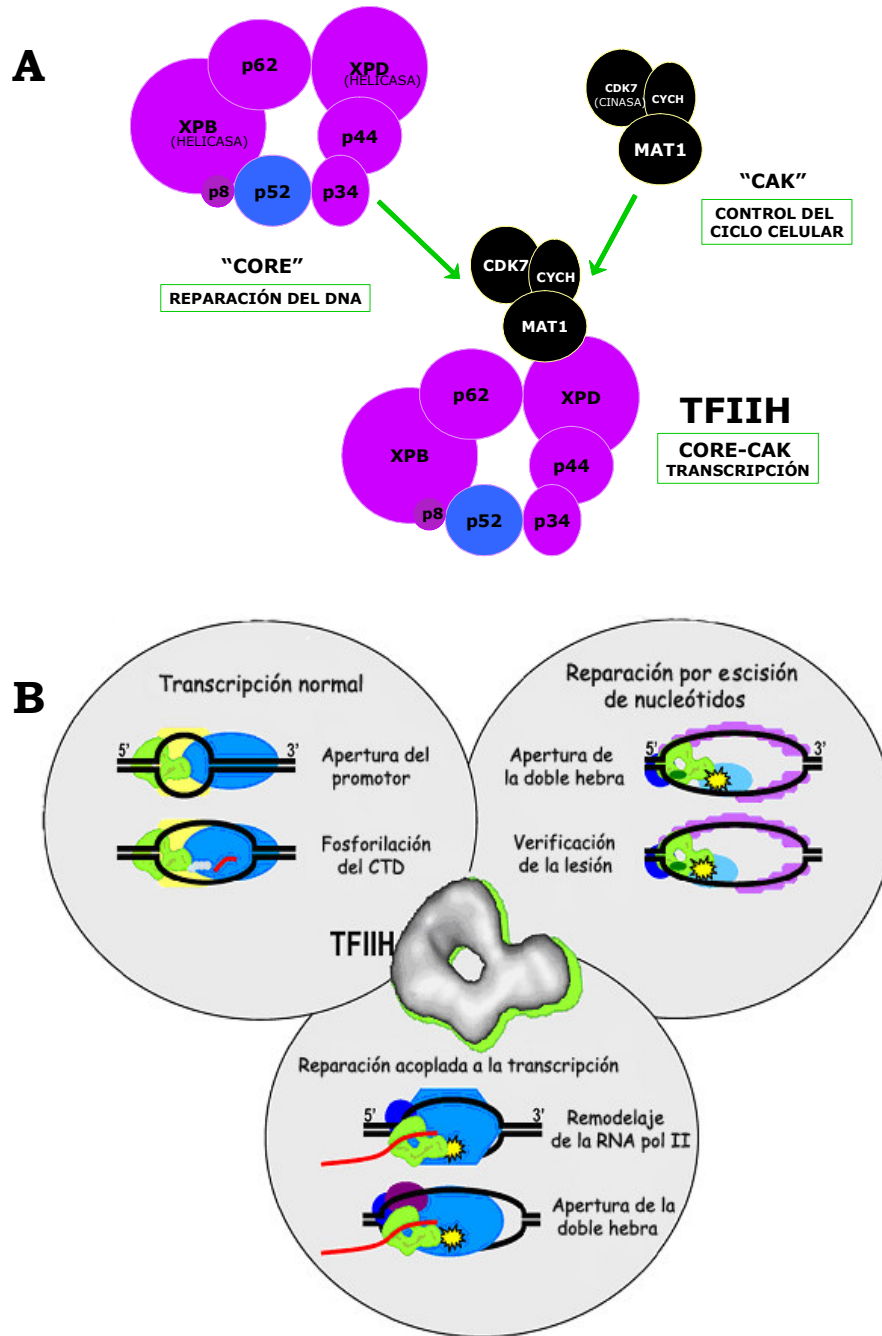


Figura 1. Estructura y funciones celulares de TFIIH. (A) TFIIH es un complejo multiprotéico formado por los subcomplejos “CAK” Y “CORE” que participan diferencialmente en la transcripción, la reparación del DNA y la regulación del ciclo celular. (B) TFIIH es un complejo multifuncional que participa en la transcripción normal, la reparación por escisión de nucleótidos (REN), y la reparación acoplada a la transcripción y tiene múltiples funciones en cada uno de estos procesos. La estructura de TFIIH obtenida por microscopía electrónica de mediana resolución (Schultz et al., 2000) muestra que, TFIIH tiene forma de anillo con una protuberancia que contiene el complejo de cinasa CAK (Modificado de Fuss y Cooper, 2006).

iniciación consiste en el reconocimiento de la región promotora y el ensamblaje del complejo de iniciación (que se compone de factores multiprotéicos denominados TFIIx y la RNA pol II). Para tal efecto, el promotor es reconocido por la proteína de unión a la caja TATA (TBP) y sus proteínas asociadas (TAFs) (la TBP y las TAFs forman el complejo TFIID). Después se reclutan TFIIA y TFIIB, mientras que TFIIF se une a la RNA pol II permitiendo su unión al complejo de iniciación. Finalmente, TFIIIE se une a dicho complejo y recluta a TFIIH (Dvir et al., 2001) mediante la interacción directa con la proteína XPB (Maxon et al., 1994). Una vez establecida la maquinaria basal se separa la doble hebra de DNA (formación del complejo abierto), y dicho proceso depende de la actividad de helicasa que reside en el complejo TFIIH, (en particular de la helicasa XPB) (Coin et al., 1999). Una vez separadas las hebras de DNA se inicia la síntesis de RNAm por medio de la formación de un enlace fosfodiéster, evento para el cual la actividad de XPB también es esencial (Bradsher et al., 2000). Durante el proceso de *elongación*, el CTD de la subunidad mayor de la RNA pol II es fosforilado por Cdk7 en la serina 5 del heptapéptido repetido (Dahmus, 1995). Esta fosforilación es necesaria para que la polimerasa se libere de los TFIIx y se escape del promotor (Gerber et al., 1995, Fisher, 2005; Rossignol et al., 1997). Durante la primera fase de la elongación, la polimerasa no puede “escapar” del promotor y sintetiza fragmentos cortos de RNA, lo que se denomina transcripción abortiva (Dvir et al., 2001). Mediante la acción de la helicasa XPB y la fosforilación de la serina 2 del CTD por el complejo Cdk9-CycD, la RNA pol II finalmente es liberada del promotor y se inicia la elongación propiamente dicha (Bradsher et al., 2000; Moreland et al., 1999). La fase de *terminación* es un proceso menos claro en el cual TFIIH no participa. Al parecer, es un fenómeno que se da por la disminución en la afinidad de la RNA pol II por el templado y la acción de complejos remodeladores de la cromatina, también involucrados en la elongación (Lewin, 1995) (Fig. 2).

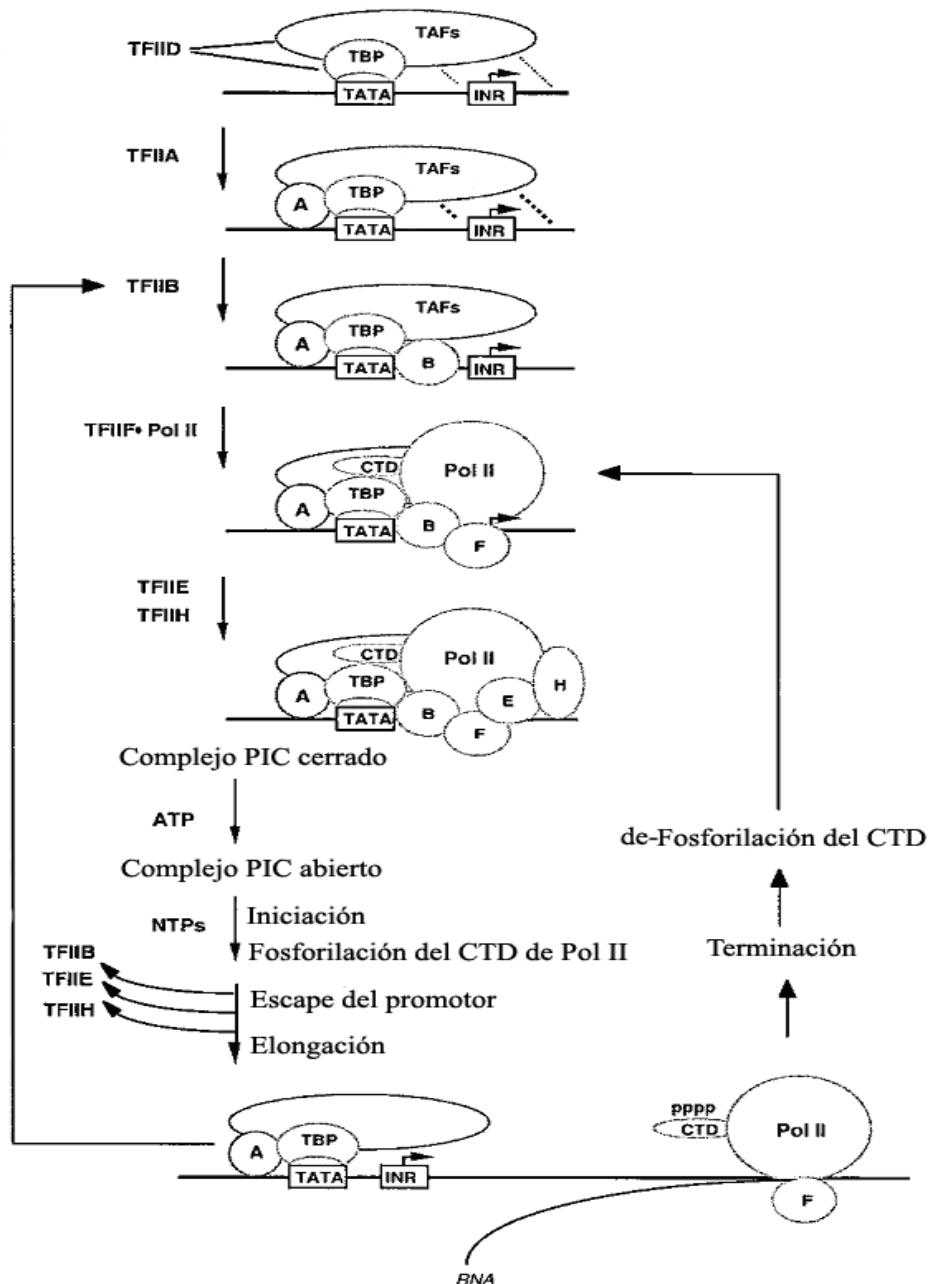


Figura 2. Modelo de función y ensamblaje, por pasos, del complejo de pre-iniciación (PIC). El ensamblaje del PIC en un promotor de clase II (que contiene una caja TATA) se inicia con la unión de TFIID a través de la interacción de la TBP con la caja TATA y de los TAFs con el iniciador (INR) u otros elementos localizados río abajo del promotor. Estas interacciones son estabilizadas por TFIIA. Después TFIIB estabiliza el complejo TBP-TATA y permite el reclutamiento de TFIIF, RNA Pol II, TFIIE y TFIIH, de manera secuencial ó en forma de una holoenzima preformada en conjunto con los componentes coactivadores del Mediator (no se muestra en la figura). La apertura del promotor es dependiente de ATP y requiere la actividad de ATPasa de TFIIE. Esta es estimulada por TFIIE para formar el complejo abierto, que a su vez es competente para iniciar la transcripción después de la adición de los ribonucleótidos trifosfato (NTPs). Durante la iniciación o la elongación temprana, el dominio CTD de la RNA pol II, es fosforilado por la actividad de cinasa de CDK7 de TFIIH. La RNA pol II hiperfosforilada en asociación con TFIIF permite el escape del promotor y la elongación de la transcripción, mientras que TFIIB, IIE y IIH se disocian. Después de la terminación, la reiniciación requiere una de-fosforilación de la RNA pol II por una CTD-fosfatasa (modificado de Martínez, 2002).

Transcripción por la RNA polimerasa I

La RNA polimerasa I transcribe el RNA ribosomal (rRNA). La holoenzima que forma la RNA pol I se compone además de la polimerasa I, del complejo TIF-IB-SL1, que contiene a la TBP y a tres factores específicos de la RNA pol I asociados a la TBP (TAFs). El complejo TIF-IB-SL1 interactúa con el factor UBF (upstream binding factor), permitiendo el reclutamiento de la RNA Pol I y factores auxiliares al promotor del grupo de los genes ribosomales. Además, varios factores incluyendo componentes de la maquinaria de replicación del DNA y modificadores de la cromatina, interactúan con la holoenzima de la RNA pol I. Interesantemente, TFIID también participa en la transcripción por la RNA pol I. TFIID se ha encontrado localizado mayoritariamente en el nucleoplasma, pero una fracción significativa se encuentra localizada en el nucleolo, en donde se transcriben los rRNAs. También se ha visto que en experimentos de fraccionamiento celular y co-inmunoprecipitaciones, TFIID puede asociarse a una subpoblación de la RNA Pol I así como al factor TIF-IB-SL1. Sin embargo, en experimentos *in vitro*, se ha observado que no son necesarias las actividades enzimáticas de TFIID (como ATPasa, helicasa ó cinasa) para su participación en la transcripción por la RNA Pol I. De cualquier manera se ha establecido que TFIID sí es importante para el escape de la RNA pol I del promotor, así como para los procesos de elongación y para el reinicio de la transcripción (revisado en Zurita y Merino, 2003).

Reparación del DNA

El DNA es la macromolécula que sirve como reservorio de la información genética. El mantenimiento de la integridad de dicha información es indispensable para la sobrevivencia de las células y en última instancia del organismo completo. El DNA se encuentra expuesto a diferentes agentes físicos y químicos que dañan su estructura. Su

integridad depende de un sistema de replicación de alta fidelidad y de una serie de sistemas de reparación entre los que se encuentra la REN.

La REN se encarga de la remoción de pequeñas distorsiones en el DNA causadas principalmente por la irradiación ultravioleta, como la formación de dímeros de pirimidina y de 6-4-fotoproductos (Fig. 3). Se caracteriza por ser una de las vías de reparación más complejas ya que en ella participan por lo menos 20 proteínas. La REN se subdivide a su vez en dos tipos de reparación; una más general que se encarga de la reparación de todo el genoma, y otra acoplada a la transcripción que se encarga de reparar rápidamente los daños generados en las regiones transcripcionalmente activas (Guo et al., 1998; Mullenders, 1998; Fuss y Cooper, 2006). Ambos mecanismos reconocen la distorsión causada por la presencia del dímero de timina en el DNA a través de diferentes proteínas. En ambos casos las proteínas que reconocen el daño reclutan a TFIIH, que en el caso de la reparación global se trata de XPC-hHR23B y el complejo de ligasa de ubiquitina CUL4-DDB-ROC1 (Wang et al., 2006). Entonces, TFIIH se encarga de separar la doble hebra de DNA en la zona dañada por medio de la actividad de helicasa de XPD y la hidrólisis de ATP mediada por XPB (Coin et al., 2007). Enseguida se reclutan los factores XPA y RPA que se encargan de verificar el daño y estabilizar el complejo. Posteriormente, las endonucleasas de cadena sencilla XPG (3') y XPF/ERCC1 (5') cortan los extremos del fragmento dañado generando oligonucleótidos de 24 a 32 residuos. Finalmente, la DNA polimerasa es la responsable de sintetizar el fragmento escindido utilizando la cadena intacta como molde (Lehmann, 1995; Mu et al., 1997; Snow, 1997; Riedl et al., 2003; Fuss y Cooper, 2006). Ahora se sabe que la proteína p8 se une al "core" de TFIIH, dándole estabilidad al complejo (Giglia-Mari et al., 2004). Además, su presencia es crítica para el proceso de reparación; ya que, estimula la apertura de la doble hebra alrededor del daño, lo que es necesario para el reclutamiento de XPA (Coin et al., 2006). En la reparación acoplada a la transcripción, el daño al DNA es reconocido por el arresto de la RNA pol II en el sitio del daño. Esto a su vez ayuda al reclutamiento de CSB y posteriormente al de

TFIIH y XPG (Lindahl et al., 1997). Entonces la vía de reparación que se desencadena, es aquella descrita anteriormente (ver arriba).

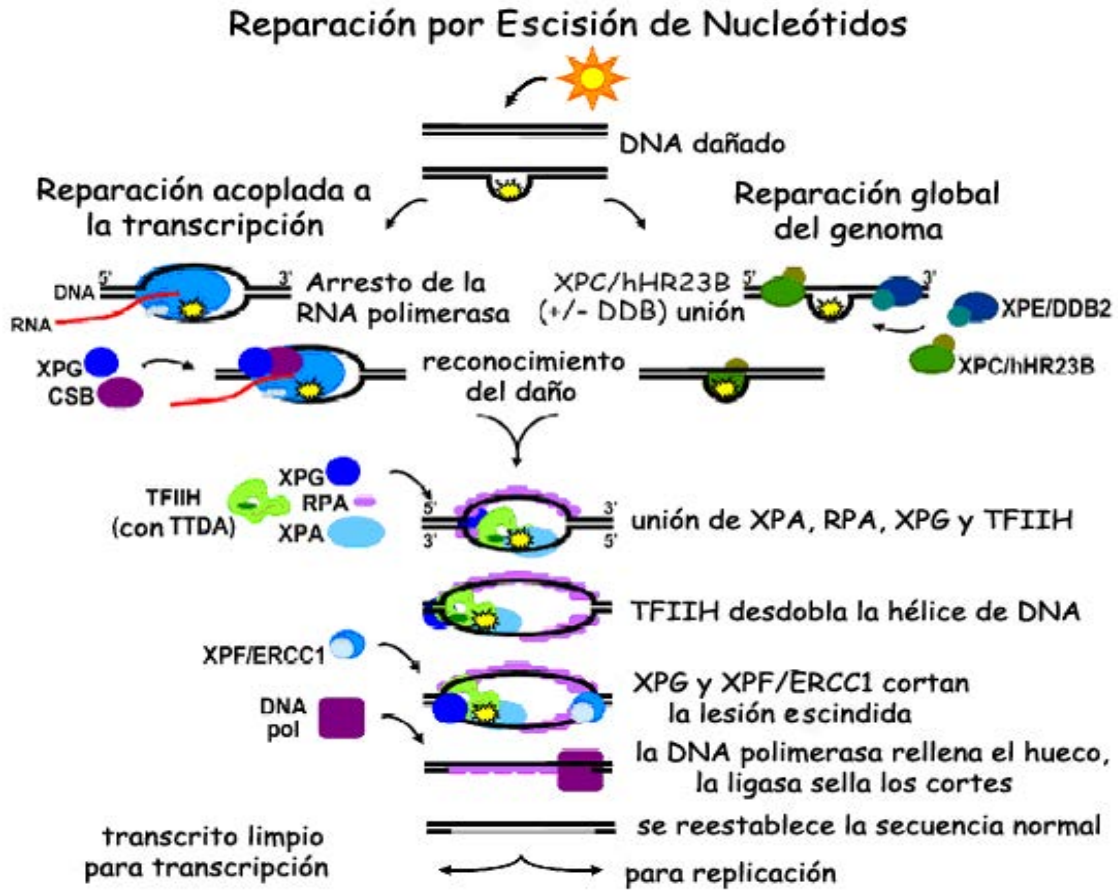


Figura 3. Modelo de Reparación por escisión de nucleótidos. Cuando el DNA es dañado por los rayos solares, el daño es reconocido por diferentes vías, dependiendo de si el DNA es activo transcripcionalmente (reparación acoplada a la transcripción) o no (reparación global del genoma). Después de los pasos iniciales de reconocimiento, el daño es reparado de manera similar dando como resultado la recuperación de la secuencia normal de nucleótidos (Modificado de Fuss y Cooper 2006, PLoS Biol 4(6): e203).

Mutaciones en TFIIH y las enfermedades que causan en humanos

La importancia que tiene TFIIH en los procesos de transcripción y reparación del DNA y por lo tanto para la vida misma, se ha evidenciado gracias a que mutaciones en cualquiera de los genes *XPB* ó *XPD* pueden dar origen a tres enfermedades humanas hereditarias: *Xeroderma pigmentosum* (XP), *Tricotiodistrofia* (TTD) y *Xeroderma pigmentosum con*

Síndrome de Cockayne (XP/SC) (Lehmann, 2002; Lehmann, 2002; Giglia-Mari et al., 2004). Mutaciones en la subunidad p8 (factor pequeño encargado de darle estabilidad a TFIIH) también han sido asociadas a TTD (Lehmann, 2003).

Las mutaciones en las helicasas XPD y, en particular, XPB, se han encontrado a una frecuencia muy baja (Weeda et al., 1990; Bradsher et al., 2000). Esto habla de que son proteínas esenciales para la vida y que cualquier cambio que perturba su función y/o estructura, en la mayoría de los casos, es homócigo letal y resulta en la muerte del organismo (de Boer et al., 1998; Park et al., 1992; de Boer y Hoeijmakers, 1999). Sin embargo, en algunos casos, se combinan dos mutaciones diferentes en el mismo gen (organismos heteroalélicos); la proteína mutante conserva una función parcial y en consecuencia el individuo logra sobrevivir desarrollando alguna de éstas patologías. Las mutaciones en p8, por el contrario, no son homócigas letales y sólo están asociadas a una disminución de la concentración nuclear del complejo con el consecuente desarrollo de la enfermedad TTD (Giglia-Mari et al., 2004; Coin et al., 2006). Estas enfermedades causan fenotipos pleiotrópicos debido a que el gen afectado tiene varias funciones durante el desarrollo, lo que dificulta la interpretación de los fenotipos observados en los pacientes.

La TTD, el XP y el SC pueden ser causadas por mutaciones en otros genes que participan en la reparación del DNA y/o en la transcripción, además de los componentes de TFIIH. Es importante recalcar que los cuadros clínicos de cada una de estas enfermedades presentan síntomas en común, aunque algunas manifestaciones clínicas sean particulares de cada una de ellas (Tabla I).

Tabla I. Principales manifestaciones clínicas de la tricotiodistrofia (TTD), el xeroderma pigmentosum (XP) y el síndrome de Cockayne (SC)

Manifestaciones clínicas	XP	SC	TTD
Dermatológicas			
Fotosensibilidad	++	+	+/-
Susceptibilidad a cáncer de piel	++	-	-
Pigmentación anormal de la piel	++	-	-
Pelo quebradizo	-	-	+
Neurológicas			
Retraso mental	+/-	+	+/-
Microcefalia	+/-	+	+/-
Enfermedades neurosensoriales	+/-	+	+/-
Ataxia	+/-	+	+/-
Movimientos espasmódicos	+/-	+	+/-
Neuropatológicas			
Muerte neuronal	+/-	+/-	+
Desmielinización	-	+	+/-
Otras			
Crecimiento retardado	+/-	+	+/-
Inmadurez sexual	+/-	+	+/-
Sensibilidad a UV	++	+	+/-

(Seroz et al., 1995; Bergmann y Egly, 2001).

Entre las manifestaciones clínicas de la TTD se encuentra la del pelo quebradizo. Este fenotipo es causado por una reducción en la expresión de proteínas con alto contenido de cisteínas o azufre, como lo son algunas queratinas (Perez et al., 1999). Los pacientes con TTD también tienen uñas quebradizas, una disminución en la fertilidad, además de cierto grado de retraso mental causado por defectos en el sistema nervioso. Esto último, posiblemente esté relacionado con una falta de mielinización de las fibras nerviosas por los oligodendrocitos. Por otra parte, estos pacientes muestran una reducción de talla, ictiosis

(descamación de la piel) y en algunos casos, sensibilidad a radiación UV (Lehmann, 1995; Seroz et al., 1995). Los fenotipos característicos de este síndrome se han relacionado principalmente a fallas en la transcripción génica (Perez et al., 1999; Begmann y Egly, 2001).

En el caso de XP, las manifestaciones clínicas se caracterizan por una alta predisposición a desarrollar cáncer de piel y ojos (hasta 1000 veces más que en el SC y la TTD), así como una pigmentación anormal de la piel debido a una sensibilidad extrema a la radiación UV (Seroz et al., 1995; Lehmann 2003; Bohr et al., 2005). Estos fenotipos se han asociado a deficiencias en la reparación global del DNA.

Finalmente, el SC se caracteriza por manifestaciones neurológicas y neuropatológicas, entre las cuales destacan la desmielinización y muerte neuronal, presencia de retraso mental, atrofia retinal, así como una deficiencia en el crecimiento e inmadurez sexual (Lehmann, 1995; Seroz et al., 1995). Este síndrome se ha atribuido principalmente a una deficiencia en la reparación acoplada a la transcripción y a la reparación global del DNA (van Hoffen et al., 1999).

D. melanogaster como modelo biológico para el estudio de enfermedades complejas

A la fecha, la relación compleja entre el genotipo y el fenotipo de las enfermedades antes mencionadas, no ha podido descifrarse. Sin embargo, se considera que existen varios factores que influyen dentro de esta complejidad. El primero, es el hecho de que los genes mutados, (en este caso las subunidades de TFIIH), tienen varias funciones cruciales dentro de la célula. Esto explicaría por qué se encuentran alterados simultáneamente diferentes mecanismos celulares. Además, la actividad de dichas subunidades depende de la formación del complejo TFIIH, por lo que al estar mutada una proteína del complejo pudiera alterarse también, la actividad de alguna otra subunidad. Finalmente, estas enfermedades son causadas cuando los dos alelos del mismo gen están mutados; por lo tanto, podría haber interacciones

alélicas y fenotipos diferentes según la combinación de alelos de que se trate.

En particular el uso de la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster* como modelo experimental nos brinda una serie de ventajas y un panorama amplio y versátil para el estudio del papel de TFIIH. Al igual que otros factores, éste también se encuentra muy conservado durante el proceso de evolución de los organismos eucariotes.

D. melanogaster posee como principales ventajas: un desarrollo rápido y un tiempo de vida corto, genera un gran número de progeñe, se disponen de gran cantidad de técnicas y herramientas para manipular su expresión genética y, con relativa facilidad, se pueden generar organismos mutantes (Matthews et al., 2005; Venken y Bellen 2005). Actualmente se conoce que cerca del 70% de los genes involucrados en alguna enfermedad identificada en humanos están presentes en *Drosophila* (Kornberg y Krasnow, 2000; Reiter, et al., 2001). Esto permite estudiar los procesos genéticos y moleculares causantes de dichas enfermedades aprovechando todas las ventajas que este organismo nos ofrece, como en el caso de las enfermedades hereditarias asociadas al factor TFIIH.

En suma, las similitudes entre los humanos y las moscas nos permiten utilizarlas como modelo biológico de estudio de enfermedades que ocurren en los humanos. Con la gran ventaja de que podemos reproducirlas y manipularlas genéticamente en el laboratorio, generar una buena colección de mutantes que nos permitan detectar dominios de actividad de una proteína específica, y monitorear la relevancia de dicha actividad por medio de los fenotipos que se generen en el organismo completo. Con ello ayudamos a entender este tipo de enfermedades complicadas y, al mismo tiempo, contribuimos al entendimiento general de los procesos biológicos que ocurren durante el desarrollo de un organismo.

TFIIH en Drosophila melanogaster

Actualmente, homólogos de los 10 componentes del TFIIH humano se han identificado en *D. melanogaster*. El homólogo de XPB es el gen *haywire* (*hay*; Mounkes et al., 1992; Merino et al., 2002). Los homólogos en *Drosophila* de XPD (DmXPD), p62 y p52 (*marionette*) fueron aislados y caracterizados por nuestro grupo de investigación (Reynaud et al., 1999; Sandoval y Zurita 2001; Castro et al., 2002; Fregoso et al., 2007). Todos los demás componentes de TFIIH en la mosca están descritos en la edición de su genoma. En el 2002, nuestro grupo describió que moscas mutantes en *hay* reproducen fenotipos de defectos en transcripción y reparación parecidos a los que ocurren en humanos con TTD y CS. Por ejemplo, encontró que estas moscas tienen las quetas (estructuras mecanosensoriales en forma de pelos) defectuosas, ramificadas y quebradizas, además de que poseen defectos en la cutícula (Fig. 4). Estos defectos se deben a fallas en la transcripción y, por lo tanto, en la producción de proteínas de alta demanda; lo mismo ocurre en el caso del cabello quebradizo en los enfermos con TTD. También se observó que las moscas presentan una mayor frecuencia de apoptosis en el sistema nervioso, semejante a lo que ocurre en los enfermos de SC y TTD con anomalías en el sistema nervioso central y retraso mental (Merino et al., 2002).

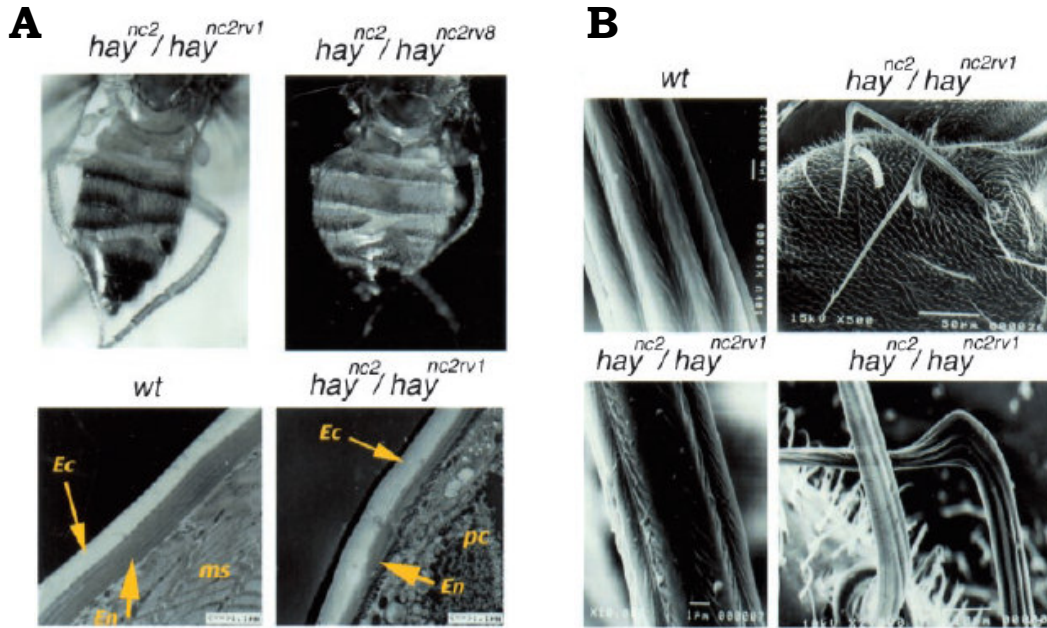


Figura 4. Fenotipos de moscas heteroalélicas mutantes en *hay*. (A) Vista dorsal de moscas heteroalélicas para *hay* con deformaciones en la cutícula abdominal (páneos superiores) y microscopía electrónica de preparaciones cuticulares de moscas silvestres y mutantes (páneos inferiores). Las flechas indican las capas exocuticular (Ec) y endocuticular (En), *ms* es músculo, y *pc* es parénquima. (B) Fenotipo de las quetas. Micrografías de barrido de quetas silvestres y del fenotipo “brittle bristles” presente en el escutelo de las moscas mutantes heteroalélicas para *hay* (tomado de Merino et al., 2002).

La subunidad p52 de TFIIH

Aparte de las mutaciones en las helicasas XPB y XPD, y en la subunidad p8, no se han encontrado mutaciones en otros componentes de TFIIH en organismos multicelulares. Puesto que mutaciones en otras subunidades, probablemente, sean más deletéreas y no permitan la generación de organismos viables, no existen análisis genéticos de estos componentes.

Se ha descrito que la subunidad p52 de humano dentro del complejo TFIIH interactúa físicamente *in vitro* con la helicasa XPB por medio de su región carboxilo terminal. De esta manera p52 ancla XPB al complejo y, probablemente, regula su actividad (Jawhari et al., 2002). También se ha demostrado que la subunidad p8, que principalmente participa en la REN, interactúa directamente con las subunidades p52 y XPD dentro del complejo TFIIH (Coin et al., 2006). El hecho de que no

se hayan encontrado mutantes multicelulares de p52 nos sugiere que mutaciones en esta subunidad pudieran ser más graves para la viabilidad del organismo que mutaciones en las subunidades XPB, XPD y/o p8.

La mosca de la fruta, *D. melanogaster*, es un excelente modelo para estudiar y caracterizar la función de p52 dentro del complejo TFIIH durante el desarrollo de la mosca, ya que contamos con mutantes semi-letales de este factor. Así pues, con el propósito de profundizar globalmente nuestro entendimiento sobre la función y el papel biológico de p52 y, consecuentemente de TFIIH, realizamos en le presente trabajo un análisis detallado, a nivel genético, bioquímico y molecular del homólogo de p52 en *Dm* (*Dmp52*).

JUSTIFICACIÓN

Ya ha sido demostrado por Mounkes (Mounkes et al., 1992) y nuestro grupo de investigación (Merino et al., 2002) que *D. melanogaster* es un excelente modelo para caracterizar los diferentes papeles que juega el factor TFIIH durante el desarrollo. Estamos convencidos de que usar a *Drosophila* como sistema modelo para el estudio de este factor multiprotéico, y todos los fenotipos que se generan a partir de mutantes en sus subunidades, ayudará a decifrar la relación entre genotipo-fenotipo de las enfermedades que éstas causan en humanos. Sin embargo, aún es necesaria una caracterización genética y molecular más detallada de todo el complejo TFIIH en la mosca. Además, sabemos que no existen reportes de enfermedades humanas relacionadas a mutaciones en otras subunidades de TFIIH aparte de XPB, XPD y p8/TTDA. Esta falta de conocimiento provoca una ausencia de análisis genético de las subunidades del “core” p62, p52, p44 y p34 en organismos multicelulares.

Por ésto, en este trabajo, contribuimos de manera importante a la caracterización en *D. melanogaster* de fenotipos asociados a fallas en la transcripción y/o reparación del DNA, lo que permitirá establecer a este organismo como un mejor modelo para el análisis y entendimiento de enfermedades que se presentan en humanos causadas por alteraciones en los procesos de transcripción y/o reparación.

HIPÓTESIS

Sabemos que p52 es una subunidad del factor TFIIH y que mutaciones en otras subunidades de este factor en humanos generan síndromes asociados a defectos en transcripción y reparación. Por lo tanto, consideramos que mutantes en *D. melanogaster* en el homólogo de p52 de humano, nos permitirán analizar fenotipos similares asociados a dichas enfermedades, y caracterizar *in vivo* el papel que juega esta subunidad dentro del complejo TFIIH.

OBJETIVOS

- Demostrar que las líneas mutantes *marionette* de *D. melanogaster* son mutantes en p52.
- Caracterizar los fenotipos que presentan mutaciones en p52 de *D. melanogaster*.
- Analizar la homología entre las proteínas p52 de humano y *Drosophila* para diseñar las estrategias para rescatar algunos de los fenotipos de moscas mutantes en p52.
- Medir las actividades intrínsecas del complejo TFIIH *in vitro* en presencia de las versiones mutantes de *Dmp52* introducidas en el gen de humano.
- Medir la estabilidad del complejo TFIIH *in vivo* en presencia de las distintas versiones mutantes de p52 en *Drosophila*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Líneas de Drosophila melanogaster empleadas

Las líneas usadas como control en todos los experimentos fueron *OreR*, *W¹¹¹⁸* y *red e*. Las líneas de Elementos P usadas fueron *EP3605* (FlyBase ID FBti0011698) y *EP0572* (FlyBase ID FBti0007856). Los alelos *marionette* (*mrn*) usados fueron *mrn¹*, *mrn³*, y *mrn⁵* *red e/ TM6B* (FlyBase ID FBgn0002840), que nos fueron donados muy amablemente por Margaret Fuller. La línea doble balanceada empleada fue *W¹¹¹⁸; Sp/Cyo; TM2/MKRS*. *Cyo*, *MKRS*, *TM2*, y *TM6B* son cromosomas balanceadores que contienen rearrreglos genómicos que impiden la recombinación homóloga, permitiendo conservar de manera estable alelos en el cromosoma 2 en el caso de *Cyo*, y en el cromosoma 3 en el caso de los 3 restantes.

Ensayo de complementación de mutantes marionette

Para los ensayos de complementación, se realizaron cruzas entre los diferentes alelos incluyendo *mrn¹*, *mrn³* y *mrn⁵* *red e/ TM6B*, *EP3605* y *EP0572 /TM6B*. Al final se contó el número total de progenie y se calculó la clase esperada considerando la media de las dos clases mayoritarias observadas. En las cruzas buscamos progenie que no tenía el marcador *tubby* para saber si había complementación. Para cuantificar el fenotipo de las larvas, consideramos las larvas no *tubby* y evaluamos directamente el porcentaje de generación de tumores.

$+/+; +/+; mrn/TM6B \quad \times \quad +/y; +/+; mrn/TM6B$



$+/+; +/+; mrn/mrn$

Se muestra la progenie **no *tubby*** que se generaría en caso de haber complementación. Es importante recordar que sólo en la combinación heteroalélica *mrn/EP3605* hubo complementación. En donde *mrn* es cualquiera de las mutantes: *mrn¹*, *mrn³*, *mrn⁵*, *EP3605* ó *EP0572*.

Ensayo de sensibilidad a irradiación con luz UV

Se irradiaron larvas de tercer instar *red e/TM6B*, *mrn¹*, *mrn³* y *mrn⁵* *red e/TM6B* y *EP3605/TM6B*, a diferentes intensidades de luz UV-B (joules/m²) usando un UV stratalinker 2400 (Stratagene). Después se dejó que las larvas se desarrollaran hasta alcanzar el estadio adulto y se contó el porcentaje de la población que logró emerger en proporción al total de larvas irradiadas.

Disección de tejidos y tinciones

Las disecciones de las larvas, los faratos y las gónadas sexuales de adulto fueron realizadas en buffer PBS. Los ovarios se montaron directamente en Citifluor al 50% (Ted Pella, Inc.), mientras que los testículos se congelaron en N₂ líquido, se fijaron en MeOH (-20°C) y acetona (-20°C), se lavaron exhaustivamente con PBS-T 0.1% y se montaron en Citifluor al 50%. Ambas gónadas sexuales se tiñeron con colorante DAPI (1:10,000) y se lavaron con PBST 0.1%. Todas las fotografías se tomaron en un microscopio óptico y de fluorescencia convencional.

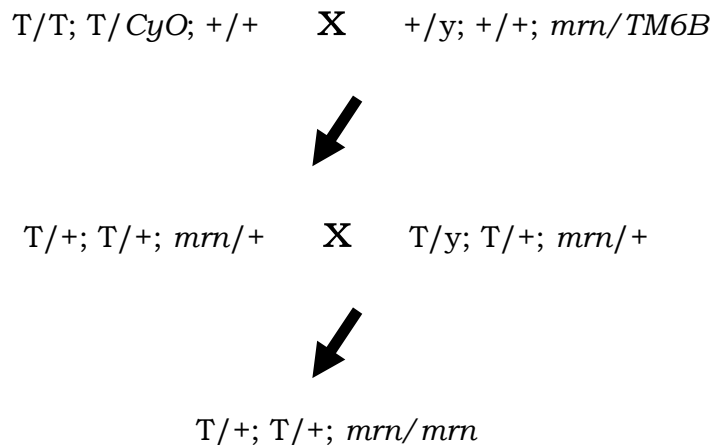
Generación y análisis de moscas transgénicas

Para la producción de moscas transgénicas se obtuvieron los cDNAs silvestres de *Dmp52* y *hp52* por medio de una reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Se usaron oligonucleótidos específicos sobre cDNA de *Drosophila wt* en el caso de la primera, y del plásmido pSG514-*p52h* en el caso de la segunda (donado por el grupo del Dr. Jean Marc Egly). Las secuencias obtenidas de ésta manera se clonaron por separado en el vector de expresión constitutiva pCaSper *hsp83* y se secuenciaron para corroborar su integridad. Las moscas transgénicas fueron producidas siguiendo un protocolo de

microinyección estándar (Spradling y Rubin 1982). Se establecieron y mapearon varias líneas transgénicas independientes: una *Dmp52* y dos *hp52* en el cromosoma dos y, dos *Dmp52* y dos *hp52* en el cromosoma X. Para mapear dichas líneas se utilizaron moscas con cromosomas balanceadores para los cromosomas 2 y 3. Después, se realizaron las cruzas correspondientes para la generación de moscas con más de una copia del mismo transgen. Para corroborar la expresión de los transgenes en las diferentes líneas se realizaron experimentos de RT-PCR usando oligonucleótidos que permitían detectar la diferencia entre la expresión del transgen y el gen endógeno.

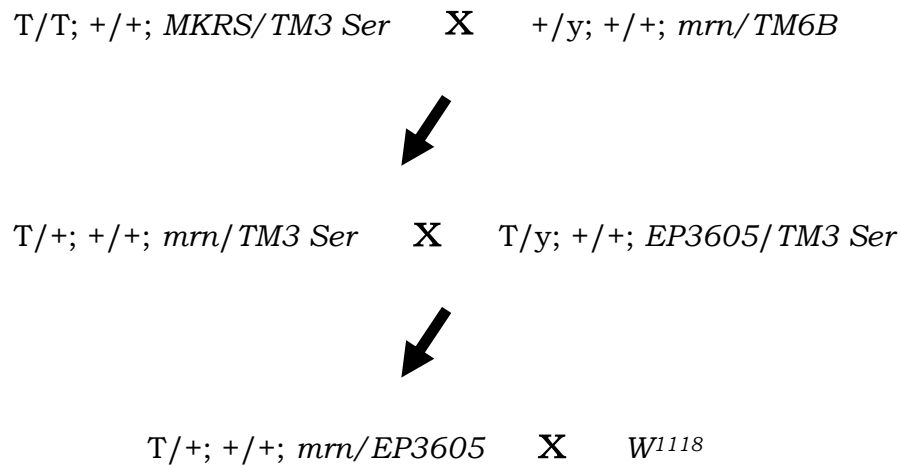
Rescate de letalidad y fertilidad de mutantes mrn con diferentes líneas transgénicas

Para los experimentos de rescate de la letalidad se realizaron cruzas entre las mutantes *mrn* heterócigas y las diferentes líneas transgénicas. En la progenie se buscaron moscas homócigas para las mutaciones *Dmp52* que tuvieran al menos una copia del transgen. El porcentaje que se muestra en los resultados representa el rescate de los adultos homócigos comparado con el total esperado en caso de una complementación total (números entre paréntesis).



Por simplicidad sólo se muestra una de las posibles combinaciones de “número de copias del transgen”. Estas moscas se monitorean por ser *e* (*ebony*). En donde T es cualquier transgen: *Dmp52*, *hp52* y *mrn* es cualquiera de las mutantes: *mrn*¹, *mrn*³ ó *mrn*⁵

En el caso del rescate de la esterilidad, se generaron moscas heteroalélicas *mrn*¹, *mrn*³ y *mrn*⁵/*EP3605* y moscas *EP3605/EP3605* que fueran al mismo tiempo heterócigas para el transgen. Estos adultos se retaron con moscas *wt* del sexo opuesto y se midió la capacidad para generar progenie. El porcentaje que se muestra en los resultados es el número de moscas individuales que fueron fértiles y capaces de generar progenie que se desarrolló hasta el estadio de larva comparado con el número de moscas totales evaluadas.



En donde T es cualquier transgene: *Dmp52*, *hp52* y *mrn* es cualquiera de las mutantes: *mrn*¹, *mrn*³, *mrn*⁵ ó *EP3605*

Inmunohistoquímica y cuantificación del nivel de fluorescencia en núcleos de glándulas salivales de mutantes Dmp52 y wt

Se disectaron glándulas salivales de larvas de tercer instar silvestres y heteroalélicas *EP3605/mrn*¹, *mrn*³ y *mrn*⁵, y se tiñeron como se describió previamente (Reynaud et al., 1999). Para cuantificar la fluorescencia se siguió un protocolo publicado con anterioridad (Reynaud et al., 1999). En resumen, se usó microscopía confocal para visualizar la fluorescencia de XPD, XPB, TBP y de las histonas. Se obtuvieron imágenes representativas de la fluorescencia de las

proteínas en secciones nucleares de glándulas silvestres y de cada genotipo *Dmp52*. Se analizó un área nuclear de 156 pixeles para cada núcleo de cada genotipo usando el programa de conteo de fotones (photon-counting). Se graficaron las frecuencias de fluorescencia de las proteínas en forma de histograma. La fluorescencia relativa se mostró como una barra de la gráfica; la frecuencia promedio de XPB/TBP, XPB/histonas, XPD/TBP y XPD/histonas en el eje de las *y* y, cada genotipo de *Dmp52* en el eje de las *x*. Los errores estándar se indican como una barra de la gráfica en cada punto.

Preparación de cromosomas mitóticos de neuroblastos larvarios

Se obtuvieron cromosomas a partir de neuroblastos larvarios heteroalélicos *EP3605/mrn¹*, *mrn³* y *mrn⁵* y heterocigos *EP3605/+* siguiendo el protocolo reportado previamente (Silva et al., 2004). En resumen, se disectaron los cerebros larvarios en una solución de cloruro de sodio al 0.7% y se incubaron con colchicina por 30 minutos. Después, las preparaciones se trataron con citrato de sodio al 0.5% y se fijaron en formaldehído al 2%, ácido acético al 40% y se aplastaron (squash). Las laminillas se congelaron, se secaron, se montaron y se tiñeron con DAPI. Los cromosomas se visualizaron en un microscopio de fluorescencia.

Producción de baculovirus recombinantes

Se introdujeron las mutaciones en el cDNA *p52* de humano usando una estrategia de mutagénesis sitio dirigida (Merino et al., 1992). Para el alelo *mrn⁵*, se realizó un cambio de A 229 a T (K77/stop), para *mrn³* un cambio de C 604 a T (Q202/stop), y para *mrn¹* un cambio de G 928 a A (E310K). Se generaron nuevas mutantes, una cambiando de G 928 a A además de CG 940-1 a GA (E310K/R314D) y otra sustituyendo una A 929 por G (E310G). Los cDNAs mutados se clonaron usando las enzimas de restricción apropiadas en el vector

pFastBac1 (Invitrogen). Dichas construcciones se secuenciaron para corroborar la presencia de las mutaciones. Se produjeron los baculovirus recombinantes correspondientes con el sistema “Bac to Bac” (Invitrogen), se purificaron por placas y se amplificaron en tres etapas de crecimiento (3 ml, 25 ml y 250 ml-1L de cultivo). Finalmente, se prepararon “stocks” virales y se estandarizaron las condiciones de producción: tasa y tiempo de infección, y selección de línea celular y medio de crecimiento óptimo.

Purificación de complejos TFIID recombinantes

Preparación de extracto de células de insecto infectadas con baculovirus

Se infectaron 1×10^8 células de insecto H5 ó Sf9 con combinaciones de baculovirus que expresan XPB, XPD, p62, p52 ó las diferentes versiones mutantes, p44, p34, p8, cdk7, ciclina H y MAT1 según se indica. Se colectaron las células a las 48 horas post-infección, se lavaron una vez con PBS 1X, 30% glicerol, se homogenizaron en 10 ml de buffer A (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 20% glicerol, 0.1% Nonidet P40, 5 mM β -mercaptoethanol) y se centrifugaron a 14,000g por 30 min a 4°C. El sobrenadante se usó directamente para la purificación de TFIID (Coin y Egly, 2003; Lainé et al., 2006).

Cromatografía por columna de heparina

El extracto crudo de células de insecto se pasó por una columna de heparina Ultra-gel (Sepracor) pre-equilibrada con buffer A. Después de un lavado exhaustivo con buffer A 300mM NaCl las proteínas se eluyeron con buffer A 500 mM NaCl. Las fracciones eluidas se dializaron por 2 horas contra 50 mM Tris-HCl pH 7.9, 50 mM KCl, 20% glicerol, 0.1 mM EDTA, y 0.5 mM dithiothreitol (Coin y Egly, 2003; Lainé et al., 2006).

Inmunoprecipitación de TFIIH

De 10 a 12 ml (10 mg de proteína) de la fracción dializada se incubaron toda la noche a 4°C con 400 µg de anticuerpo monoclonal puro 1H5 (anti-p44) entrecruzado con 200 µl de proteína A-Sefarosa CL-4B (Amersham Pharmacia Biotech AB). Después de centrifugar 5 min a 1500 rpm a 4°C, se eliminó el sobrenadante y la resina se lavó 3 veces con 10 volúmenes de perlas de buffer F (25 mM Tris-HCl pH 7.9, 5 mM MgCl₂, 15% glicerol, 0.2 mM DTT, 0.5 mM EDTA, y 0.1% NP-40) conteniendo 0.4 M KCl, y 2 veces con buffer F conteniendo 0.05 M KCl. El material absorbido se eluyó por 6 horas a 4°C en 400 µl de buffer F 0.05 M KCl, 0.01% Nonidet P-40, y 2 mg/ml de péptido competidor representando los 17 aminoácidos del extremo amino terminal de p44 (MDEEPERTKRWEGGYER) (Coin y Egly, 2003; Lainé et al., 2006).

Ensayo de transcripción in vitro

La reacción de transcripción se realizó en 2 pasos: se preincubó el templado de DNA con los componentes de la maquinaria basal de transcripción purificados por separado (TFIIA, TFIIB, TFIID/TBP, TFIIE, TFIIF y TFIIH así como la RNA pol II) para favorecer el ensamblaje del complejo de iniciación y se sintetizó el RNA al adicionar los ribonucleótidos a la reacción.

A. 30 ng de TBP, 15 ng de TFIIB, 100 ng de TFIIE α , 60 ng de TFIIE β , 4 µg de TFIIA parcialmente puro (fracción 0.35 M DEAE), 80 ng de TFIIF y 10 µg de RNA pol II parcialmente pura (fracción 1 M DEAE) se preincubaron con 50-70 ng de templado Ad2MLP en el buffer G (50 mM Tris-HCl pH 7.9, 50 mM KCl, 10% glicerol, 0.1 mM EDTA, y 0.5 mM DTT) con 5 mM MgCl₂ en un volumen final de 20µl por 15 min a 25°C.

B. Después, se adicionaron ATP, GTP, y UTP (250 μ M c/u), 10 μ M CTP, 4 μ Ci (α - 32 P)CTP (400 Ci/mmol, Amersham), y buffer G hasta lograr un volumen final de 25 μ l con una concentración final de $MgCl_2$ de 6.5 mM. Se incubó la reacción por 45 min a 25°C.

C. Para detener la reacción, se adicionaron 400 μ l de “stop” buffer que contienen 50 mM de acetato de sodio, pH 5.2, 0.5% SDS, y 50 μ g/ml tRNA. Se hizo una extracción con 300 μ l de fenol, 300 μ l de cloroformo, y se centrifugó en una centrífuga de mesa por 5 min. Después de recuperar la fase acuosa, los ácidos nucleicos se precipitaron con 1/20 de volumen de acetato de amonio 5 M y 2.5 volúmenes de etanol y se recuperaron por centrifugación.

D. Finalmente la pastilla se secó y se resuspendió en buffer de corrida. La mezcla se hirvió por 5 min y se mantuvo en hielo antes de cargarla en un gel desnaturalizante de poliacrilamida (acrilamida/bis 19:1, urea 7 M, en buffer Tris-borato 1X). Después de la electroforesis, el gel se autorradiografió durante toda la noche a -80°C con una pantalla intensificadora (Coin y Egly, 2003; Lainé, 2006).

Ensayo de reparación por escisión de nucleótidos in vitro (doble incisión)

Se preparó DNA circular que contenía una molécula de cisplatina entrecruzada en un sitio 1,3 d(Pt-GpTpG) por fuera de la doble hélice como se ha descrito previamente (Shivji et al., 1999). Las reacciones de reparación se realizaron en un buffer que contenía 45 mM HEPES pH 7.8, 70 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM dithiothreitol, 0.3 mM EDTA, 10% glicerol, 2.5 μ g of BSA y 2 mM ATP. Cada reacción contenía 50 ng XPG, 20 ng XPF/ERCC1, 10 ng XPC-hHR23B, 50 ng RPA, 25 ng XPA, y ya sea 1.5 μ l de HeLa TFIIH [Hep fr. IV, Gerard et al., 1991], o complejos TFIIH recombinantes que contenían p52 *wt* o la subunidad mutante. Después de una preincubación de 10 min a 30°C, se adicionaron 50 ng de templado dañado con Pt-GTG y la reacción se incubó durante 90 min a 30°C. Se detuvo la reacción vía congelamiento rápido. Los fragmentos

escindidos se resolvieron en un gel de urea-poliacrilamida al 14% después de alinearlos con 9 ng de oligonucleótido complementario y de añadir los cuatro nucleótidos radiactivos [α - ^{32}P] dNTP's (3000 mCi/mmol) por la secuencia V2.1 (USB). Finalmente los fragmentos se revelaron por autoradiografía como se ha descrito anteriormente (Araujo et al., 2000).

Ensayo de interacción de proteínas

Las interacciones proteína-proteína se caracterizaron co-infectando las células Sf9 (2.5×10^7) con los baculovirus recombinantes correspondientes a una multiplicidad de infección de 5. Las células se colectaron a las 48 horas post-infección, se lavaron con una solución salina de fosfatos 1X, 30% glicerol, y se homogenizaron en 2.5 ml de buffer A. Después de centrifugar a 14,000g por 30 min a 4 °C, 50 μl del sobrenadante se absorbió en 20 μl de perlas de sefarosa-proteína G acopladas al anticuerpo monoclonal correspondiente (1B3, reconoce el sitio de unión a ATP de XPB, y 1D11, reconoce el extremo N de p52) en buffer C conteniendo 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM KCl, 10% glicerol, y 0.1 mM EDTA. Después de incubar 1 hora a 4 °C, las perlas se lavaron extensivamente en buffer C conteniendo 150 mM KCl y se resuspendieron en buffer Laemmli. Las proteínas se resolvieron por SDS-PAGE (acrilamida al 12.5%) y se revelaron por Western blot usando los anticuerpos monoclonales apropiados (Jawhari et al., 2002).

Ensayo de actividad de ATPasa

Las fracciones protéicas se incubaron por 2 h a 30°C en presencia de 1 μCi [γ - ^{32}P]ATP (7000 Ci/mmol, ICN Pharmaceuticals) en un volumen de reacción de 20 μl de 20 mM Tris-HCl pH 7.9, 4 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, 50 mg/ml BSA y 120 ng de DNA superenrollado de doble cadena (donde indicado) (pSK). Las reacciones se detuvieron con la adición de 50 mM EDTA y 1% SDS (w/w), se diluyeron 5 veces, se

puntearon en placas de polietilenimina (PEI) TLC (Merck), se corrieron en 0.5 M LiCl/1 M ácido fórmico y se autoradiografiaron.

RESULTADOS

-el gen "marionette" codifica para el homólogo de p52 en Drosophila melanogaster

Para caracterizar el factor p52 en *D. melanogaster* fue necesario buscar líneas mutantes para este gen. Conseguimos líneas reportadas que poseen inserciones de elementos P en la región 5' del inicio de la traducción de *Dmp52*. El transposón *EP3605* está insertado 20 nucleótidos hacia arriba del inicio de la traducción, mientras que el *EP0572* se encuentra dentro del primer exón, 5 nucleótidos hacia abajo del inicio de la traducción (Fig 5A).

Las moscas homocigas para la inserción *EP3605* son viables pero los organismos adultos son estériles, mientras que la línea *EP0572* es homociga letal. Las moscas heteroalélicas para ambos transposones son letales, sugiriendo que ambas inserciones podían afectar el mismo locus. Por otro lado, contábamos con líneas generadas con un mutágeno (EMS, etilmetanosulfonato) que induce cambios puntuales espaciados a lo largo del genoma. Estas fueron aisladas por interacción genética con *beta-tubulina* específica de testículo en el laboratorio de Margaret Fuller en 1986, e identificadas como el gen *marionette* (*mrn*). De entrada, asumimos que el gen *mrn* era p52 porque la posición citogenética identificada para ambos era similar: 71C3-E1 para *mrn* y 71E1 para p52. Además, ambos genes pertenecían al mismo grupo de complementación.

Encontramos que las diferentes mutantes puntuales no complementaban entre sí y que la línea *EP0572* no era capaz de rescatar ninguno de los alelos de *mrn*. Por el contrario, la línea *EP3605* si era capaz de rescatar las mutantes *Dmp52* hasta en un 100%, generando individuos con los genotipos *EP3605/mrn¹*, *EP3605/mrn³* y *EP3605/mrn⁵* (Fig 5C). Aunque estos organismos logran desarrollarse hasta la etapa adulta, son estériles y presentan algunos defectos morfológicos (que se describen más adelante). Esto sugiere que la línea

EP3605 es una mutante hipomorfa de p52; es decir, que produce una pérdida parcial de la función del gen. También observamos que el rescate de los alelos *mrn* con la línea *EP3605* se lleva a cabo en diferentes proporciones; las moscas adultas *EP3605/mrn⁵* fueron sólo el 5% de la clase esperada, mientras que las moscas *EP3605/mrn³* representaban el 80%. En algunas combinaciones alélicas, los organismos logran desarrollarse hasta el estadio de larva de tercer instar o pupa, probablemente porque la poza de Dmp52 por herencia materna es insuficiente para llegar más allá de esos estadios.

Para confirmar que los alelos *mrn* eran mutantes en Dmp52, secuenciamos el gen de las tres líneas *mrn*. Encontramos que en el caso de *mrn⁵* se daba un cambio C286T generando un codón de término (Q96/stop). En *mrn³*, un cambio C673T introducía otro codón de término (Q225/stop). Y en el caso de *mrn¹*, se generaba un cambio G1018A de ácido glutámico a lisina (E340K) (Fig 5B). Por lo tanto, en los dos primeros casos, se generaron proteínas truncadas, y en el tercero, un cambio de aminoácido en una región muy conservada que constituye una zona de interacción con la helicasa XPB en el TFIIF de humano (Jawhari et al., 2002). Basados en éste análisis molecular y en los experimentos de complementación con las líneas de inserción de EP que afectan el gen p52 en *Drosophila*, demostramos que *mrn* es *Dmp52*.

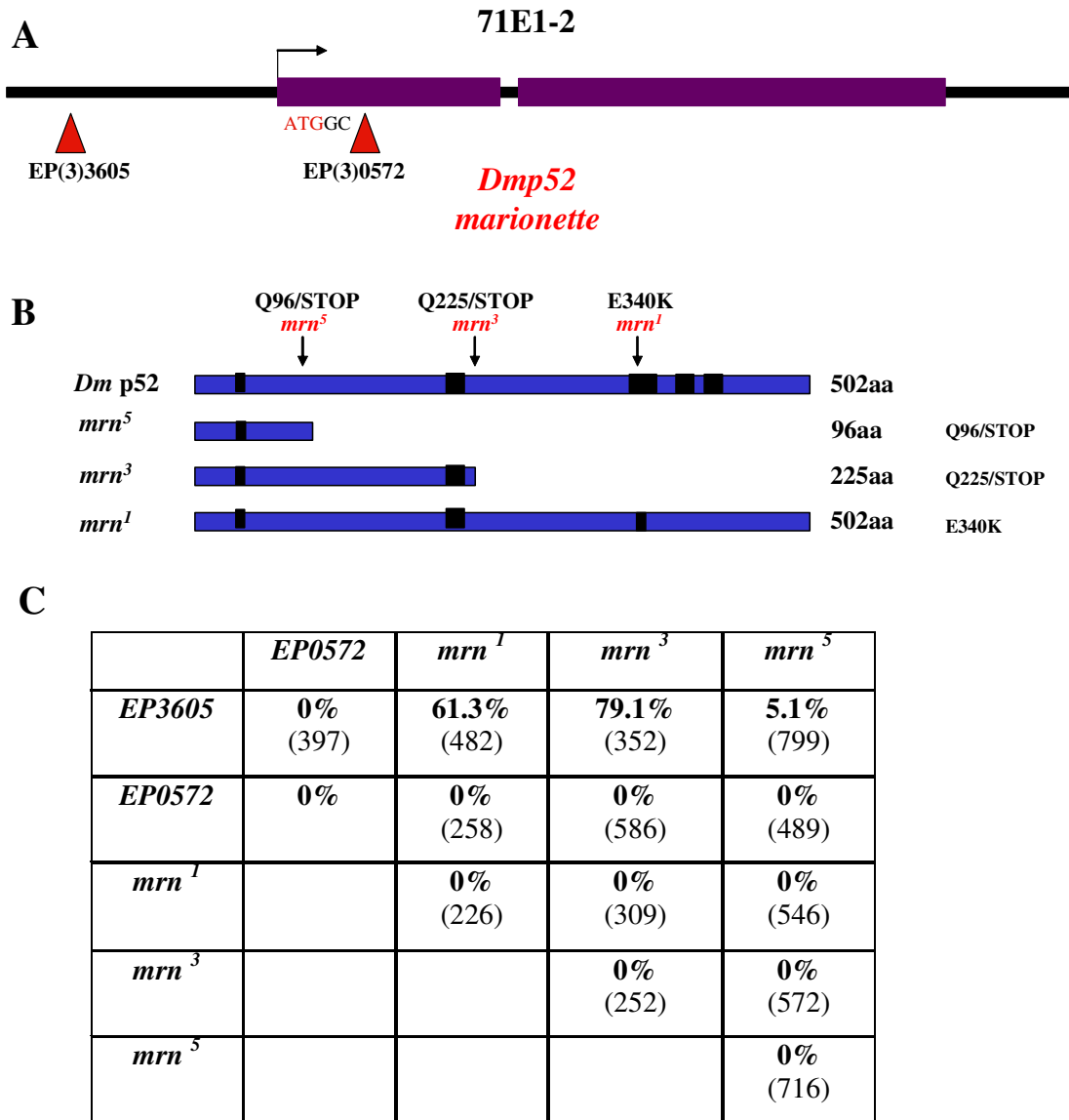


Figura 5. Descripción genética y molecular de los alelos *Dmp52* y ensayo de complementación de mutantes. (A) Organización genómica del gen *Dmp52* (*mrn*) y las inserciones de elementos P. *Dmp52* contiene dos exones codificantes y un intrón pequeño. *Dmp52* mapea en la posición citológica 71E1-2. La posición de las dos inserciones se muestra con dos triángulos. La *EP3605* está insertada en el extremo 5' del gen a 20 nucleótidos del codón de inicio de la traducción. La *EP0572* está insertada en el primer intrón del gen *Dmp52*, 5 nucleótidos después del inicio de la traducción, interrumpiendo la proteína *Dmp52*. (B) Caracterización molecular de las mutaciones puntuales en el gen *Dmp52*. Se indican los cambios de aminoácido encontrados en los alelos *mrn¹* (E340K), *mrn³* (Q225/stop), y *mrn⁵* (Q96/stop). También se indican los péptidos truncados generados por cada mutación. (C) Ensayo de complementación entre las diferentes mutaciones puntuales de *mrn* y las inserciones de elementos P. El porcentaje representa las moscas adultas observadas de la clase esperada. El número entre paréntesis es el número de individuos esperados para cada clase. Únicamente la *EP3605* es capaz de complementar, aunque parcialmente, los tres diferentes alelos de *mrn*. Las otras combinaciones alélicas son letales, incluyendo la *EP0572*.

El “core” de TFIIH es un complejo involucrado en la reparación del DNA en respuesta a daño por luz UV. Mutantes heterócigas del homólogo de XPB en *Drosophila* (*hay*) son más sensibles a luz UV que moscas control en una curva dosis-respuesta (Merino et al., 2002). Dado que p52 forma parte del “core” de TFIIH e interacciona con XPB dándole estabilidad (Jawhari et al., 2002), pensamos que mutantes en *Dmp52* serían más sensibles a la exposición a luz UV. Por ésto, se realizó una curva de sensibilidad a luz UV de larvas de tercer instar de las diferentes líneas mutantes. Los pulsos de energía fueron de 100, 150 y 200 joules. Aquí pudimos observar que las líneas heterócigas para *Dmp52*; *mrn¹/TM6B*, *mrn³/TM6B*, *mrn⁵/TM6B* y *EP3605/TM6B* presentaban un porcentaje de sobrevivencia significativamente menor al observado con la línea control, *red e/TM6B* (Fig 6).

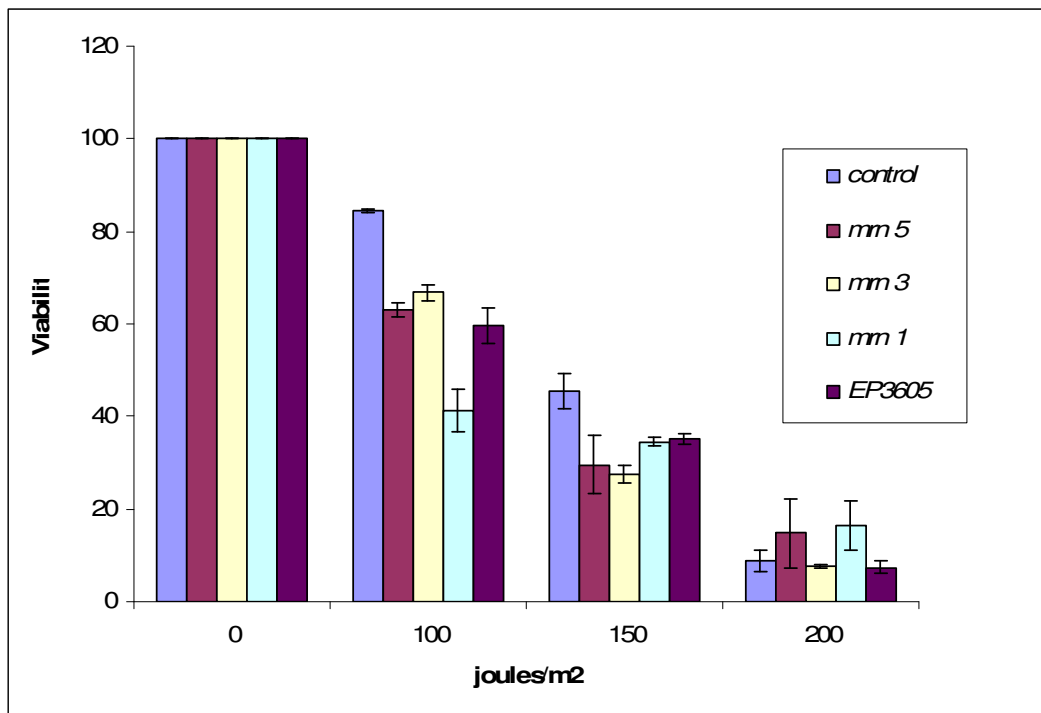


Figura 6. Ensayo de sensibilidad a radiación con luz UV-B. Ensayo de viabilidad de las mutantes *Dmp52* y la cepa parental después de irradiar con diferentes dosis de luz UV-B. Se irradiaron larvas de tercer instar heterócigas para las mutaciones *Dmp52* y se permitió que se desarrollaran hasta adultos. El porcentaje de sobrevivencia se indica para cada cepa. La gráfica representa los resultados de al menos 6 experimentos independientes por dosis para cada genotipo. El análisis estadístico por ANOVA indica una $P < 0.0001$ para cada mutante al compararla con la cepa parental a 100 y 150 J/m^2 .

-Defectos en el desarrollo de mutantes en Dmp52

Analizamos los fenotipos en el desarrollo de las mutantes *mrn* y sus combinaciones heteroalélicas: *EP3605/mrn¹*, *EP3605/mrn³* y *EP3605/mrn⁵*. Encontramos que en todos los casos, las larvas y/o pupas eran más pequeñas que las heterocigas o las *wt* (Fig 7B paneles A y B). Ésta característica es similar al fenotipo Minute, causado por defectos en la traducción de proteínas (Brehme, 1939; Farnsworth, 1957; Saeboe-Larssen et al., 1998). También observamos que algunas larvas y pupas presentaban tumores melanóticos distribuidos aleatoriamente dentro del tejido (Fig 7B paneles F y G). Al parecer, estos tumores podrían ser agregados de células hematopoyéticas causados por una sobreproliferación de las células sanguíneas. Se ha determinado que este fenotipo es semejante a lo que ocurre en la leucemia en mamíferos (Zinyk et al., 1993). Es interesante señalar que en *Drosophila* pueden encontrarse tumores similares en mutantes del complejo remodelador de la cromatina ISWI, en mutantes de la proteína 1 de unión a DNA dañado, en mutantes de Rad5 y en mutantes de la cascada JAK/STAT (Bandenhhorst et al., 2002; Takata et al., 2004; Gorski et al., 2004; Zinyk et al., 1993). La presencia de estos tumores causados por mutaciones en *Dmp52* demuestra que defectos en TFIID pueden generar fenotipos parecidos al cáncer en *Drosophila*.

En el caso de las moscas *EP3605/mrn³* y *EP3605/mrn⁵* una proporción de larvas, baja en el primer caso y alta en el segundo, desarrolló una melanización específica muy reproducible en la intersección entre el intestino medio y el posterior (Fig 7A y 7B paneles H e I), región identificada como el anillo imaginal (Fig 7C). Estas larvas no fueron capaces de pupar y murieron. Dicha melanización en el disco imaginal podría representar necrosis o ser el resultado de un crecimiento anormal del tejido que posteriormente se melaniza. De los organismos que sobrevivieron la etapa larvaria, algunos se desarrollaron hasta la etapa adulta, pero otros sólo lograron llegar hasta el estadio de pupa antes de morir (Fig 7B panel C). Todas las

moscas que murieron en el estadio de farato presentaron deformaciones en la cutícula, y el fenotipo de “brittle bristle” en comparación al *wt* (Fig 7B páneles D y E). Este fenotipo fue descrito previamente en mutantes de *hay* (DmpXPB) por Merino et al. (2002).

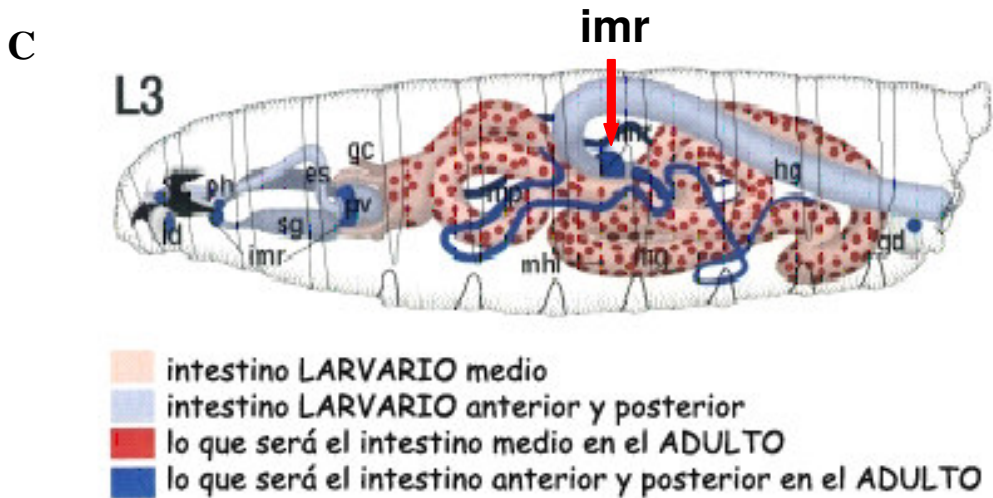
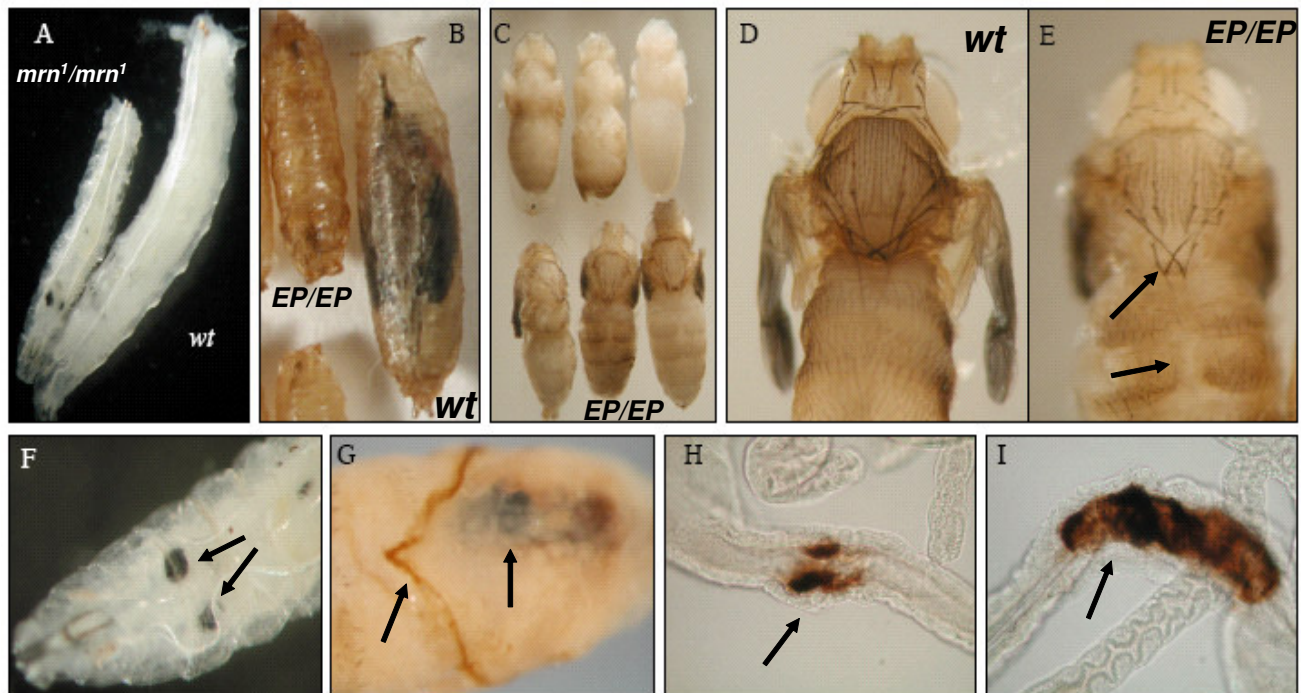
Las moscas que se desarrollaron hasta el estadio de adulto, al emerger, fueron notablemente más pequeñas que las *wt*, su cuerpo y cutícula eran más suaves y su desarrollo se encontraba retardado, de modo que emergían siempre después que las otras poblaciones. También poseían defectos en las quetas (eran quebradizas, cortas y con ramificaciones) y en la cutícula (Fig 7B panel E y Fig 8). Las moscas adultas *EP3605/EP3605* y las combinaciones heteroalélicas *EP3605/mrn* resultaron estériles debido a defectos en la gametogénesis.

Figura 7. Fenotipos en el desarrollo asociados a mutaciones en *Dmp52*. (A) Frecuencia del fenotipo de tumores larvarios en las combinaciones heteroalélicas de *Dmp52*. El porcentaje representa el total de larvas observadas con algún tumor, comparadas con la clase saludable. En el caso de las combinaciones alélicas con la *EP3605*, la población que no está afectada es la que, presumiblemente, continúa su desarrollo hasta adulto. Las larvas de las combinaciones alélicas que incluyen al menos una copia de *Dmp52 mnr¹* (E340K) no se cuantificaron. (B) Fenotipos en el desarrollo de mutantes en *Dp52*. **(a)** Larvas de tercer instar *wt* y mutantes *mnr¹/mnr¹*. Se observa la talla reducida del organismo mutante comparado con el *wt*. **(b)** Pupas *wt* y mutantes *EP3605/EP3605*. Se observa el tamaño reducido de las pupas mutantes. **(c)** Algunos organismos *EP3605/EP3605* y *EP3605/mnr¹*, *mnr³* y *mnr⁵* logran sufrir metamorfosis pero mueren a diferentes estadios antes de completar su desarrollo. En **(d)** y en **(e)** se observan los faratos *wt* y *EP3605/EP3605*, respectivamente. Los organismos mutantes tienen defectos cuticulares así como quetas frágiles y deformes (fenotipo “brittle bristle”). Los defectos se señalan con flechas. En **(f)** y **(g)** se muestran larvas *mnr¹/mnr¹* y pupas heteroalélicas *EP3605/mnr³* con tumores melanóticos (ver las flechas). En **(h)** e **(i)** se muestra la presencia de una melanización específica en el intestino medio de larvas heteroalélicas *EP3605/mnr³* (flecha). El fenotipo se observó siempre en la región del anillo imaginal del intestino larvario posterior y se extendió en ambas direcciones. (C) Esquema de una larva de tercer instar. Aquí se muestra la estructura conocida como el disco imaginal (*imr*), que se encuentra en la zona de unión entre el intestino posterior y el intestino medio de la larva.

A

	m^1 <i>E310K</i>	m^3 <i>Q202/STOP</i>	m^5 <i>Q96/STOP</i>
<i>EP3605</i>	Larvas con necrosis general	13.7% larvas con tumores melanóticos en el disco imaginal	88.5% larvas con tumores melanóticos en el disco imaginal
m^1 <i>E310K</i>	Algunas larvas con tumores melanóticos con distribución ubícu	11.6% Larvas con necrosis general	

B



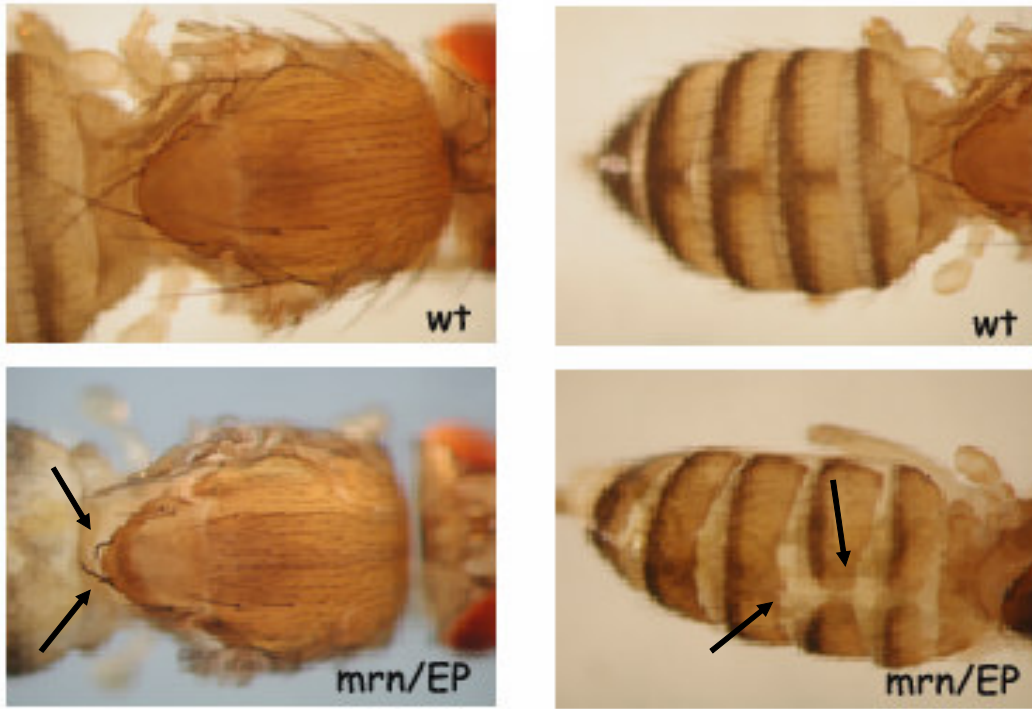


Figura 8. Defectos en quetas y cutícula de moscas adultas mutantes en *mrn*. En los páneles superiores se muestran las quetas (panel izquierdo) y la cutícula (panel derecho) de moscas silvestres. En la parte inferior se muestran las quetas (izquierda) y la cutícula (derecha) de moscas heteroalélicas *mrn*¹/*EP3605*.

Para analizar el fenotipo de esterilidad se realizaron tinciones con DAPI de los ovarios y testículos de las moscas heteroalélicas *EP3605/mrn*¹, *EP3605/mrn*³ y *EP3605/mrn*⁵. En el caso de los ovarios observamos problemas en la maduración de los huevos en las últimas etapas que involucran la formación del corion (Fig 9D). Además, se observaron núcleos pignóticos probablemente debido a degradación de DNA y apoptosis (Fig 9E y F). En el caso de los testículos se observó una disminución en la producción de espermatozoides y defectos en las últimas fases de la espermatogénesis, como la individualización de los espermias. En el caso de los machos *EP3605/mrn*¹ el fenotipo fue aún más severo porque se observaron testículos muy pequeños y malformados, con sólo células primarias (Fig 9H).

Resultó interesante que las mutantes *Dmp52* presentaron características que las hacen muy similares al fenotipo Minute en *Drosophila* y al fenotipo de TTD en humanos. Un ejemplo de éstas características es la presencia de quetas quebradizas así como un desarrollo retardado.

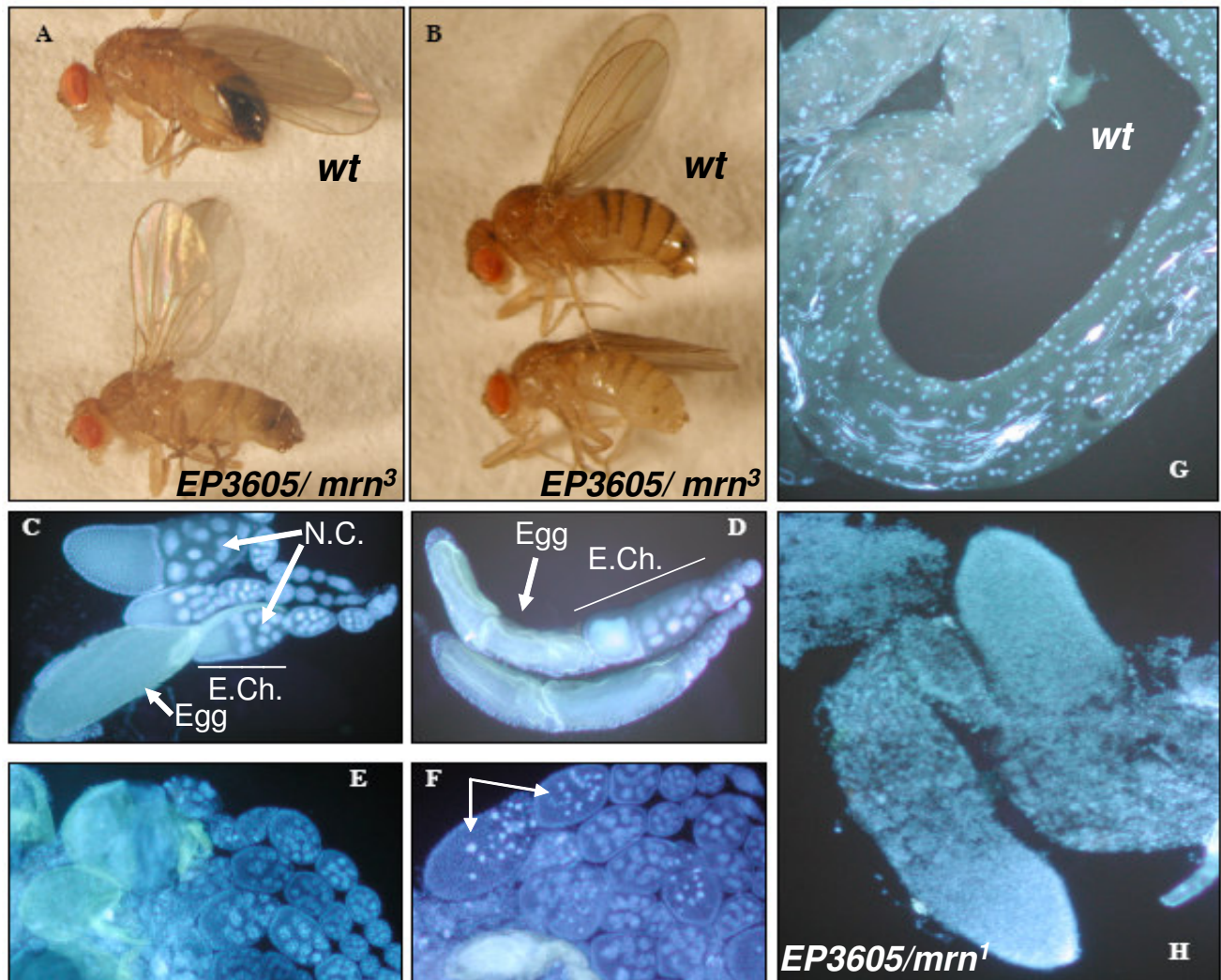


Figura 9. Fenotipo de moscas adultas asociado a mutaciones en *Dmp52*. Adultos machos (A) y hembras (B) *wt* y *EP3605/mrn³*. Se puede observar la diferencia de tamaño entre los organismos. Cada genotipo se indica en la figura. (C) Ovariolos de una hembra heterocigota *EP3605/+*. Se observan las cámaras de huevo (E. Ch.), las células nodrizas (N.C.) y todos los estadios de la ovogénesis normales. (D) Ovariolos de una hembra *EP3605/EP3605*. Se observan los primeros estadios de la ovogénesis normales, pero los huevos maduros están malformados aparentemente como resultado de la formación de un corion aberrante (cubierta del huevo). En (E) y (F) se muestran las ovariolos de hembras heterocigotas *EP3605/mrn¹* y *EP3605/mrn³*, respectivamente. Se observan las cámaras de huevo aberrantes, las células nodrizas malformadas, y la presencia de núcleos pignóticos en los huevos (señalados por flechas). (G) Testículos de un macho heterocigoto *mrn¹/+* en donde están presentes todos los estadios de la espermatogénesis. (H) Testículos de un macho *EP3605/mrn¹*. Se observan los testículos aberrantes y la ausencia de espermatogénesis. Todas las preparaciones de tejido fueron teñidas con DAPI y observadas en un microscopio de fluorescencia.

-El homólogo de p52 en humanos rescata parcialmente algunos fenotipos producidos por mutaciones en Dmp52

Después, quisimos investigar si el homólogo de p52 en humano podía rescatar el fenotipo de las moscas mutantes en *Dmp52*, con el objeto de determinar si estaba lo suficientemente conservado con *Dmp52*. Sin embargo primero era necesario rescatar algunos de los fenotipos observados en las mutantes *mrn*, con la expresión de *Dmp52 wt*. Para tal efecto promovimos la expresión de la proteína *Dmp52 wt* en las mutantes *mrn* por medio de cruza con las moscas transgénicas correspondientes. Al realizar dichos experimentos observamos un rescate parcial del fenotipo de letalidad con la expresión de una copia del transgen *Dmp52*. Sin embargo, como era de esperarse, con la presencia de dos copias del transgen el porcentaje de rescate fue un poco mayor (Tabla II). El rescate del fenotipo de fertilidad alcanzó hasta un 100% con una sola copia del transgen (Tabla III). Esto nos indicó que los fenotipos que observamos en las mutantes *mrn* se debían a defectos específicos en p52. La falta de un rescate completo con los transgenes de *Dmp52* podrían deberse a que su expresión no era óptima, ó a que podrían estar haciendo falta componentes en el promotor ó en el cDNA necesarios para alcanzar lo niveles normales de transcripción. Otro factor para una expresión incompleta del transgen pudiera haber sido la falta de un contexto genómico natural y/o que los niveles de transcrito estuvieran siendo influenciados por la cromatina rodeando el sitio de inserción del transgen.

En el experimento de complementación usando el cDNA de hp52, también se observó un rescate parcial de la letalidad de las mutantes *mrn* homócigas. El porcentaje también se incrementó en presencia de dos copias del transgen (Tabla II). Es interesante señalar que una copia del transgen hp52 fue capaz de rescatar completamente el fenotipo de esterilidad de todas las mutantes con la excepción de las moscas *EP3605/ mrn¹* (tabla III). También es importante recalcar que una mosca transgénica sobre-expresando la doble mutación puntual sobre

Dmp52: E340K/R344D, no fue capaz de rescatar ninguno de los fenotipos (Tabla III). Estos resultados demuestran que el homólogo en humanos de *Dmp52* está suficientemente conservado como para rescatar al menos algunas de las funciones de *Dmp52* durante el desarrollo.

Línea transgénica					
Genotipo Mutante	<i>Dmp52-1</i>	<i>Dmp52-1/Dmp52-2</i>	<i>Dmp52-mut</i>	<i>hp52-2</i>	<i>hp52-1/hp52-3</i>
<i>mrn¹ /mrn¹</i>	2.4% (540)	3.4% (256)	0% (200)	0% (262)	2% (111)
<i>mrn³ /mrn³</i>	5.0% (592)	6.0% (168)	0% (190)	1.5% (126)	3.5% (109)
<i>mrn⁵ /mrn⁵</i>	10.4% (281)	15% (267)	n.a.	n.a.	7.8% (153)

Tabla II. Rescate de la letalidad de los alelos *mrn* homocigos por diferentes líneas transgénicas. El porcentaje representa el rescate de los adultos homocigos comparado con el esperado en caso de complementación total (número entre paréntesis). Se observa que dos líneas transgénicas *hp52* independientes rescataron, aunque parcialmente, el fenotipo letal de *mrn*; éstas líneas tienen una sola copia del transgen.

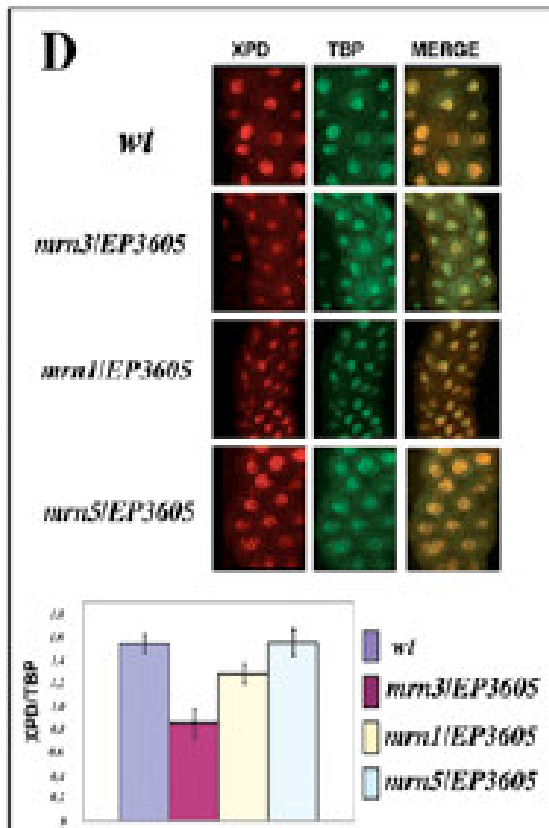
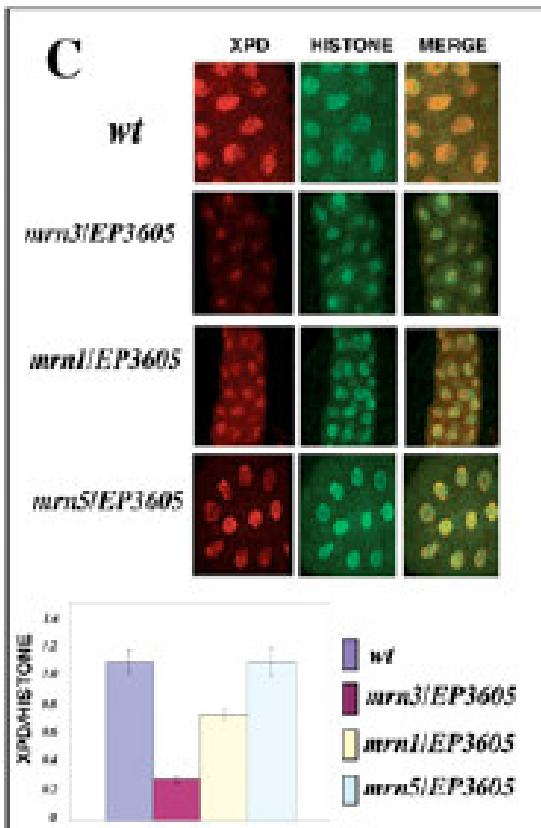
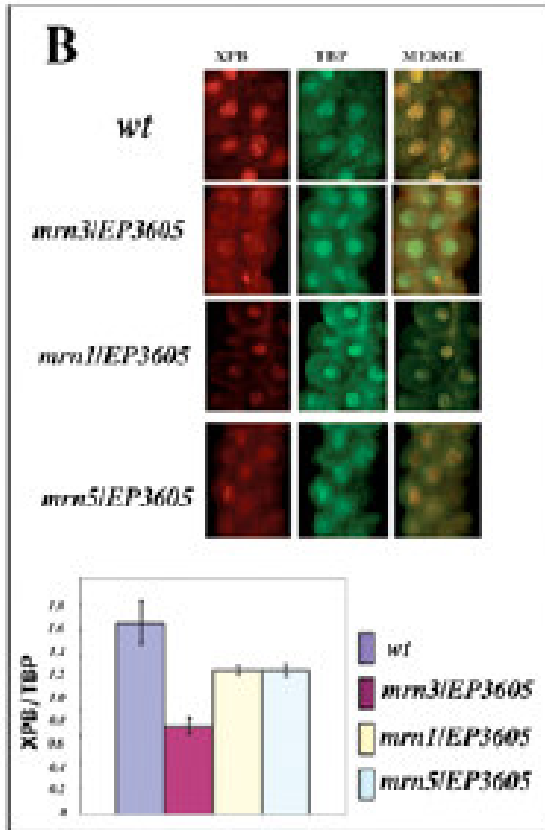
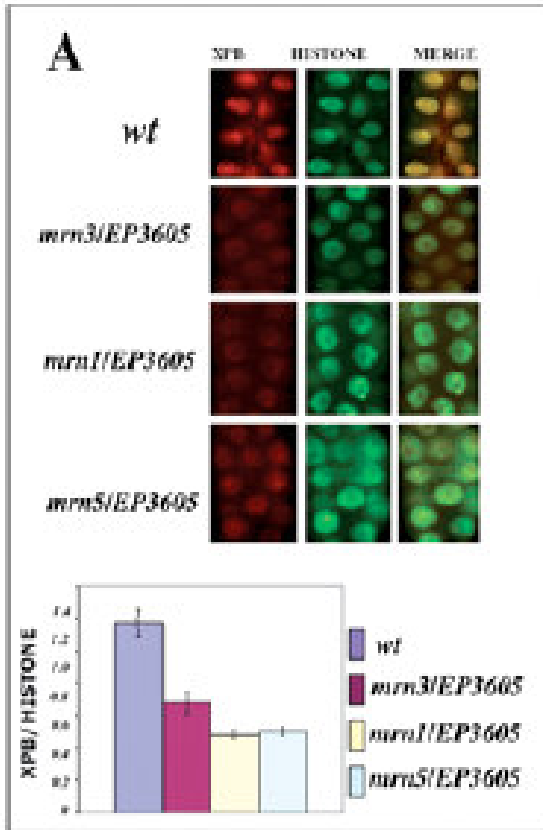
Línea transgénica					
Genotipo Mutante	<i>Dmp52-1</i>	<i>Dmp52-2</i>	<i>hp52-3</i>	<i>hp52-4</i>	<i>Dmp52-mut</i>
<i>EP3605/EP3605</i>	85%	76%	95%	59%	0%
<i>Mrn¹ /EP3605</i>	100%	80%	0%	0%	0%
<i>Mrn³ /EP3605</i>	70%	n.a.	75%	87%	n.a.
<i>Mrn⁵ /EP3605</i>	75%	86%	100%	77%	0%

Tabla III. Rescate de la esterilidad de los organismos heteroalélicos *EP3605/mrn* por diferentes líneas transgénicas. El porcentaje representa el número total de moscas que fueron fértiles y capaces de generar progenie que se desarrolló hasta el estadio de larva. El número total de moscas de cada condición fue entre 10 y 100. El número de machos y hembras está fusionado para dar un porcentaje general. No hubo desviaciones en la relación de sexos. Los adultos homocigos *EP3605/EP3605* y heteroalélicos *EP3605/mrn¹*, *mrn³* y *mrn⁵* fueron infértiles. Es importante notar que una línea de moscas transgénicas que expresan la doble mutación puntual en *Dmp52* (*Dmp52-mut*) fue incapaz de rescatar el fenotipo mutante en cualquier caso.

-Mutaciones en Dmp52 afectan los niveles nucleares de TFIIH

Después de observar que los fenotipos de las moscas mutantes en *Dmp52* se asocian principalmente a deficiencias en actividades de TFIIH como transcripción y reparación, consideramos necesario evaluar la estabilidad del complejo TFIIH *in vivo*. Para ésto, generamos larvas heteroalélicas *EP3605/mrn¹*, *EP3605/mrn³* y *EP3605/mrn⁵*. A dichas larvas se les disectaron las glándulas salivales y se observaron y cuantificaron los niveles de TFIIH por medio de una inmunohistoquímica contra XPB y XPD. Como controles internos usamos anticuerpos contra la histona H3 y la TBP. Aquí encontramos que en todas las combinaciones heteroalélicas de *Dmp52* existe una reducción substancial de los niveles de proteína DmXPB (Fig 10A y B). Con la excepción de los organismos *EP3605/mrn⁵* los niveles de DmXPD también fueron menores cuando *Dmp52* se encontraba mutado (Fig 10C y D). Sabemos que la reducción de los niveles celulares de TFIIH es una característica típica en los pacientes con TTD; por lo tanto, aquí demostramos que al igual que dichos pacientes, en las moscas mutantes en *Dmp52* se encuentran reducidos los niveles totales de TFIIH.

Figura 10. Los niveles de proteína de XPB y XPD disminuyen en las mutantes en *Dmp52*. Glándulas salivales de larvas de tercer instar *wt* y mutantes heteroalélicas se co-tiñeron con las siguientes combinaciones de anticuerpos: XPB/histona H3, XPB/TBP ó XPD/histona H3 y XPD/PBT. (A) Co-tinción y cuantificación de la relación entre XPB/histona H3. Se observa que los niveles de XPB se reducen en los núcleos mutantes por lo menos el doble. (B) Co-tinción y cuantificación de la relación XPB/TBP. Los niveles de XPB se reducen comparados con el control. (C) Co-tinción y cuantificación de la relación entre XPD/histona H3. (D) Co-tinción y cuantificación de la relación XPD/TBP. En moscas heteroalélicas *EP3605/mrn¹* y *EP3605/mrn³* se reducen los niveles de XPD. Para cuantificar la fluorescencia se siguió el protocolo mencionado en la sección de métodos. Se analizaron al menos 10 núcleos por condición.



-Las mutantes en Dmp52 presentan aberraciones cromosómicas

Sabemos que TFIIH juega un papel fundamental durante la reparación del DNA y, por lo tanto, en el mantenimiento de la estabilidad del genoma. Por esta razón decidimos examinar la integridad de los cromosomas de larvas heteroalélicas mutantes en *Dmp52* y larvas control (Fig 11). Para tal efecto realizamos preparaciones de cromosomas a partir de neuroblastos larvarios. En las preparaciones mutantes encontramos un alto número de aberraciones cromosómicas que son evidentes cuando se comparan con cromosomas metafásicos de larvas *wt*. Las aberraciones más comunes se caracterizaron por la fragmentación y condensación parcial de los cromosomas. También observamos fragmentos cromosómicos acéntricos, pérdida de brazos (Fig 11F, G y H), asociaciones y rearrreglos cromosómicos (Fig 11F y G). Los organismos *EP3605/mrn¹* presentaron aberraciones más frecuentes, lo que correlaciona con la presencia de tumores melanóticos en larvas *mrn¹/mrn¹* (Fig 7). Éstos resultados muestran por primera vez que mutaciones en la subunidad p52 del factor TFIIH afectan la integridad del genoma a nivel cromosómico.

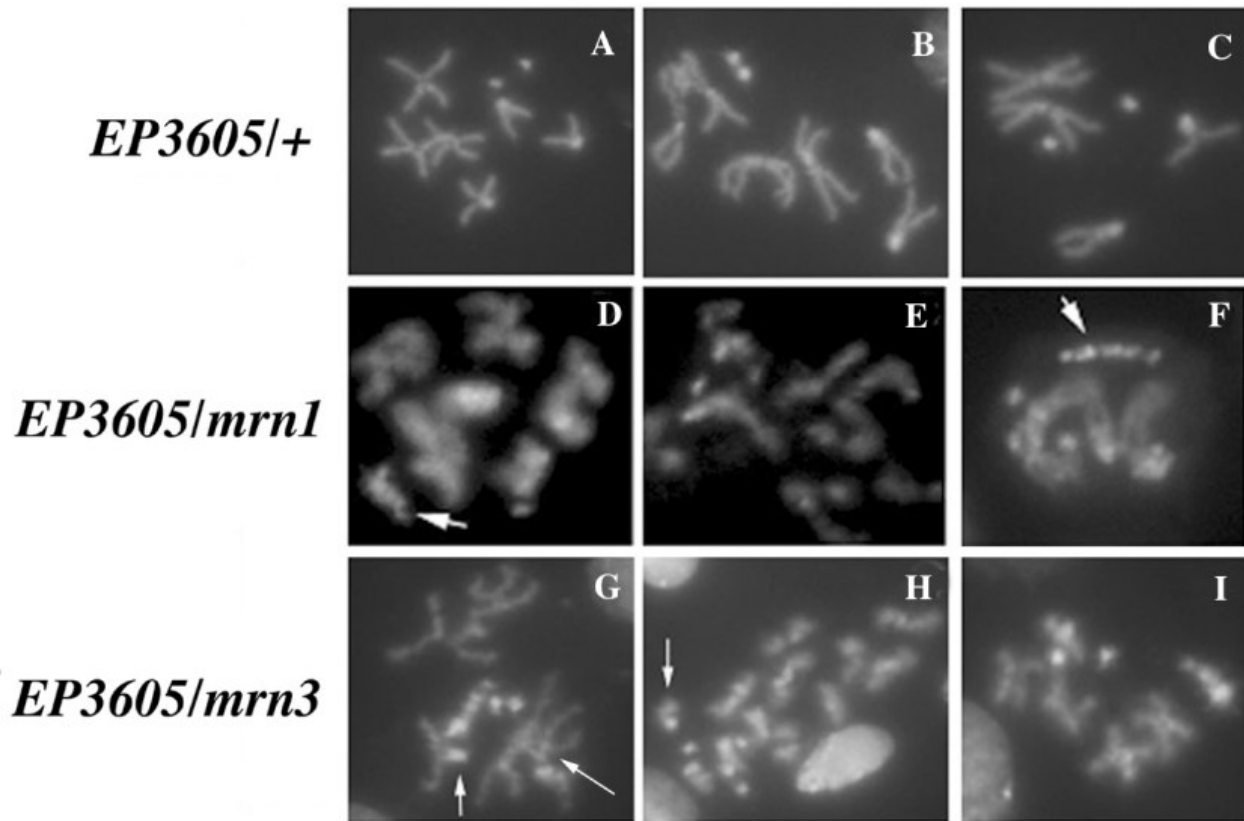


Figure 11. Mutaciones en *Dmp52* causan aberraciones cromosómicas. (A-C) Preparaciones mitóticas de spreads de neuroblastos *EP3605/+*, que son idénticos a los wt. (D-F) Preparaciones mitóticas de neuroblastos heteroalélicos mutantes *EP3605/mrn¹*. Observar la presencia de cromosomas parcialmente condensados y fragmentos cromosómicos, indicados por una flecha. (G-I) Preparaciones mitóticas de mutantes heteroalélicos *EP3605/mrn³*. Se observa la presencia de fragmentos cromosómicos y cromátidas parcialmente condensadas, indicados por flechas.

-Mutaciones puntuales en Dmp52 afectan la actividad de ATPasa de XPB y por lo tanto las actividades de transcripción y reparación de TFIIH.

Finalmente, quisimos saber cómo las mutaciones puntuales en *Dmp52* estarían afectando las funciones de TFIIH. Para esto introdujimos las mutaciones puntuales caracterizadas en *Drosophila* en el cDNA de humano hp52, generamos baculovirus para expresar las proteínas correspondientes e hicimos experimentos de reconstitución del complejo TFIIH *in vitro*. Cabe mencionar que el grupo del Dr. Jean-Marc Egly, es el pionero y experto en la bioquímica del complejo TFIIH humano y en su laboratorio se han estandarizado las técnicas pertinentes para estudiar toda la bioquímica de este factor *in vitro*. Este sistema no existe para el complejo de *Drosophila*, por eso trabajamos en colaboración con su grupo de trabajo. El sustituir la proteína p52h *wt* por nuestras versiones mutantes nos permitió analizar las interacciones físicas de éstas con los demás componentes del complejo TFIIH, en particular con la helicasa XPB y su actividad de ATPasa. Esta sustitución, también fue crucial para evaluar las actividades intrínsecas de TFIIH como su participación en la transcripción y la reparación por escisión de nucleótidos en presencia de dichas versiones mutantes.

En un comienzo, generamos el material biológico necesario para la producción de las proteínas utilizando una estrategia de mutagénesis dirigida mediada por PCR. De esta manera se construyeron las versiones mutantes encontradas en *Dmp52* en el gen *hp52* al mismo tiempo que diseñamos otras que pudieran ser interesantes para evaluar (Fig 12). Tomando en cuenta que en la mutante *mrn¹* encontramos sólo un cambio de aminoácido con carga negativa por otro con carga positiva (E310K), diseñamos una mutación adicional en la misma región altamente conservada. Además de tener el cambio E310K, reemplazamos el aminoácido con carga positiva más cercano a la región por un ácido glutámico: R314E. En total realizamos los cambios Q70/stop (*mrn5*), Q202/stop (*mrn3*) y E310K (*mrn1*) así como R314E y E310K/R314E (Fig 12).

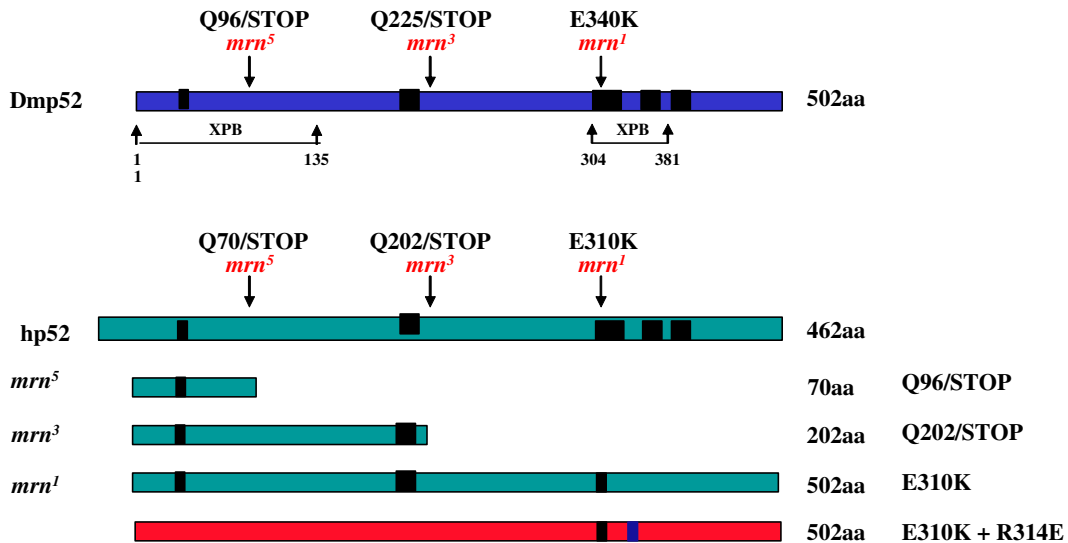


Figura 12. Proteínas mutantes de hp52 analizadas *in vitro*. Se muestran los cambios de aminoácidos encontrados en los alelos *mrn*¹ (E340K), *mrn*³ (Q225/stop) y *mrn*⁵ (Q96/stop) y las mutaciones correspondientes introducidas en el gen p52 humano. Las cajas oscuras indican las regiones de máxima similitud entre las proteínas Dmp52 y hp52. También se señalan las zonas de interacción con la helicasa XPB. Se indican los péptidos truncados así como los cambios de aminoácido sencillos y dobles analizados en la proteína p52 de humano (hp52).

Las secuencias así generadas fueron clonadas en el plásmido pFastBac1 (4775 pb, Invitrogen) entre los sitios Bam HI/Xba I (5´-3´), para generar los baculovirus correspondientes con el sistema de expresión “Bac-to-Bac” (Invitrogen). Este sistema se utiliza para la sobre-expresión de proteínas recombinantes en células de insecto. Se basa en la transposición sitio-específica de un cassette de expresión presente en dicho plásmido de transferencia que ya posee la secuencia deseada. La transposición se da entre este vector y el bácmido bMON14272 que se propaga en *E. coli*. Este plásmido contiene un marcador de resistencia a kanamicina y un segmento de DNA que codifica para el péptido *lacZa* de pUC. En las secuencias que codifican para el extremo amino terminal del gen *lacZa* se encuentra insertado un pequeño segmento que contiene el sitio de unión para el transposón bacteriano Tn7 (mini-*att*Tn7) (misma secuencia que ahora flanquea nuestra secuencia mutante en el pFastBac1). Este plásmido contiene además, todo el genoma del baculovirus. Una vez que se encuentran

ambas moléculas en una misma bacteria, ocurre la recombinación entre las secuencias mini-Tn7 (en *trans*) generándose los báculos recombinantes. Entonces se seleccionan las clonas positivas para nuestra construcción aprovechando que pierden la expresión de lacZ y adquieren resistencia a gentamicina. De esta manera generamos los báculos recombinantes que utilicé para producir los baculovirus correspondientes en las células de insecto Sf9.

Con estos báculos infectamos la línea celular Sf9 de *Drosophila* y logramos sobre-expresar las versiones mutantes de p52. Observé que las mutantes puntuales y la proteína truncada *mrn*³ se producen, y tienen un peso molecular de 52 kDa y 23 kDa, respectivamente, de acuerdo a lo esperado. La versión *mrn*⁵ no se expresó o fue inestable en las células Sf9, por lo tanto decidimos seguir el estudio sólo con las primeras.

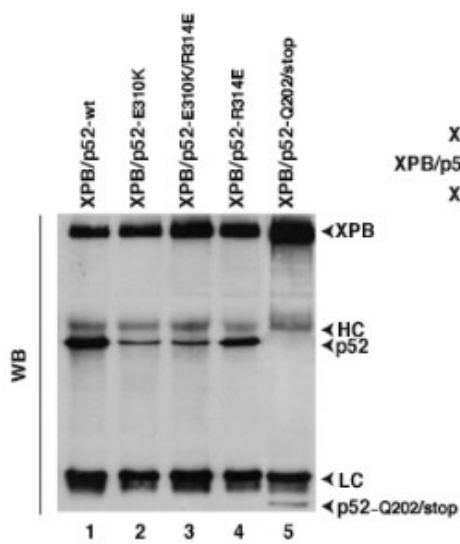
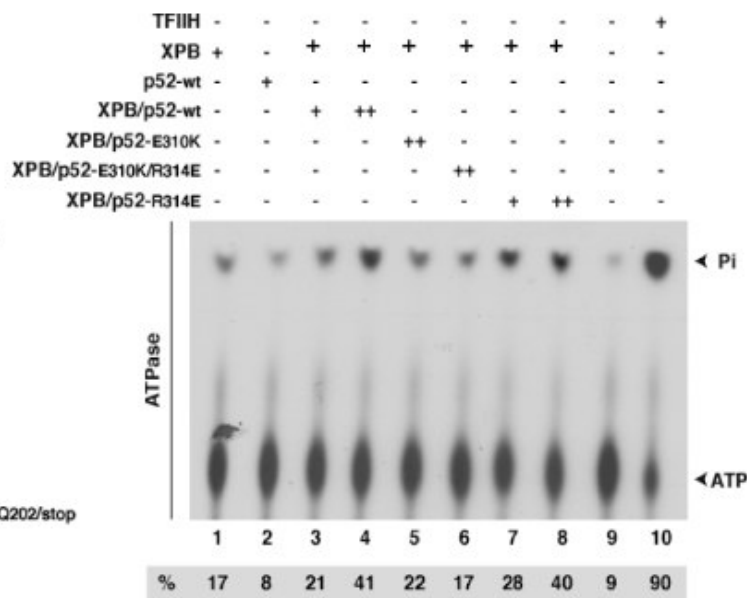
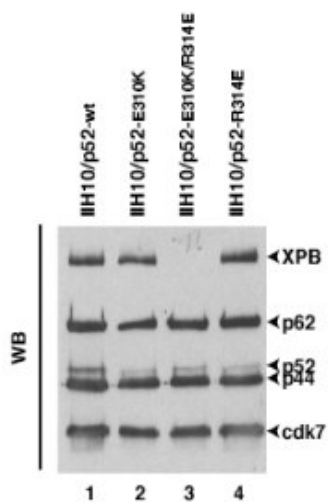
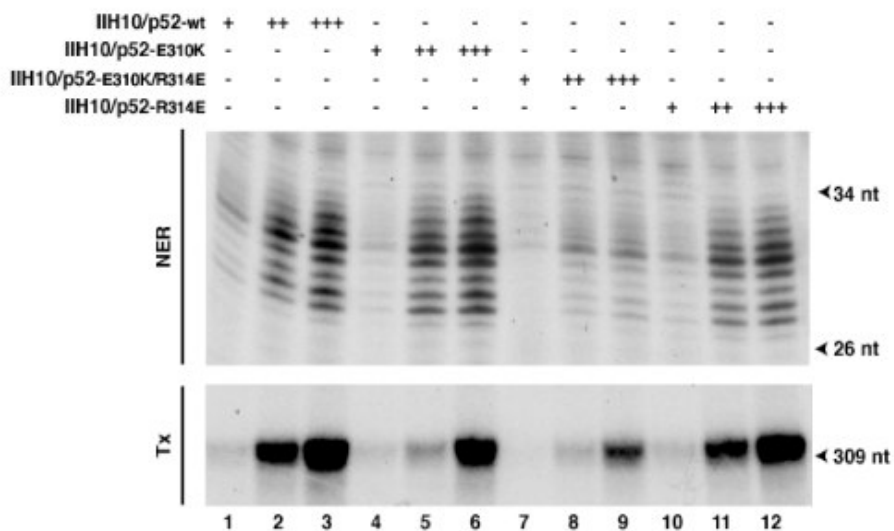
Sabíamos que p52 era capaz de interactuar con XPB (Jawhari et al., 2002) y estimular su actividad intrínseca de ATPasa para activar la REN (Coin et al., 2007). Por lo tanto, nos interesó conocer las consecuencias de las mutaciones de p52 en la actividad de ATPasa de XPB. Para esto se realizaron inmunoprecipitaciones a partir de extractos de células de insecto que coexpresaban las formas mutantes de hp52 junto con XPB *wt*. Observamos que las mutaciones p52-E310K y p52-E310K/R314E debilitaron significativamente la unión de p52 con XPB comparada con p52 *wt* ó con la mutante p52- R314E (Fig 13, carriles 2, 3, 1 y 4). También observamos que la proteína truncada p52-Q202/stop casi no podía ser inmunoprecipitada junto con XPB (Fig 13, carril 5). Lo mismo se observó cuando realizamos las inmunoprecipitaciones inversas con el anticuerpo anti-p52h (datos no mostrados). Después realizamos los ensayos para medir la actividad de ATPasa de XPB en presencia de las mutantes de p52, y encontramos que con las proteínas p52-E310K y p52-E310K/R314E, las actividades de ATPasa de XPB se estimulaban pobremente (22% y 17% respectivamente). Por el contrario, p52 *wt* y la mutante p52-R314E estimularon de manera normal la actividad de ATPasa de XPB (Fig 13B,

muestras 5, 6, 3-4 y 7-8). Estos resultados demuestran que las mutaciones encontradas en una región altamente conservada en el gen *Dmp52*, previenen la regulación de la actividad de ATPasa de XPB por la subunidad reguladora p52.

Para analizar las consecuencias de las mutaciones de p52 en los mecanismos de transcripción y reparación, se produjeron complejos de TFIIH recombinantes que contenían, la forma *wt* ó alguna de las formas mutantes de p52 junto con las otras 9 subunidades de TFIIH, en las células de insecto Sf9 ó H5. A partir de extractos celulares que coexpresaban dichas proteínas se realizó una purificación de los complejos TFIIH por medio de un protocolo de dos pasos (Dubaele et al., 2003). Los complejos rIIH10 inmunoprecipitados con anticuerpos anti-p44 se lavaron con una solución conteniendo 300 mM KCl y se analizaron por Western blot (Fig 13C). Las proteínas E310K, E310K/R314E y R314E-p52, fueron capaces de incorporarse al “core” de TFIIH, lo que se demuestra por la presencia de las subunidades p62 y cdk7 en el Western blot. Sin embargo, la integración de XPB se vió reducida significativamente en presencia de IIH10/p52-E310K/R314E comparado con la presencia de IIH10/p52-wt (Fig 13C, carriles 3 y 1). Para demostrar que esta disminución de XPB se debía específicamente a la presencia de p52 mutado, se realizó una coinmunoprecipitación de complejos TFIIH con Δ p52 ó p52wt. Observamos que la integración de XPB al complejo fue específica y dosis-p52 dependiente (Fig 14). Estos datos concuerdan con varias cosas: Al parecer, la helicasa XPB se ancla al complejo mediante la interacción con p52. En el caso de nuestra mutante truncada, se pierde completamente el extremo carboxilo terminal que incluye uno de los dos dominios de interacción con XPB y, en donde se encuentran varias regiones altamente conservadas en eucariotes. En el caso de las mutantes p52(E310K), p52(E310K+R314E) se generan cambios de carga importantes que caen dentro de la misma región de interacción con XPB (Jawhari et al., 2002). XPB es la helicasa más importante de TFIIH porque es la encargada de abrir la doble hebra durante el proceso de iniciación de la transcripción, además de que

coopera con XPD durante la REN. Por eso, mutantes en XPB son deficientes en estos dos procesos (Coin F et al., 1999; Bradsher et al., 2000; Merino et al., 2002). La disminución de sólo XPB en los complejos mutantes nos confirma que las regiones mutadas de p52 son críticas para su interacción física con este factor, y que además, es a través de éstas que p52 se ancla al resto del complejo. Posteriormente, estos complejos se ensayaron en experimentos de transcripción y REN (Dubaele et al., 2003). Aquí se observó que las actividades de transcripción y REN del complejo rIIH10/p52-E310K/R314E se redujeron significativamente comparadas a la actividad de rIIH10/p52-wt (Fig 13D, carriles 7-10 y 1-10), demostrando que la interacción de hp52/XPB es crucial para mantener ambas actividades. Estos resultados también explican por qué las moscas transgénicas que contienen la doble mutación no fueron capaces de rescatar el fenotipo *wt* en *Drosophila* (Tabla III). Es interesante señalar que la actividad transcripcional de la mutante rIIH10/p52-E310K (que presenta los fenotipos más severos en la mosca) sólo se inhibe parcialmente (alrededor del 25%), mientras que la actividad de REN es prácticamente normal comparada con la actividad de rIIH10/p52-wt (Fig 13, carriles 4-6 y 1-3). La mutante control rIIH10/p52-R314E no presentó deficiencias en ambas actividades; transcripcional y de REN (Fig 13 carriles 10-12).

Figura 13. Mutaciones en hp52 causan una disminución en la estimulación de la actividad de ATPasa de XPB y un defecto en la REN. (A) Se co-expresaron en células de insecto las proteínas recombinantes: XPB y las versiones mutantes de hp52, se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-XPB y se analizaron por Western blot. Se indican las posiciones de XPB, hp52, hp52 truncada (p52-Q202stop), y las cadenas pesada (HC) y ligera (LC) de las inmunoglobulinas. (B) Se inmunoprecipitaron XPB wt sola o en combinación con las mutantes de p52 usando anticuerpos anti-XPB acoplados a perlas de agarosa. Los complejos protéicos inmovilizados se lavaron con 0.4 M KCl y se les midió la actividad de ATPasa. TFIIH se usó como control de la reacción. Para la cuantificación del fosfato inorgánico (Pi) y el ATP liberados se usó un analizador Bio-imaging. El porcentaje de Pi liberado se muestra en la base de la figura. (C) Análisis por Western blot de los complejos TFIIH recombinantes inmunopurificados, a partir de extractos de células de insecto, conteniendo todas las subunidades de TFIIH incluyendo hp52wt ó alguna de sus versiones mutantes. El Western blot se reveló con anticuerpos contra XPB, p62, p52 ó Cdk7. Los diferentes complejos se indican en la parte superior de la figura, y las subunidades de TFIIH se muestran con flechas. (D) Se probaron 50, 100 y 200 ng de los diferentes complejos IIH10 en un ensayo de doble incisión (NER) conteniendo los factores recombinantes XPC-HR23b, XPA, RPA, XPG, ERCC1-XPF y un plásmido circular unido a una molécula de cisplatina (1,3-dGpTpG) como templado, o en un ensayo de transcripción reconstituída (Tx) con los factores recombinantes TFIIIB, TFIIIF, TBP, TFIIIE, la RNA polimerasa II purificada y un templado con el promotor tardío principal de adenovirus. Se indica el tamaño de los productos de la doble incisión y el transcrito.

A**B****C****D**

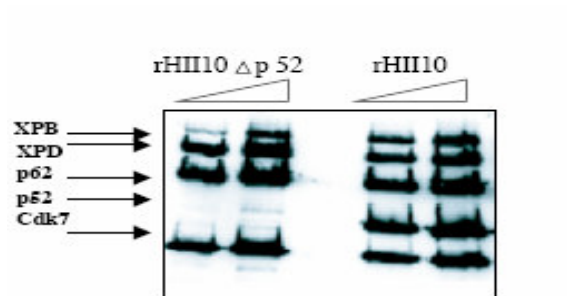


Figura 14. La integración de XPB al complejo TFIIH es específica y dependiente de p52. Coimmunoprecipitación de complejos TFIIH recombinantes en presencia de una mutante truncada de p52 (rHII10 Δp52) ó p52 silvestre (rHII10).

DISCUSIÓN

Mutantes de p52 desestabilizan la estructura y afectan la actividad de TFIIH

p52 es una de las 10 proteínas que forman el complejo de transcripción y reparación TFIIH. Este factor representa un excelente ejemplo de lo que es un complejo multiprotéico-multifuncional. Por lo tanto se esperaría que mutaciones en ésta ó alguna otra de sus subunidades afectara la estabilidad y/o función de sí misma, algún (o algunos) otro componente y/o del complejo completo. Nuestro objetivo en este trabajo fue conocer la función de p52 como parte de TFIIH. Ya se sabía que hp52 era necesario para la incorporación de XPB al “core” de TFIIH (Jawhari et al., 2002) y nosotros demostramos, en este mismo trabajo, que hp52 podía rescatar algunos de los fenotipos mutantes de *Dmp52*. Por lo tanto introdujimos mutaciones en el cDNA de hp52 reconstruyendo las que encontramos en las mutantes *marionette* en *Drosophila* para analizar su efecto *in vitro*. Encontramos que mutaciones en un dominio muy conservado de Dmp52 previenen la unión al complejo y la regulación de la actividad de ATPasa de XPB, una función esencial que se requiere para la transcripción y la reparación del DNA. Sin embargo, encontramos que la mutación p52-E310K, que confiere sensibilidad a luz UV en la mosca, no resulta en un fenotipo evidente en los experimentos bioquímicos *in vitro*. Es decir, que aunque sí interfiere con la regulación de la actividad de ATPasa de XPB, la mutación p52-E310K no afecta las actividades de transcripción y reparación de todo el complejo. Esto podría deberse a que *in vitro* en el sistema de humano, las otras subunidades de TFIIH podrían estar compensando la débil interacción entre XPB/p52 y permitiendo que TFIIH funcione normalmente. Sin embargo, en *Drosophila (in vivo)*, es posible que las otras subunidades del complejo TFIIH sean incapaces de compensar la inestabilidad entre XPB/p52. A pesar de esta aparente compensación de estabilidad en el sistema de humano *in vitro*, es evidente la importancia del residuo E310 de p52 en su interacción con

XPB, y por lo tanto, en las funciones de TFIIH. Esto se reafirma cuando realizamos una mutación adicional en otro residuo altamente conservado de p52 localizado 4 aminoácidos hacia abajo (R314E). Cuando co-existen ambas mutaciones puntuales (hp52/E310R-R314E) en la misma proteína, p52 no es capaz de anclar XPB al core de TFIIH y no puede modular su actividad de ATPasa, dando como resultado una baja en las actividades de transcripción y reparación. Estos resultados demuestran que la región en donde se encuentra localizada esta doble mutación, hp52/E310R-R314E, es muy importante para la interacción con XPB, su ensamblaje y su retención en el complejo TFIIH (Fig. 13). Es menester recordar que esta doble mutación no se ha reportado ni en el humano ni en la mosca, y fue diseñada tomando en cuenta el alto grado de conservación de los residuos en todos los organismos. Esta región es identificada como necesaria para su unión con XPB, y ahora sabemos que el contener estos dos cambios de aminoácidos es más deletéreo que tener una proteína p52 truncada que no contenga esta región.

Los fenotipos de las mutantes marionette son equivalentes a los que presentan los pacientes con TTD y XP

Antes de este trabajo, no habían sido identificadas mutaciones en la subunidad p52 en organismos multicelulares. Nosotros analizamos dos tipos diferentes de mutaciones en el homólogo de p52 en *Drosophila*; inserciones de elementos P y tres mutaciones puntuales. Todas las mutantes analizadas son homocigas letales, excepto la inserción *EP3605*. Las combinaciones heteroalélicas de la *EP3605* con los alelos con mutaciones puntuales son semi-letales y los organismos que logran llegar hasta la etapa de adulto presentan fenotipos interesantes, como defectos cuticulares, el fenotipo de “brittle bristles” en las quetas y esterilidad. Estos fenotipos también se observan en las mutantes *hay* (*DmXPB*) (Merino et al., 2002) por lo que podríamos asociar estos defectos a deficiencias en TFIIH durante el desarrollo. Además observamos otros fenotipos que no presentan las mutantes en

hay. Por ejemplo, algunos organismos mutantes en *Dmp52* mueren en el estadio de larvas de tercer instar o en el de pupa; en ambos casos, la proteína p52 heredada por vía materna es suficiente para permitir el desarrollo de los organismos hasta estos estadios. Es interesante mencionar que las larvas y las pupas mutantes en *Dmp52* son significativamente más pequeñas que los organismos wt. Las moscas heteroalélicas con una copia de la inserción *EP3605* y otra de cualquiera de las mutaciones puntuales *mrn¹*, *mrn³* ó *mrn⁵* pueden desarrollarse hasta adultos pero son pequeños y estériles. Estos fenotipos, junto con el fenotipo de quetas frágiles, la reducción de los niveles nucleares de TFIIH y el desarrollo retardado se asemejan al fenotipo de TTD en humanos y generan un fenotipo parecido al Minute en *Drosophila*. En general el fenotipo Minute se genera a partir de una síntesis anormal de proteínas durante el desarrollo o una disminución en el número de copias de los genes ribosomales (Saeboe-Larssen et al., 1998); por lo tanto, una reducción en los niveles basales de transcripción causada por mutaciones en TFIIH podría tener un efecto similar. Es importante recalcar que los pacientes afectados con TTD y el SC son bajos de estatura y, por lo tanto, existe una correlación interesante entre este fenotipo en humanos y el desarrollo retardado en las moscas mutantes en *Dmp52*.

Algunas larvas y pupas mutantes en *Dmp52* presentan tumores melanóticos. Estos tumores son causados principalmente por el sobrecrecimiento de tejidos particulares, en general hemocitos que luego se melanizan (Huang et al., 2005). Este tipo de tumores se pueden encontrar en mutantes de *Drosophila* afectadas en otro tipo de funciones, como es el caso de moduladores transcripcionales y factores remodeladores de la cromatina, así como en el sistema inmune innato y la vía de señalización JAK/STAT (Bandenhorst et al., 2002; Takata et al., 2004) pero no en las mutantes *haywire* (Merino et al., 2002). Además, defectos en la reparación del DNA en *Drosophila*, particularmente, mutaciones en el gen Rad50 que participa en la reparación de DNA de doble cadena, también provocan la formación de

tumores melanóticos. Cabe señalar que mutantes en Rad50 también presentan defectos cuticulares (Gorski et al., 2004). Más recientemente se ha reportado que, mutaciones en la proteína DDB1 (proteína 1 de unión al DNA dañado) en *Drosophila*, que participa en la REN y en la regulación de la respuesta inmune innata, generan inestabilidad cromosomal y tumores melanóticos (Takata et al., 2004). En humanos se ha asociado la generación de tumores con deficiencias en la actividad de TFIIH, y polimorfismos en XPD se asocian a diferentes tipos de cáncer (Garfinkel y Bailis, 2002; Clarkson y Word, 2005). Se sabe también que los pacientes afectados con XP desarrollan cáncer de piel con alta frecuencia (Lehmann, 1998). Dada esta información que relaciona fuertemente los polimorfismos en XPD, la reducción en la reparación del DNA y el incremento en el riesgo de cáncer, es posible que deficiencias en la transcripción y la reparación del DNA causadas por mutaciones en *Dmp52* estén relacionadas a tumores melanóticos. Apoyando esta hipótesis, observamos diferentes tipos y grados de aberraciones cromosómicas en cromosomas mitóticos de mutantes en *Dmp52*. Las anomalías más frecuentes fueron deleciones en cromosomas y condensación parcial de las cromátidas durante la mitosis. En mamíferos, es común encontrar fragilidad cromosómica en tumores sólidos (Kops et al., 2005) y se ha reportado inestabilidad cromosomal en líneas de fibroblastos obtenidos de pacientes con XP; así como, rompimiento extenso del DNA irradiado con UV en células mutantes en XPD de pacientes con XP (Casati et al., 1991; Lanza et al., 1997; Berneburg et al., 2000). Sin embargo, existen muy pocos estudios que evalúen la integridad global del genoma en pacientes con deficiencias en TFIIH (Garfinkel y Bailis, 2002). Por otra parte, será necesario evaluar en *Drosophila*, la combinación de mutaciones en *Dmp52* con mutaciones en genes supresores de tumores como p53 y retinoblastoma utilizando análisis genéticos, difícilmente realizables en humanos.

Las mutantes en TFIIH de Drosophila son pleiotrópicas

Las enfermedades humanas causadas por mutaciones en TFIIH presentan fenotipos pleiotrópicos, es decir que, presentan alteraciones simultáneas en diferentes procesos. La compleja relación entre genotipo y fenotipo de estas enfermedades, hasta la fecha, no ha podido descifrarse. Sin embargo, se considera que uno de los factores que influyen en esta complejidad es el hecho de que TFIIH es un complejo multiprotéico-multifuncional. Por lo tanto, mutaciones en alguna de sus subunidades puede afectar además de su actividad intrínseca, la actividad de los otros componentes del complejo; en uno o en más de los diferentes procesos en los que TFIIH participa. Además, éstas enfermedades son causadas cuando los dos alelos del mismo gen están mutados; por lo tanto, podría haber interacciones alélicas y fenotipos diferentes dependiendo de la combinación de alelos de que se trate.

En nuestro grupo de trabajo hemos demostrado que los fenotipos de las moscas mutantes en componentes de TFIIH dependen de las combinaciones de alelos de que se trate, de *hay* en un caso y de *p52* en otro. Estos hallazgos sugieren la idea de que la complejidad de fenotipos presentes en el humano se deben a las combinaciones alélicas del individuo enfermo (Bohr et al., 2005; Andressoo et al., 2006) y que el modelo de correspondencia entre un alelo-un fenotipo no es el más apropiado en este caso. En lo que se refiere a las mutantes en *Dmp52* y en *hay* de *Drosophila*, como era de esperarse por ser parte de un complejo celular esencial y multifuncional, son pleiotrópicas y producen diferentes fenotipos durante el desarrollo (Gutiérrez et al., 2003; Zurita y Merino, 2003). Sin embargo, mutaciones en *Dmp52* producen defectos en el desarrollo más diversos que las mutantes en *hay*. Este fenómeno podría deberse a que mutaciones *Dmp52*, podrían tener efectos más drásticos en las funciones del complejo considerando que, además de ser requerido para el anclaje de XPB al complejo, regula su actividad de ATPasa. Además, podría ser que mutaciones en *p52* aparte de estar afectando el ensamblaje y las actividades de TFIIH, pudieran estar

impidiendo la interacción de éste con otros factores reguladores durante la transcripción y la reparación del DNA. Esto explicaría la posible ausencia de enfermedades humanas ligadas a mutaciones en hp52. Es decir, es probable que mutaciones en este factor sean letales desde estadios embrionarios en los mamíferos ya que los requerimientos de transcripción son esenciales desde muy temprano en su desarrollo.

Usando a *Drosophila* para estudiar este factor multiprotéico y todos los fenotipos que se generan a partir de mutaciones en sus subunidades, podemos ir decifrando la relación que existe entre el genotipo y el fenotipo de estas enfermedades. Creemos que podemos comenzar a resolver esa pleiotropía por medio de la identificación de las múltiples funciones que tiene una proteína en particular dentro del complejo. Usando nuestra estrategia de estudio de TFIIH podemos empezar a definir mecanismos, disectando los dominios de la proteína involucrados en cada aspecto bioquímico y conectando esto a los fenotipos observados en el organismo completo. En particular pensamos que p52 es una proteína bifuncional que, por un lado se ancla al complejo TFIIH y, por otro, usando dominios diferentes, se une a XPB y modula su actividad enzimática. Podemos asignar regiones específicas de p52 encargadas de modular diferencialmente las actividades transcripcionales y de reparación de XPB. Considerando que p52 es bifuncional, podemos predecir que será posible recuperar mutantes que puedan discernir completamente entre su anclaje al complejo y la modulación de las actividades de XPB. Las mutantes existentes representan un buen comienzo porque podemos identificar dominios funcionales, pero serán necesarios estudios más detallados de la relación estructura-función para entender los diferentes mecanismos en los que p52 participa dentro de TFIIH.

CONCLUSIONES

- Demostramos que los alelos *mm* son mutantes de p52 en *Drosophila melanogaster*.
- Mostramos por primera vez que proteínas *Dmp52* mutantes producen fenotipos específicos durante el desarrollo de un organismo multicelular.
- Los defectos observados en moscas mutantes en p52 se asemejan a algunas manifestaciones humanas de pacientes con TTD y XP.
- Mutantes en *Dmp52* son más sensibles a la radiación por luz UV que moscas silvestres, presentan formaciones tumorales parecidas a tumores melanóticos, aberraciones cromosómicas, defectos en la formación de las quetas y la cutícula, retraso en el desarrollo, problemas de crecimiento y esterilidad.
- La proteína homóloga a *Dmp52* de humano está lo suficientemente conservada como para rescatar algunas de las funciones de p52 durante el desarrollo de la mosca.
- A nivel molecular los fenotipos de las mutantes pueden explicarse por una pérdida en la estabilidad de la asociación entre p52 y XPB dentro de TFIIH y a una pérdida en la modulación de la actividad de ATPasa de XPB por p52. Esta inestabilidad implica una reducción en las actividades de transcripción y reparación.
- Encontramos un decremento substancial de los niveles de proteína DmXPB en todas las mutantes de *Dmp52 in vivo*.
- Los defectos pleiotrópicos causados por mutaciones en las diferentes subunidades de TFIIH se pueden deber al rol específico que juegan dichas proteínas dentro del complejo; como podrían ser en el ensamblaje al complejo, el mantenimiento de la estabilidad entre subunidades específicas y sus funciones enzimáticas.

PERSPECTIVAS

A partir de la realización de este trabajo de tesis quedarían pendientes algunos experimentos que complementarían nuestras investigaciones y otros que abrirían la puerta a nuevas preguntas.

Por ejemplo, sería necesario:

- Caracterizar el tipo de tumores que presentan las mutantes. ¿Por qué algunas combinaciones alélicas generan tumores y otras necrosis? ¿Existe más apoptosis en las mutantes *mrn*, como ocurre en las mutantes *hay*?
- ¿Por qué la mutante *mrn*¹ presenta los fenotipos más severos *in vivo*?
- Analizar si en las mutantes *mrn* rescatadas con una copia silvestre de Dmp52 y hp52 se reestablecen los niveles de TFIIH y la resistencia normal a radiación UV.
- ¿A qué se debe la baja en la concentración nuclear de TFIIH en las mutantes *mrn*?, ¿se debe a degradación, a falta de translocación ó a baja expresión del complejo?
- ¿Cuál es el mecanismo de generación de las aberraciones cromosómicas en las mutantes *mrn*? ¿Qué otros mecanismos de mantenimiento de la integridad del genoma están alterados en las mutantes *mrn*? ¿En qué zonas del genoma se presentan estas aberraciones?
- ¿La letalidad de las mutantes *mrn* se debe sólo a la desregulación de la actividad de ATPasa de XPB, o también se están afectando otras posibles interacciones entre p52 y otros factores reguladores de la transcripción? ¿Qué factores serían éstos y cómo participan con TFIIH?
- Analizar la interacción física y genética de p8 con p52 dentro del complejo TFIIH (Para datos adicionales ver ANEXO I)

ANEXO I

La sobre-expresión de p8 trans-complementa las mutantes Dmp52 y aumenta la resistencia basal a irradiación ultravioleta

La subunidad p8/TTDA es necesaria para mantener los niveles basales de TFIIH y cuando se encuentra mutada produce TTD (TTDA) (Botta et al., 2002). Las líneas celulares obtenidas de pacientes con TTDA tienen niveles reducidos de TFIIH y son más sensibles a radiación ultravioleta. Cuando se introduce una copia silvestre de p8/TTDA a células derivadas de pacientes con TTDA ó XP-D, éstas recuperan su actividad normal de REN y su sensibilidad normal a radiación ultravioleta (Vermeulen et al., 2000). Se ha demostrado que la proteína p8 principalmente participa en la REN e interactúa directamente con las subunidades p52 y XPD dentro del complejo TFIIH (Coin et al., 2006). La proteína p8 se encuentra normalmente en dos compartimentos intracelulares: en el citoplasma y en el núcleo. Después de que ocurre daño al DNA el equilibrio de p8 tiende hacia la poza nuclear y ahí forma una asociación más estable con TFIIH (Gigliamari et al., 2006).

Como ya he mencionado ampliamente en este trabajo, mutantes en la subunidad *Dmp5* (*mrn*, *marionette*) presentan fenotipos equivalentes a los observados en humanos. Las mutantes puntuales *mrn* son homocigas letales y presentan fenotipos específicos en el desarrollo. Por otro lado, los organismos heterocigicos (con una copia de la inserción del elemento P (*EP3605*) y una mutación puntual), son viables pero estériles y tienen niveles reducidos de TFIIH (Fregoso et al., 2007). Tomando en cuenta que p8 se requiere para mantener los niveles basales de TFIIH y que interactúa físicamente con p52 dentro de TFIIH, quisimos saber si la sobre-expresión de una copia silvestre de p8 rescataría la letalidad y la esterilidad de las mutantes *mrn*. Para tal efecto generamos moscas transgénicas que expresan *DmTTDA* bajo el control del promotor de *hsp83*. Realicé diferentes cruzas para obtener

alelos *mrn* homocigos y mutantes *Dmp52* heteroalélicas (*EP/mrn*) junto con una copia de la construcción hsp83-DmTTDA (ver Material y Métodos).

Pudimos observar que los fenotipos de letalidad y esterilidad que presentan los alelos *mrn*³ y *mrn*⁵ fueron rescatados parcialmente con una copia del transgen hsp83-p8 (Fig 15A y B). El porcentaje de rescate fue bajo pero confiable, ya que una mosca transgénica sobre-expresando una forma mutante de *Dmp52* no es capaz de rescatar ninguna línea *mrn*. Es importante recordar que en este trabajo demostramos que una copia silvestre de *Dmp52* rescata la letalidad y la esterilidad de las mutantes *mrn* (ver Tablas II y III). Además, logramos obtener una línea estable homociga para el alelo *mrn*⁵ con una copia del transgen hsp83-p8 lo que corrobora que se pueden obtener organismos fértiles y viables sobre-expresando p8 silvestre en las mutantes homocigas para *mrn*.

El rescate de la letalidad de las mutantes *mrn* por p8 pudo deberse a que la sobre-expresión de p8 logra compensar y reestablecer la estabilidad del complejo. Este incremento en la estabilidad de TFIIH por p8 debería reflejarse en un incremento en la actividad de REN y por lo tanto, en una mayor viabilidad de las moscas en un ensayo de sensibilidad a radiación ultravioleta. Para analizar esta posibilidad, diferentes líneas de moscas transgénicas sobre-expresando DmTTDA/p8 fueron expuestas a diferentes dosis de radiación UV. Usamos tres líneas que solo poseen una copia extra de DMP8 (TTDA1, TTDA8 y TTDA9) y otra línea que contiene 3 copias (TTDA5-3). Logramos observar que dos de las líneas con una copia del transgen y la línea con tres copias son significativamente más resistentes a la radiación UV que la línea silvestre (Fig 15C). El incremento en la resistencia es más notorio a 175 y 200 J/m². Estos datos son reproducibles e indican que la sobre-expresión de la subunidad DmTTDA/p8 de TFIIH incrementa la eficiencia del complejo en la REN.

Por lo tanto la sobre-expresión de DmTTDA puede *trans-complementar* una mutación en otra subunidad de TFIIH e incrementar

la resistencia a radiación UV del organismo completo. Estos datos apoyan también la idea de un posible uso de p8/TTDA para terapia génica en pacientes con defectos en TFIIH y/o el desarrollo de fármacos basados en p8 que semejen la acción de esta proteína en la estabilidad de TFIIH.

Actualmente estamos por demostrar que la estabilidad del complejo TFIIH se reestablece *in vivo* en las mutantes heteroalélicas Dmp52 en presencia de una copia silvestre de TTDA/p8.

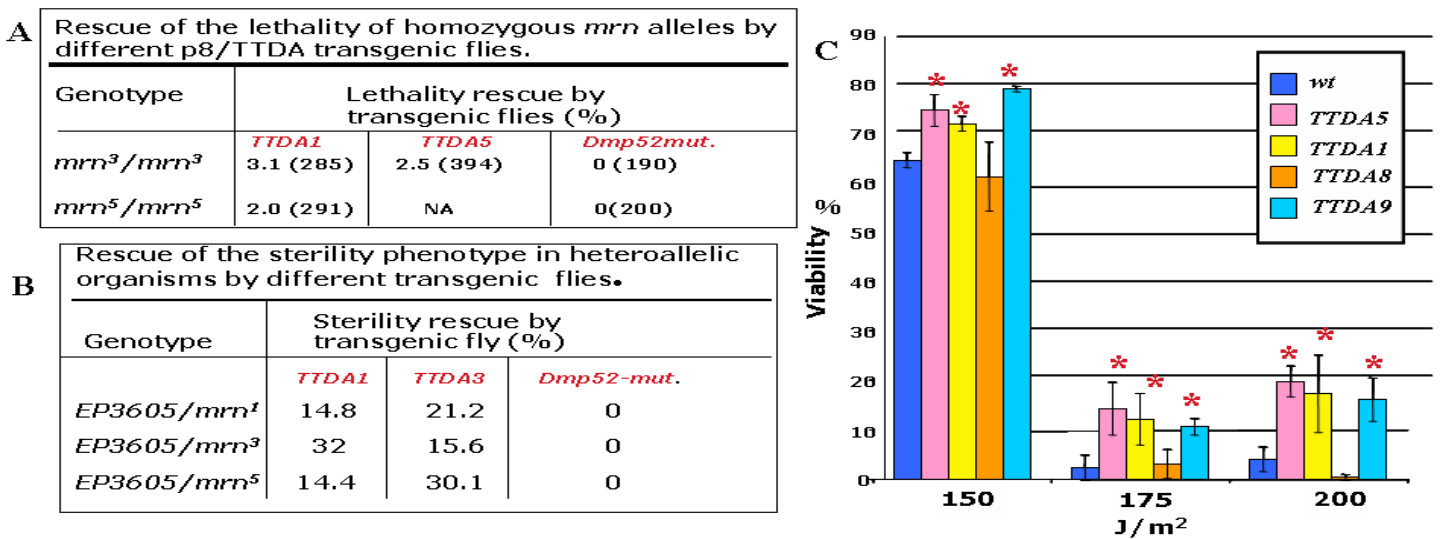


Figura 15. Transcomplementación de mutantes *mrn* con la sobreexpresión de DmTTDA/p8 silvestre. (A) Rescate del fenotipo de letalidad por diferentes líneas transgénicas que sobreexpresan p8/TTDA silvestre. (B) Rescate del fenotipo de esterilidad por diferentes líneas transgénicas que sobreexpresan p8/DmTTDA silvestre. (C) Incremento en la resistencia a radiación UV de diferentes líneas que sobreexpresan de una a tres copias de p8/DmTTDA silvestre comparadas con la línea control (*wt*). El análisis estadístico por ANOVA indica una $P < 0.0001$ para cada línea transgénica al compararla con la línea control a 175 y 200 J/m^2 .

ABREVIATURAS

ATPasa	proteína con capacidad de hidrolizar ATP
CAK	subcomplejo de cinasa dependiente de ciclina
cDNA	DNA complementario
Cdk7	cinasa dependiente de ciclina 7
Cdk9-CycD	complejo de cinasa dependiente de ciclina 9 y ciclina D
Core	subcomplejo central de TFIIH
CTD	dominio carboxilo terminal de la RNA pol II
CUL4-DDB-ROC1	complejo de ligasa de ubiquitina
CycH	ciclina H
Dmp52	proteína p52 de <i>Drosophila</i>
<i>Dmp52</i>	homólogo del gen <i>p52</i> en <i>Drosophila melanogaster</i>
<i>DmXPD</i>	homólogo de XPD en <i>Drosophila melanogaster</i>
DNA	ácido desoxiribonucleico
<i>hay</i>	<i>haywire</i> homólogo de XPB en <i>Drosophila melanogaster</i>
hp52	proteína p52 de humano
ISWI	complejo remodelador de cromatina
kDa	kilodaltones
<i>mrn</i>	<i>marionette</i> homólogo de p52 en <i>Drosophila melanogaster</i>
MAT1	proteína que pertenece al subcomplejo CAK de TFIIH
p8/TTDA	proteína p8 de TFIIH
p34	proteína p34 de TFIIH
p44	proteína p44 de TFIIH
p52	proteína p52 de TFIIH
p62	proteína p62 de TFIIH
rRNA	RNA ribosomal
RNA pol I	RNA polimerasa I
RNA pol II	RNA polimerasa II
RNA _m	RNA mensajero
REN	reparación por escisión de nucleótidos
RPA	verifica el daño al DNA
SC	síndrome de Cockayne
Sf9	línea celular de insecto
TATA	elemento presente en el promotor en donde se une la TBP
TAFs	proteínas asociadas a la TBP
TBP	proteína de unión a la caja TATA
TFIIA	factor de transcripción A asociado a la RNA pol II
TFIIB	factor de transcripción B asociado a la RNA pol II
TFIID	factor de transcripción D asociado a la RNA pol II
TFIIE	factor de transcripción E asociado a la RNA pol II
TFIIF	factor de transcripción F asociado a la RNA pol II
TFIIH	factor de transcripción H asociado a la RNA pol II
TFIIx	factores transcripción asociados a la RNA pol II
TIF-IB-SL1	complejo que contiene a la TBP y tres TAFs
TTD	tricotodistrofia
UBF	upstream binding factor
UV	ultravioleta
<i>wt</i>	“wild type”, silvestre

XP	xeroderma pigmentosum
XPA	verifica el daño al DNA
XPB	helicasa 3'-5' de TFIIH
XPC-hHR23B	complejo que reconoce el daño al DNA
XPD	helicasa 5'-3' de TFIIH
XPF/ERCC1	endonucleasa 5'
XPG	endonucleasa 3'

REFERENCIAS

- Andressoo JO, Jans J, de Wit J, Coin F, Hoogstraten D, van de Ven M, Toussaint W, Huijmans J, Thio HB, van Leeuwen WJ, de Boer J, Egly JM, Hoeijmakers JH, van der Horst GT, Mitchell JR. 2006. Rescue of progeria in trichothiodystrophy by homozygous lethal Xpd alleles. *PLoS Biol.* 4:e322.
- Araujo SJ, Tirode F, Coin F, Pospiech H, Syvaoja JE, Stucki M, Hubscher U, Egly JM, Wood RD. 2000. Nucleotide excision repair of DNA with recombinant human proteins: definition of the minimal set of factors, active forms of TFIIH, and modulation by CAK. *Genes Dev.* 14:349-59.
- Badenhorst P, Voas M, Rebay I, Wu C. 2002. Biological functions of the ISWI chromatin remodeling complex NURF. *Genes Dev.* 16:3186-98.
- Bergmann E, Egly JM. 2001 Trichothiodystrophy, a transcription syndrome. *Trends Genet.* 17:279-86.
- Berneburg M, Lowe JE, Nardo T, Araujo S, Foustari MI, Green MH, Krutmann J, Wood RD, Stefanini M, Lehmann AR. 2000. UV damage causes uncontrolled DNA breakage in cells from patients with combined features of XP-D and Cockayne syndrome. *EMBO J.* 19:1157-66.
- Botta E, Nardo T, Lehmann AR, Egly JM, Pedrini AM, Stefanini M. 2002. Reduced level of the repair/transcription factor TFIIH in trichothiodystrophy. *Hum Mol Genet.* 11:2919-28.
- Bradsher J, Coin F, Egly JM. 2000. Distinct roles for the helicases of TFIIH in transcript initiation and promoter escape. *J Biol Chem.* 275:2532-8.
- Bohr VA, Sander M, Kraemer KH. 2005. Rare diseases provide rare insights into DNA repair pathways, TFIIH, aging and cancer center. *DNA Repair* 4:293-302.
- Brehme KS. 1999. A study of the effect on development of minute mutations in *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* 24:131-161.
- Casati A, Stefanini M, Giorgi R, Ghetti P, Nuzzo F. 1991. Chromosome rearrangements in normal fibroblasts from xeroderma pigmentosum homozygotes and heterozygotes. *Cancer Genet Cytogenet.* 51:89-101.
- Castro J, Merino C, Zurita M. 2002. Molecular characterization and developmental expression of the TFIIH factor p62 gene from *Drosophila melanogaster*: effects on the UV light sensitivity of a p62 mutant fly. *DNA Repair.* 1:359-68.

- Chen J, Larochelle S, Li X, Suter B. 2003. Xpd7 Ercc2 regulates CAK activity and mitotic progression. *Nature* 424, 228-232.
- Clarkson SG, Wood RD. 2005. Polymorphisms in the human XPD (ERCC2) gene, DNA repair capacity and cancer susceptibility: an appraisal. *DNA Repair*. 4: 1068-1074.
- Coin F, Marinoni JC, Rodolfo C, Fribourg S, Pedrini AM, Egly JM. 1998. Mutations in the XPD helicase gene result in XP and TTD phenotypes, preventing interaction between XPD and the p44 subunit of TFIIH. *Nat Genet*. 20,184-8.
- Coin F, Bergmann E, Tremeau-Bravard A, Egly JM. 1999. Mutations in XPB and XPD helicases found in xeroderma pigmentosum patients impair the transcription function of TFIIH. *EMBO J*.18:1357-66.
- Coin F, Egly JM. 2003. Assay of promoter melting and extension of mRNA: role of TFIIH subunits. *Methods Enzymol*. 370:713-33.
- Coin F, Proietti De Santis L, Nardo T, Zlobinskaya O, Stefanini M, Egly JM. 2006. p8/TTD-A as a repair-specific TFIIH subunit. *Mol Cell*. 2:215-26.
- Coin F, Oksenysh V, Egly JM. 2007. Distinct Roles for the XPB/p52 and XPD/p44 Subcomplexes of TFIIH in damaged DNA opening during nucleotide excision repair. *Mol Cell*. 262:245-56.
- Dahmus M. 1995. Phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Biochim. Biophys. Acta* 1261, 171-182.
- de Boer J, de Wit J, van Steeg H, Berg RJ, Morreau H, Visser P, Lehmann AR, Duran M, Hoeijmakers JH, Weeda G. 1998. A mouse model for the basal transcription/DNA repair syndrome trichothiodystrophy. *Mol Cell*. 1:981-90.
- de Boer J, Hoeijmakers JH. 1999. Cancer from the outside, aging from the inside: mouse models to study the consequences of defective nucleotide excision repair. *Biochimie*. 81:127-37.
- Dubaele S, Proietti De Santis L, Bienstock RJ, Keriell A, Stefanini M, Van Houten B, Egly JM. 2003. Basal transcription defect discriminates between xeroderma pigmentosum and trichothiodystrophy in XPD patients. *Mol. Cell* 11: 1635-1646.
- Dvir A, Conaway JW, Conaway RC. 2001. Mechanism of transcription initiation and promoter escape by RNA polymerase II. *Curr Opin Genet Dev*. 11:209-14.
- Egly JM. 2001. TFIIH: from transcription to clinic. *FEBS letters* 24884: 124-128.

- Farnsworth MW. 1957. Effects of Homozygous First, Second and Third Chromosome minutes on the development of *Drosophila Melanogaster*. Genetics. 42:19-27.
- Fisher RP. 2005. Secrets of a double agent: CDK7 in cell cycle control and transcription. J.Cell Sci. 118: 5171-5180.
- Fregoso M, Laine JP, Aguilar-Fuentes J, Moquet V, Reynaud E, Coin F, Egly JM, Zurita M. 2007. DNA repair and transcriptional deficiencies caused by mutations in the *Drosophila* p52 subunit of TFIIH generate developmental defects and chromosome fragility. Mol Cell Biol.
- Fuss JO, Cooper PK. 2006. DNA repair: dynamic defenders against cancer and aging. PLoS Biol. 4:e203.
- Garfinkel DJ, Bailis AM. 2002. Nucleotide Excision Repair, Genome stability, and human disease: New insight from model systems. J. Biome. Biotechnol 2: 55-60.
- Gerber HP, Hagmann M, Seipel K, Georgiev O, West MA, Litington Y, Schaffner W, Corden JL. 1995. RNA polymerase II C-terminal domain required for enhancer-driven transcription. Nature. 374:660-2.
- Giglia-Mari G, Coin F, Ranish JA, Hoogstraten D, Theil A, Wijgers N, Jaspers NG, Raams A, Argentini M, van der Spek PJ, Botta E, Stefanini M, Egly JM, Aebersold R, Hoeijmakers JH, Vermeulen W. 2004. A new, tenth subunit of TFIIH is responsible for the DNA repair syndrome trichothiodystrophy group A. Nat Genet. 36:714-9.
- Giglia-Mari G, Miquel C, Theil AF, Mari PO, Hoogstraten D, Ng JM, Dinant C, Hoeijmakers JH, Vermeulen W. 2006. Dynamic interaction of TTDA with TFIIH is stabilized by nucleotide excision repair in living cells. PLoS Biol. 4:e156.
- Gorski MM, Romejin RJ, Eeken JCJ, de Jong AMM, van Veen BL, Szuhai K, Mullunders LL, Ferro W, Pastink A. 2004. Disruption of *Drosophila* Rad50 causes pupal lethality, the accumulation of DNA double-strand breaks and the induction of apoptosis in the third instar larvae. DNA repair 3: 603-615.
- Guo Z, Heydari A, Richardson A. 1998. Nucleotide excision repair of actively transcribed versus nontranscribed DNA in rat hepatocytes: effect of age and dietary restriction. Exp Cell Res. 245:228-38.
- Gutierrez L, Merino C, Vazquez M, Reynaud E, Zurita M. 2004. RNA polymerase II 140 wimp mutant and mutations in the TFIIH subunit XPB differentially affect homeotic gene expression in *Drosophila*. Genesis 40: 58-66.

- Huang L, Ohsako S, Tanda S. 2005. The lesswright mutation activates Rel-related proteins, leading to overproduction of larval hemocytes in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 280: 407-420.
- Iben S, Tschochner H, Bier M, Hoogstraten D, Hozak P, Egly JM, Grummt I. 2002. TFIIH plays an essential role in RNA polymerase I transcription. *Cell.* 109:297-306.
- Jawhari A, Lainé J, Dubaele S, Lamour V, Poterszman F, Coin F, Moras D, Egly J. 2002. p52 mediates XPB function within the transcription/repair factor TFIIH. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 31761-31767.
- Kops GJP, Weaver BAA, Cleeland DW. 2005. On the road to cancer: Aneuploidy and mitotic checkpoint. *Nature Rev. in Cancer* 5: 773-785.
- Kornberg TB, Krasnow MA. 2002. The *Drosophila* Genome Sequence: Implications for biology and medicine. *Science* 287, 2218-2220.
- Laine JP, Egly JM. 2006. Initiation of DNA repair mediated by a stalled RNA polymerase IIO. *EMBO J.* 25: 387-397.
- Laine JP, Egly JM. 2006. When transcription and repair meet: 1 a complex system. *Trends Genet.* 22: 430-436.
- Lanza A, Lagomarsini P, Casati A, Ghetti P, Stefanini M. 1997. Chromosomal fragility in the cancer-prone disease xeroderma pigmentosum preferentially involves bands relevant for cutaneous carcinogenesis. *Int. J. Cancer.* 74: 654-653
- Larochelle S, Pandur J, Fisher RP, Salz H, Suter B. 1998. Cdk7 is essential for mitosis and for in vivo Cdk-activating kinase activity. *Genes and Dev.* 12: 370-381.
- Lehmann AR. 1995. Nucleotide excision repair and the link with transcription. *Trends Biochem Sci.* 20:402-5.
- Lehmann AR. 1998. Dual functions of DNA repair genes: molecular, cellular, and clinical implications. *Bioessays.* 20:146-55.
- Lehmann AR. 2002. Ageing: Repair and transcription keep us from premature ageing. *Curr. Biol.* 12: 550-551.
- Lehmann AR. 2003. DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *Biochimie.* 85:1101-11.

- LeRoy G, Drapkin R, Weis L, Reinberg D. 1998. Immunoaffinity purification of the human multisubunit transcription factor IIH. *J. Biol. Chem.* 273, 7134-7140.
- Lewin B. *Genes V.* Oxford University Press. 1995, Quinta Edición. p.p.845-910.
- Licht CL, Stevnsner T, Bohr VA. 2003. Cockayne syndrome group B cellular and biochemical functions. *Am J Hum Genet.* 73:1217-39.
- Lindahl T, Karran P, Wood RD. 1997. DNA excision repair pathways. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7: 158-169.
- Martinez E. 2002. Multi-protein complexes in eukaryotic gene transcription. *Plant Mol Biol.* 50:925-47.
- Matthews KA, Kaufman TC, Gelbart WM. 2005. Research resources for *Drosophila*: the expanding universe. *Nat. Rev. Genet.* 6:179-93
- Maxon ME, Goodrich JA, Tjian R. 1994. Transcription factor IIE binds preferentially to RNA polymerase IIa and recruits TFIIH: a model for promoter clearance. *Genes Dev.* 8:515-24.
- Merino C, Reynaud E, Vazquez M, Zurita M. 2002. DNA repair and transcriptional effects of mutations in TFIIH in *Drosophila* development. *Mol Biol Cell.* 13:3246-56.
- Merino E, Osuna J, Bolivar F, Soberon X. 1992. A general PCR-based method for single or combinatorial oligonucleotide-directed mutagenesis on pUC/M13 vectors. *Biotechn.* 12: 508-510.
- Moreland RJ, Tirode F, Yan Q, Conaway JW, Egly JM, Conaway RC. 1999. A role for the TFIIH XPB DNA helicase in promoter escape by RNA polymerase II. *J Biol Chem.* 274:22127-30.
- Mounkes LC, Jones RS, Liang BC, Gelbart W, Fuller MT. 1992. A *Drosophila* model for xeroderma pigmentosum and Cockayne's syndrome: haywire encodes the fly homolog of ERCC3, a human excision repair gene. *Cell.* 71:925-37.
- Mu D, Sancar A. 1997. Model for XPC-independent transcription-coupled repair of pyrimidine dimers in humans. *J Biol Chem.* 272:7570-3.
- Mullenders LH. 1998. Transcription response and nucleotide excision repair. *Mutat Res.* 409:59-64.
- Park E, Guzder SN, Koken MH, Jaspers-Dekker I, Weeda G, Hoeijmakers JH, Prakash S, Prakash L. 1992. RAD25 (SSL2), the yeast homolog of the

- human xeroderma pigmentosum group B DNA repair gene, is essential for viability. Proc Natl Acad Sci U S A. 89:11416-20.
- Perez C, Auriol J, Gerst C, Bernard BA, Egly JM. 1999. Genomic organization and promoter characterization of two human UHS keratin genes. Gene. 227:137-48.
- Reiter LT, Potocki L, Chien S, Gribskov M, Bier E. 2001. A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. Genome Res. 11:1114-25
- Reynaud E, Lomeli H, Vazquez M, Zurita M. 1999. The *Drosophila melanogaster* homologue of the xeroderma pigmentosum D gene product is located in euchromatic regions and has a dynamic response to uv light-induced lesions in polytene chromosomes. Mol Biol Cell. 10:1191-203.
- Riedl T, Hanaoka F, Egly JM. 2003. The comings and goings of nucleotide excision repair factors on damaged DNA. EMBO J. 22: 5293-5303.
- Rossignol M, Kolb-Cheynel I, Egly JM. 1997. Substrate specificity of the cdk2 activating kinase (CAK) is altered upon association with TFIIF. EMBO J. 16: 1628-1637.
- Saeboe-Larssen S, Lyamouri M, Merriam J, Oksvold MP. 1998. Ribosomal protein insufficiency and the minute syndrome in *Drosophila*: a dose-response relationship. Genetics 148: 1215-1224.
- Sandoval MT, Zurita M. 2001. Increased UV light sensitivity in transgenic *Drosophila* expressing the antisense XPD homolog. Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 11:125-8.
- Seroz T, Hwang JR, Moncollin V, Egly JM. 1995. TFIIF: a link between transcription, DNA repair and cell cycle regulation. Curr Opin Genet Dev. 5:217-21.
- Shivji MK, Moggs JG, Kuraoka I, Wood RD. 1999. Dual-incision assays for nucleotide excision repair using DNA with a lesion at a specific site. Methods Mol. Biol. 113: 373-392.
- Silva E, Tiong S, Pedersen P, Homola E, Royou A, Fasulo B, Siriaco G, Campbell SD. 2004. ATM is required for telomere maintenance and chromosomal stability during *Drosophila* development. Curr. Biol. 14: 1341-1347.
- Spradling A, Rubin G. 1982. Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. Science 218: 341-347.

- Takata K, Yoshida H, Yamaguchi M, Sakaguichi K. 2004. *Drosophila* damaged DNA-binding protein 1 is an essential factor for development. *Genetics* 168: 855-865.
- Takata K, Shimanouchi K, Yamaguchi M, Murakami S, Ishikawa G, Takeuchi R, Kanai Y, Ruike T, Nakamura R, Abe Y, Sakaguchi K. 2004. Damaged DNA binding protein 1 in *Drosophila* defense reactions. *Bioch. Biophys. Res. Com.* 323: 1024-1031.
- Tirode F, Busso D, Coin F, Egly JM. 1999. Reconstitution of the transcription factor TFIIH: assignment of functions for the three enzymatic subunits, XPB, XPD, and cdk7. *Mol Cell.* 3:87-95.
- van Hoffen A, Kalle WH, de Jong-Versteeg A, Lehmann AR, van Zeeland AA, Mullenders LH. 1999. Cells from XP-D and XP-D-CS patients exhibit equally inefficient repair of uv-induced damage in transcribed genes but different capacity to recover uv-inhibited transcription. *Nucleic Acids Res.* 27:2898-904
- Venken KJ, Bellen HJ. 2005. Emerging technologies for gene manipulation in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Rev. Genet.* 6:167-78
- Vermeulen W, Bergmann E, Auriol J, Rademakers S, Frit P, Appeldoorn E, Hoeijmakers JH, Egly JM. 2000. Sublimiting concentration of TFIIH transcription/DNA repair factor causes TTD-A trichothiodystrophy disorder. *Nat Genet.* 26:307-13.
- Wang H, Zhai L, Xu J, Joo HY, Jackson S, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Xiong Y, Zhang Y. 2006. Histone H3 and H4 ubiquitylation by the CUL4-DDB-ROC1 ubiquitin ligase facilitates cellular response to DNA damage. *Mol Cell.* 22:383-94.
- Weeda G, van Ham RC, Masurel R, Westerveld A, Odijk H, de Wit J, Bootsma D, van der Eb AJ, Hoeijmakers JH. 1990. Molecular cloning and biological characterization of the human excision repair gene ERCC-3. *Mol Cell Biol.* 10:2570-81.
- Weeda G, van Ham RC, Vermeulen W, Bootsma D, van der Eb AJ, Hoeijmakers JH. 1990. A presumed DNA helicase encoded by ERCC-3 is involved in the human repair disorders xeroderma pigmentosum and Cockayne's syndrome. *Cell.* 62:777-91.
- Winkler GS, Hoeijmakers JH. 1998. From a DNA helicase to brittle hair. *Nat Genet.* 20:106-7.
- Zynick DL, McGonnigal BG, Dearolf CR. 1993. *Drosophila* awdk-pn, a homologue of the metastasis suppressor gene nm23, suppress the Tum-1 hematopoietic oncogene. *Nat. Gen.* 4:195-201.

Zurita M, Merino C. 2003. The transcriptional complexity of the TFIID complex. *Trends in Genet.* 19:578-584.