



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

---

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA DEL DESARROLLO Y FISIOLOGÍA  
MOLECULAR

**Búsqueda de proteínas que interaccionan con  
TonalliA en *Drosophila melanogaster***

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**B.Q. MARÍA LUCÍA GUTIÉRREZ AGUIAR**

DIRECTOR DE TESIS:

**DRA. MARTHA VÁZQUEZ LASLOP**

Cuernavaca, Morelos, Diciembre de 2009



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**

En primer lugar quiero agradecer a mi tutora la Dra. Martha Vázquez por dirigir mi proyecto de investigación con sabiduría y por su gran apoyo tanto a nivel académico como personal durante el tiempo de mi estadía en su laboratorio, muchas gracias!

Agradezco al Instituto de Biotecnología, a la UNAM y al Conacyt por permitirme desarrollarme como científica en su institución.

Agradezco al Dr. Mario Zurita por permitirme llevar a cabo este proyecto en su laboratorio y por sus consejos a lo largo del desarrollo del mismo.

También agradezco especialmente a la Dra. Viviana Valdez por siempre escuchar mis dudas y responderlas con cuidado y atención, así como a mi compañera de Maestría y de “mesa” M.C. Grisel Cruz por su apoyo incondicional y su paciencia durante el tiempo y espacio que compartimos en este laboratorio.

A todos mis compañeros de laboratorio que siempre dijeron “sí” ante cualquier pedido de ayuda y son y serán siempre recordados como un excelente grupo. A Zoraya, Mariana, Alejandro, Juan Luis, Claudia y Javier.

Finalmente agradezco a la vida por tener una vida y una familia maravillosa. A mi esposo Bola y mis hijas Sol y Victoria que son siempre mi fuente de energía y de inspiración para seguir creciendo más y más en todos los ámbitos de mi vida, GRACIAS.

INTRODUCCIÓN .....	5
Los genes homeóticos .....	5
Los complejos Brahma en <i>D. melanogaster tonalli</i> .....	6
La sumoilación .....	8
La sumoilación .....	12
Hipótesis .....	15
Objetivo General .....	15
Objetivos particulares: .....	15
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....	16
MATERIAL Y MÉTODOS .....	17
1. Amplificación por PCR .....	17
2. Clonación .....	18
3. Expresión, solubilización y purificación de GST-TnaA .....	20
4. Obtención de extracto nuclear de embriones de 3 a 21 h de <i>Drosophila</i> .....	21
5. Obtención de extractos de proteínas totales de <i>Drosophila</i> .....	21
6. Transferencia de proteínas y Western blot .....	21
7. Ensayo de interacción “Pull Down” .....	22
8. Obtención y mapeo de inserciones en líneas de moscas transgénicas .....	22
9. Estabilización de las líneas transgénicas .....	26
10. Análisis de la expresión de las proteínas recombinantes FLAG-TnaA y TnaA-FLAG en la mosca. ....	27
RESULTADOS .....	29
1. Detección de proteína TnaA endógena en extractos nuclear y citoplásmico de embriones de moscas silvestres OreR .....	29
2. Etiquetamiento molecular de TnaA. ....	30
2.1 Construcción de la fusión <i>FLAG-tnaA</i> .....	30
2.2 Construcción de la fusión <i>tnaA-FLAG</i> .....	34
3. Obtención y mapeo de inserciones en líneas transgénicas .....	36
4. Estabilización de las líneas transgénicas mapeadas .....	37
5. Expresión de las proteínas recombinantes FLAG-TnaA y TnaA-FLAG en la mosca. ....	38
6. Construcción de la fusión GST-TnaA .....	40
7. Expresión y purificación de la proteína de fusión GST-TnaA en <i>E. coli</i> . ....	41
8. Ensayo de interacción tipo “Pull Down” en extracto nuclear de embriones de 3 a 21 h .....	42
Discusión .....	43
Conclusiones .....	49
Perspectivas .....	50
BIBLIOGRAFÍA .....	51

Eliminado: 28

Eliminado: 31

## Resumen

*tonalli (tna)* es un gen trithorax requerido para la correcta expresión de genes homeóticos. *tna* interacciona genéticamente con los genes *brm*, *osa* y *mor* que codifican para componentes del complejo remodelador de la cromatina Brahma (Brm). Brm es la subunidad catalítica del complejo y tiene actividad de ATPasa. *tna* también interacciona con *kis* un gen que codifica para otra ATPasa (Kismet) así como con *skuld* que codifica para la sub-unidad MED13 (TRAP240) del Mediador, entre otros genes. Existen al menos dos isoformas de Tonalli, una isoforma larga (TnaA) y una isoforma corta (TnaB). La proteína TnaA presenta un dedo de zinc tipo SP-RING característico de algunas E3 ligasas involucradas en la vía de la sumoilación. Hemos etiquetado a TnaA con GST y hemos llevado a cabo experimentos tipo “pull down” en extractos nucleares de embriones de 3 a 21 h donde hemos identificado a la ATPasa Brm. Esta evidencia indica que Brm y TnaA podrían interactuar físicamente *in vivo*. También hemos agregado la etiqueta FLAG a TnaA en su extremo amino y carboxilo de manera independiente, y se han generado líneas de moscas transgénicas con cada una de las versiones etiquetadas. Dichas moscas pueden expresar a TnaA-FLAG ó FLAG-TnaA en etapas del desarrollo y/o tejidos específicos utilizando distintos “drivers” de expresión.

## Abstract

*tonalli (tna)* is a trithorax gene required for the adequate expression of homeotic genes. *tna* interacts genetically with *brm*, *osa* and *mor* genes which encode subunits of the Brahma (Brm) chromatin remodeling complex. Brm is the catalytic subunit of the complex and it has ATPase activity. *tna* also interacts with *kis* which encodes another ATPase (Kismet) and with *skuld* which encodes the MED13 (TRAP240) subunit of the Mediator, among other genes. There are at least two isoforms of Tonalli, a long one (TnaA) and a short one (TnaB). TnaA has an SP-RING Zn finger, which is characteristic of some E3 ligases involved in the sumoylation of proteins. We have tagged TnaA with GST and we have performed GST-TnaA pull downs in 3-21 h embryonic nuclear extracts where we have identified Brm. This evidence suggests that TnaA and Brm can physically interact *in vivo*. We have also tagged TnaA with FLAG in its amino- and carboxi-termini independently, and we have established transgenic fly lines with these two tagged versions. These flies can express FLAG-TnaA and TnaA-FLAG at different stages of development and/or in different tissues using different GAL4 drivers.

## INTRODUCCIÓN

La regulación de la expresión génica en eucariontes es un área de investigación que ha ido ganando importancia en las últimas décadas. En la era post-genómica sabemos que la secuencia de DNA no es suficiente para determinar los caracteres de un organismo sino que es necesario un mecanismo muy fino de regulación de su transcripción que permite dirigirla espacial, temporal y cuantitativamente. Dicha regulación es la que permite por ejemplo, que células con la misma secuencia de DNA sean diferentes.

En los últimos años, se ha descubierto la importancia de la remodelación de la cromatina en la regulación transcripcional, es decir, la secuencia de DNA debe ser accesible a la maquinaria de transcripción para poder expresarse en tiempo y espacio adecuados. Los procesos de remodelación de la cromatina los llevan a cabo los complejos remodeladores y las enzimas modificadoras de la cromatina.

En nuestro laboratorio estamos interesados en estudiar la expresión del genoma eucarionte y para esto utilizamos a los genes homeóticos de *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) como reporteros.

### **Los genes homeóticos**

Los genes homeóticos (HOX) forman parte del grupo de genes encargado de dirigir el desarrollo animal para formar las estructuras y los órganos característicos de cada parte del cuerpo. Esto lo hacen codificando para factores de transcripción activos en diferentes segmentos del organismo, donde controlan la activación de genes blanco requeridos para determinar la identidad de los mismos.

El número de genes homeóticos varía según el animal. En *D. melanogaster* existen ocho genes HOX: *labial (lab)*, *proboscipedia (Pb)*, *Deformed (Dfd)*, *Sex combs reduced (Scr)*, *Antennapedia (Antp)*, *Ultrabithorax (Ubx)*, *abdominal-A (abd-A)*, *Abdominal-B (Abd-B)*, y se encuentran agrupados en dos complejos; Antennapedia (ANTC) y bithorax (BXC) (Kaufman *et al.*, 1980; Sánchez-Herrero *et al.*, 1985). Algo que resulta interesante es que el orden de dichos genes en el cromosoma corresponde con el orden de las regiones sobre las cuales influye, en el embrión y en el adulto, es decir, existe colinearidad entre éstas (Lewis, 1978).

Cuando los genes HOX no se expresan de manera adecuada, se obtienen individuos con transformaciones de un segmento en otro que se conocen como transformaciones homeóticas (revisado en Kennison, 2004), lo cual revela su gran importancia en el desarrollo del organismo. De hecho, la pérdida total de la función de un gen homeótico es

letal en el desarrollo temprano. Las mutaciones estudiadas surgen de pérdidas parciales de función o dominantes en heterócigos. Estas transformaciones, con fenotipos tan evidentes, permiten utilizar a los genes HOX como modelo para el estudio de la expresión génica en eucariontes.

La expresión de los genes HOX se activa en el embrión a través de la acción de las proteínas de segmentación de los grupos "Gap" y "Pair Rule" (revisado en Lawrence y Morata, 1994). Dichas proteínas desaparecen más tarde en el desarrollo y la expresión o represión de los genes HOX en las zonas y etapas correctas es mantenida por factores específicos. En *D. melanogaster* dichos factores son codificados por dos grupos de genes: los genes del grupo **trithorax** (trxG) son factores de regulación positiva que mantienen la expresión de los genes HOX en los sitios y tiempos correctos, y los genes del grupo **Polycomb** (PcG) mantienen su represión (revisado en Lawrence y Morata, 1994).

### **Los complejos Brahma en *D. melanogaster***

Mientras que las proteínas del PcG tienen actividades altamente dirigidas a secuencias específicas (PRE) en los genes, las proteínas del trxG emplean una mayor diversidad de mecanismos para mantener la expresión de sus genes blanco.

Una manera mediante la cual los genes del trxG regulan la expresión de los genes homeóticos es mediante la remodelación de la cromatina, formando parte o regulando a complejos remodeladores de cromatina (CRC) (Collins *et al.*, 1999; Kal *et al.*, 2000; Papoulas *et al.*, 1998, entre otras).

Los CRC se encuentran en todos los organismos eucariontes y están muy conservados en levadura, *Drosophila* y mamíferos. Estos complejos, utilizan la energía de hidrólisis de ATP para actuar sobre la cromatina de diversas maneras, pueden cambiar la posición de los nucleosomas (Belikov *et al.*, 2001, Fazzio y Tsukiyama, 2003), cambiar su conformación (Flaus y Owen-Hughes, 2001, Vignali *et al.*, 2000), pueden disociar a las histonas del DNA (Reinke y Horz, 2003) ó intercambiar unas por otras (Kurgan *et al.*, 2003, Mizuguchi *et al.*, 2003).

Todas estas acciones tienen el propósito de descubrir o cubrir zonas de DNA que estaban previamente inaccesibles ó accesibles para la maquinaria de transcripción y es así como pueden regular la expresión o el silenciamiento de genes.

Además tanto las subunidades que forman a los complejos remodeladores como las histonas que forman los nucleosomas pueden ser modificadas postraduccionalmente de

diversas formas. Esto constituye otro nivel de regulación de la expresión génica (Berger *et al.*, 2007, Turner *et al.*, 2007, Bourachot *et al.*, 2003, Glaros *et al.*, 2007).

Los CRC no sólo están involucrados en la regulación de la transcripción sino que su acción también regula a la replicación y a la reparación de daño al DNA y otros procesos celulares.

Es evidente la importancia de los complejos remodeladores de la cromatina en procesos esenciales de la célula. De hecho, hoy en día, las alteraciones epigenéticas se consideran tan importantes como las alteraciones en el DNA como factores determinantes de cáncer. Las mutaciones en algunas subunidades de los CRC en humanos, revelan la conexión directa entre éstos y el cáncer. Por ejemplo en el CRC Brahma (ver más adelante) la subunidad SNF5 es un supresor tumoral (Roberts y Orkin, 2004) y se ha encontrado pérdida bialélica del gen en algunos tipos de cáncer (Versteeg, *et al.*, 1998; Modena *et al.*, 2005). También algunas alteraciones en las ATPasas Brahma y BRG1 de estos complejos están involucradas en distintos tipos de cáncer como el pancreático, de pulmón, de mama y de próstata (Roberts y Orkin, 2004; Reisman *et al.*, 2003). Aunque aún no se determina exactamente cómo es que los CRC participan en el desarrollo de tumores, las evidencias que interrelacionan a ambos procesos continúan surgiendo.

En *Drosophila*, un CRC importante es el complejo Brahma (Armstrong, *et al.*, 2002), pues lleva a cabo la mayor parte de la remodelación de cromatina. Este complejo contiene una ATPasa de tipo SWI/SNF, llamada también Brahma (Tamkun *et al.*, 2002). La ATPasa Brahma, puede estar en al menos dos complejos, BAP ("Brahma Associated Proteins") y PBAP (Mohrmann *et al.*, 2004). El complejo BAP está conformado por las subunidades Brahma, Osa, Moira, BAP111, BAP60, BAP55 (ARP, Actin-Related Protein), actina y Snr1. El complejo PBAP está constituido por Brahma, Polybromo, BAP170, Moira, BAP111, BAP60, BAP55 (ARP), actina, Snr1 y SAYP (Mohrmann y Verrijzer, 2005, Chalkley *et al.* 2008). Esta subdivisión del CRC Brahma, existe también en los complejos de tipo SWI/SNF de levaduras y de humanos (Mohrman *et al.*, 2004). Acorde con las evidencias genéticas (Kennison, J. A. and M. A. Russell 1987 y Vázquez *et al.*, 1999) estudios recientes revelan que aunque pueden existir estos dos complejos de manera mayoritaria en la célula, existen también otros complejos donde las subunidades exclusivas de los complejos BAP y PBAP (Osa y Polybromo y SAYP respectivamente) co-existen (Ryme *et al.*, 2009), así como también pueden existir otras proteínas que interaccionan con los complejos de manera más transitoria (Armstrong *et al.*, 1998, Sif *et al.*, 2001, entre otras) y/o tejido- y etapa-específica (Lessard, *et al.*, 2007 entre otros).



Estos datos reflejan el gran dinamismo que existe *in vivo* en la célula y que es quizás requerido para dar especificidad al CRC.

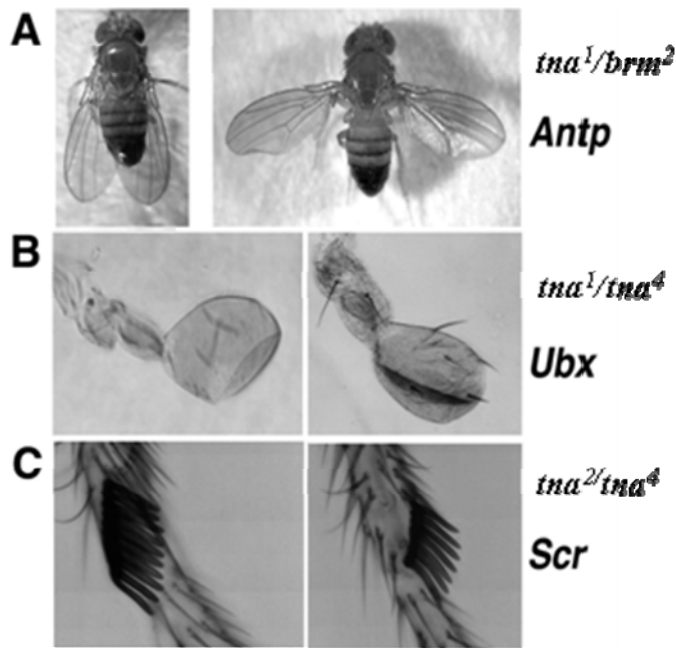
Actualmente es de gran interés para diversos grupos de investigación, conocer la especificidad de estos complejos, cómo se ensamblan, cómo se reclutan a los sitios donde se les requiere para la expresión génica, cómo se regula su actividad y cómo se integra su función al resto de las señales celulares que se reciben en el núcleo para la determinación de la expresión génica.

La identificación de algunas de las proteínas codificadas por los genes de los *trxG* y *PcG*, revelaron que varios miembros de estos grupos son subunidades de complejos remodeladores de la cromatina. En resumen, la remodelación de la cromatina se requiere para la expresión correcta de los genes HOX. Por ejemplo, *brahma (brm)*, es un gen del *trxG* (Tamkun *et al.*, 1992) que codifica para la ATPasa Brahma. Asimismo, los genes *osa (osa)* y *moira (mor)* codifican para otras subunidades de estos complejos (Osa y Moira) (Vázquez *et al.*, 1999, y Brizuela *et al.*, 1997) y se han identificado como genes del *trxG*.

*tonalli (tna)* (Gutiérrez *et al.*, 2004), el gen central del presente trabajo, es también un gen del *trxG* ya que se identificó como un gen indispensable para la expresión correcta de algunos genes homeóticos (Gutiérrez *et al.*, 2003).

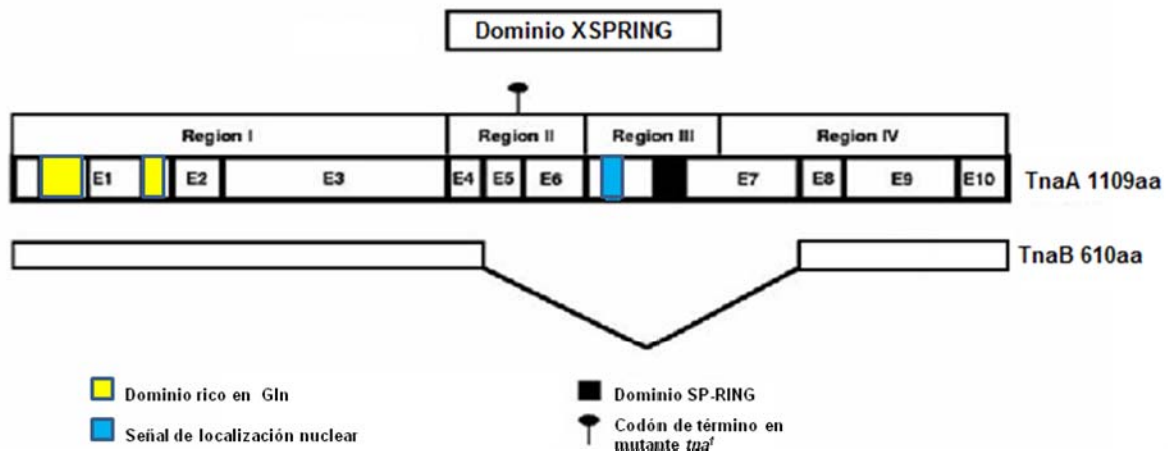
### ***tonalli***

En un análisis diseñado para identificar genes que modifican la función de la ATPasa Brahma en *Drosophila*, se identificó al gen *tna* (Gutiérrez *et al.*, 2003), que presenta las características de un gen del *trxG* y es indispensable para la expresión de varios genes HOX en *Drosophila*: *Antp*, *Ubx*, *Scr*, (Gutiérrez *et al.*, 2003) y *AbdB* (J. A. Kennison, datos no publicados) (Fig. 1). Los individuos homocigotos para mutaciones en *tna* no sobreviven a estadio adulto y los individuos que llegan al estadio de farato presentan transformaciones homeóticas. Los individuos con mutaciones en *brm* y *tna* simultáneamente presentan un fenotipo de extensión de alas (ver Fig. 1 A), resultado de la expresión deficiente de uno de los promotores del gen *Antp* (Vázquez *et al.*, 1999, Gutiérrez *et al.*, 2003).



**Fig. 1. Las mutaciones en genes que interaccionan con *brm* afectan la expresión de los genes homeóticos.** Individuos y estructuras normales (izq.); individuos mutantes (der.) A) Individuos con mutaciones en *brm* y *tna* presentan las alas extendidas que es un fenotipo de baja expresión de *Antp*. Los individuos con mutaciones en ambos alelos de *tna* presentan los fenotipos homeóticos mostrados en B y C. B) La aparición de quetas extra indica la transformación del halterio (estructura para balance) en ala. Implica baja expresión del gen homeótico *Ubx*. C) Reducción del número de peines sexuales del primer par de patas del macho por expresión deficiente del gen homeótico *Scr*.

Además de interactuar genéticamente con *brm*, *tna* interactúa con los genes que codifican para las subunidades Osa y Moira del CRC Brahma así como también con Kismet, la ATPasa de otro complejo remodelador y con Skuld, un componente del complejo Mediador, que es un coactivador de la RNA polimerasa II (Gutiérrez *et al.*, 2003). Recientemente se ha reportado que *tna* interactúa genéticamente también con uno de los genes que codifican para gamma-tubulina en *Drosophila* (Vázquez *et al.*, 2008). *tna* codifica para al menos dos isoformas; TnaA (1109 aminoácidos) y TnaB (610 aminoácidos) predichas a partir de los mRNA caracterizados (Fig. 2).



**Fig. 2 Las proteínas de *tonalli*.** En la parte superior se muestra a TnaA (1109 aa) y en la inferior a TnaB (610 aa). Sobre TnaA se indica el dominio XSPRING, el nucleótido 1708 es donde se encuentra el residuo afectado por el cambio hacia un codón de término en la mutación *tna<sup>1</sup>*. Se muestran también los dominios ricos en glutaminas (amarillo), el dedo de zinc SP-RING (negro) y la señal de localización nuclear (azul).

TnaA se divide en cuatro regiones: las regiones I y IV no presentan homología a ninguna otra proteína reportada en ningún organismo. La región I posee un dominio rico en glutamina (Gutiérrez *et al.*, 2003). La región III incluye un dedo de zinc del tipo SP-RING (Siz/PIAS-RING) y una señal de localización nuclear (NLS, de sus siglas en inglés). El dedo de zinc es una estructura muy estable, compuesta por cisteínas e histidinas coordinadas con un átomo de zinc. El dominio SP-RING es la firma de un grupo de proteínas que se han descrito funcionalmente como E3 ligasas de SUMO ("Small Ubiquitin-related Modifier") (ver más adelante). Las únicas otras proteínas con el dominio SP-RING en *Drosophila* provienen del gen *Su(var)2-10* (Hari *et al.*, 2001). Hasta el análisis más reciente, existen varias proteínas con similitud a las regiones II ó III de TnaA, pero hay muy pocas que presenten similitud a ambas regiones. En el humano y en el ratón existen dos proteínas (Zimp7 y Zimp10), que tienen un 60% de identidad a las regiones II y III de TnaA (Gutiérrez *et al.*, 2004).

Zimp7 y Zimp10 en humano son proteínas que interactúan con los receptores de andrógenos y aumentan la transcripción mediada por los mismos (Sharma *et al.*, 2003, Huang *et al.*, 2005). Hay estudios que indican que hZimp10 incrementa la sumoilación de dichos receptores, y que ambas proteínas colocalizan con SUMO-1 en el núcleo en focos de replicación (Sharma *et al.*, 2003, Huang *et al.*, 2005). Los mismos autores reportan que hZimp7 interactúa físicamente con la ATPasa Brg1 del complejo humano, así como con la subunidad BAF57 del mismo y recientemente se ha identificado la interacción física de hZimp10 con el supresor tumoral p53 así como el aumento de la transcripción

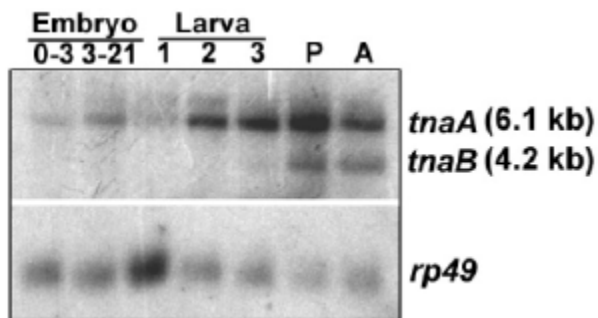
mediada por p53, en ensayos *in vitro* (Lee *et al.*, 2007). Cabe destacar que tanto hZimp7 como hZimp10 tienen un dominio de transactivación rico en prolina que no está presente en TnaA (Lee *et al.*, 2007, Huang *et al.*, 2005).

Otro dato interesante sobre las proteínas Zimp en humanos es que se encuentran distribuidas de manera tejido-específica. hZimp7 se expresa mayoritariamente en el testículo y en menor nivel en el corazón, en el cerebro, en el páncreas, en la próstata y en el ovario, con ausencia de expresión en el resto de tejidos (Huang *et al.*, 2005). hZimp10 se expresa mayoritariamente en el ovario y en menor escala en la próstata, en el bazo y en el testículo (Sharma *et al.*, 2003).

Estos resultados acerca de las proteínas que podrían ser las ortólogas de TnaA en humano concuerdan con nuestra hipótesis que considera a TnaA como una posible E3 ligasa de SUMO y con su interacción genética con Brm y plantean un panorama muy interesante sobre otras posibles interacciones de TnaA en la mosca.

Retomando el análisis molecular de *tna*, sabemos que la isoforma B posee las regiones I y II pero no contiene los dominios NLS ni SP-RING. TnaB no presenta homología con ninguna otra proteína.

Los transcritos A y B de *tna* se expresan de manera diferencial durante el desarrollo de *Drosophila* (Gutiérrez *et al.*, 2003) (Fig. 3). El transcrito de *tnaA* está presente en todas las etapas pero su expresión aumenta en el segundo instar larvario y alcanza su máxima expresión en pupa, mientras que el transcrito de *tnaB* se detecta por primera vez en el tercer instar larvario pero es más abundante en pupa y adulto (Gutiérrez *et al.*, 2003).



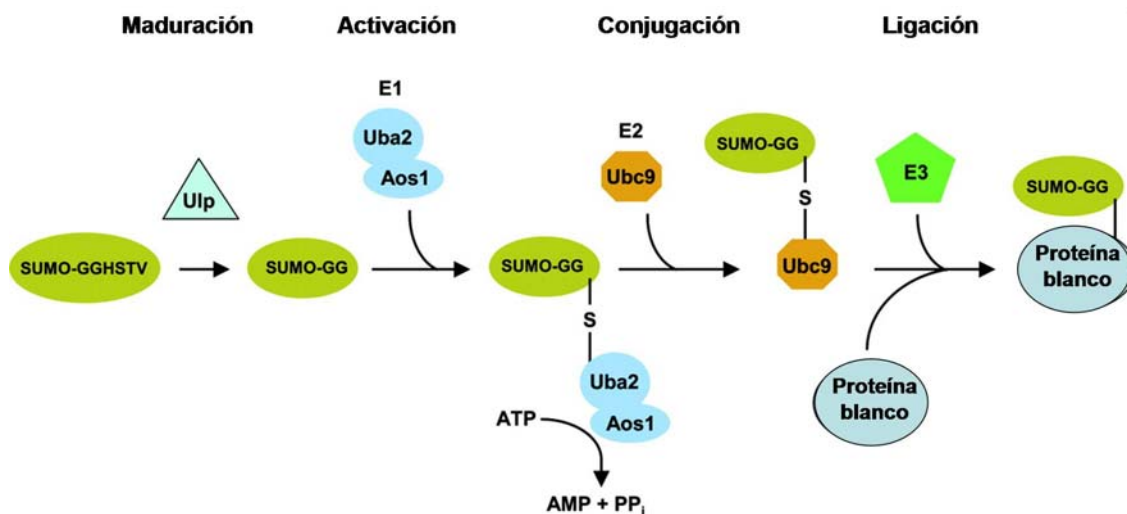
**Fig. 3 Expresión de *tnaA* y *tnaB* durante el desarrollo de *Drosophila*.**

Se detecta por Northern blot en extracto de RNA poly(a)+ de embriones de 0 a 3 h y de 3 a 21 h, larvas de primero, segundo y tercer instar (L1, L2 y L3), pupa (P) y adulto (A) el transcrito de *tnaA* en todas las etapas de desarrollo y el transcrito correspondiente a *tnaB* a partir de L3.

## La sumoilación.

La sumoilación es una modificación postraduccional en la cual SUMO, una proteína de 11 kDa similar a la ubiquitina, se une covalentemente a un residuo de lisina de la proteína blanco. En los insectos existe únicamente un tipo de SUMO, mientras que en los vertebrados existen cuatro parálogos y en las plantas ocho (Kurepa *et al.*, 2003; Saitoh y Hinchey, 2000; Tatham *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 2001). La sumoilación está involucrada en diversos procesos biológicos y es requerida para la viabilidad celular en las levaduras, los nemátodos y los eucariontes superiores (Fraser *et al.*, 2000; Hayashi *et al.*; 2002, Seufert *et al.*, 1995).

La conjugación de SUMO a sus blancos se lleva a cabo por una cascada enzimática análoga a la ubiquitinación (Fig. 4); se requiere de una enzima activadora E1 que en la sumoilación consiste de un heterodímero y una enzima E2 conjugante (Ubc9). Las E3 ligasas confieren la especificidad de la vía por sus blancos (Muller *et al.*, 2001). La sumoilación es una modificación reversible pues SUMO es removido por proteasas específicas de SUMO (Li y Hochstrasser, 1999).



**Fig. 4. Vía de sumoilación.** En esta figura se indican los cuatro pasos necesarios para la reacción de sumoilación y las enzimas involucradas en el proceso. Nótese a la E3 ligasa (pentágono verde claro) involucrada en el proceso de transferencia de SUMO desde la E2 (Ubc9) a la proteína blanco (modificado de Hilgarth, 2004.).

Muchas de las proteínas sumoiladas presentan una secuencia consenso en donde se añade una ó varias moléculas de SUMO:  $\psi$ -Lys-X-Glu donde  $\psi$  es un aminoácido hidrofóbico, comúnmente isoleucina o valina, y la X es cualquier residuo (Rodríguez *et al.*, 2001). Sin embargo, no todas las proteínas que contienen dicha secuencia son sumoiladas ni todas

las proteínas sumoiladas la presentan, por lo cual deben de participar también otros factores para determinar la especificidad de sustrato.

SUMO también puede unirse a proteínas de manera no covalente a través de dominios SIM (“SUMO Interacting Motifs”). Los dominios SIM se caracterizan por poseer de tres a cuatro aminoácidos hidrofóbicos seguidos o precedidos por aminoácidos cargados (Kerscher, 2007). Muchas proteínas que se sumoilan presentan estos dominios así como también algunas E3 ligasas. Se ha reportado que el dominio SIM en las proteínas PIAS (“Protein Inhibitors of Activated STAT”) (ver más adelante) podría ayudar a su acción como E3 ligasas de SUMO (Palvimo, 2007).

Otro dato importante es que la sumoilación puede llevarse a cabo *in vitro* únicamente con las enzimas E1 activadora y E2 conjugante. Esto se debe a la capacidad de Ubc9 de reconocer directamente a sus sustratos, siempre y cuando éstos posean la secuencia consenso (Rodríguez, *et al.*, 2001; Bernier-Villamor *et al.*, 2002). Sin embargo, en estas condiciones, la reacción es bastante ineficiente y generalmente son necesarias las E3 ligasas. Las ligasas de SUMO funcionan como moléculas adaptadoras, facilitando la interacción del complejo E2-SUMO con la proteína blanco. Las ligasas ayudan a reconocer los distintos sitios de unión presentes en sus blancos, aumentando así la especificidad y eficiencia de la reacción. También se ha propuesto que pueden determinar el sitio donde se lleva a cabo la sumoilación al colocalizar al sustrato con la E2 conjugante (Kagey *et al.*, 2003).

Se han descrito tres tipos de E3 ligasas de SUMO:

- 1) Proteínas que contienen un dominio SP-RING esencial para su función de E3 ligasa, por ejemplo las proteínas PIAS (Hochstrasser, 2001), y hZimp10 (Sharma *et al.*, 2003), algunos de sus blancos son el supresor tumoral p53 y el receptor de andrógenos respectivamente (Schmidt y Muller, 2002; Sharma *et al.*, 2003).
- 2) La proteína RANBP2/Nup358 que es un componente del complejo del poro nuclear. Tiene seis dedos de zinc. Algunos de sus sustratos son: la histona deacetilasa (HDAC4) y la proteína PML (Kirsh *et al.*, 2002; Pichler *et al.*, 2002; Tatam *et al.*, 2004).
- 3) La proteína Polycomb (Pc2) que está involucrada en el silenciamiento de la expresión génica en ratón. No tiene dedos de zinc y uno de sus sustratos es CtBP (“C-terminal Binding Protein”) que es un corepresor transcripcional (Kagey *et al.*, 2003).

Recientemente se reporta a la enzima TOPORS como la primera E3 ligasa de SUMO que posee también actividad de E3 ligasa de ubiquitina y que contiene un dominio RING característico de las E3 de ubiquitina. (Pungalija *et al.*, 2007).

Dentro de la gran cantidad de proteínas blanco de la sumoilación podemos encontrar desde factores de transcripción, histonas, proteínas involucradas en la reparación del daño al ADN, proteínas centroméricas y del cinetocoro, enzimas o proteínas virales, hasta ribonucleoproteínas involucradas en el metabolismo del mRNA (Li *et al.*, 2004) y hasta receptores celulares como TGF $\beta$  (Kang *et al.*, 2008). A nivel molecular, la sumoilación puede enmascarar o agregar dominios de interacción y/o puede inducir cambios conformacionales en las proteínas. Esto puede producir como consecuencia, cambios en la localización intracelular, la función y/o la estabilidad de las proteínas. La sumoilación está involucrada en múltiples procesos vitales de la célula que una desregulación de la vía puede derivar en varias enfermedades como distintos tipos de cáncer, enfermedades neurodegenerativas, diabetes, infecciones virales, problemas de desarrollo entre otras (revisado en Zhao, 2007).

En base a los antecedentes de *tna*, donde 1) su indispensabilidad para la expresión correcta de los genes homeóticos probados, 2) su interacción genética con subunidades de complejos remodeladores de la cromatina y con correguladores transcripcionales y 3) la presencia del dominio SP-RING en TnaA que nos permite proponerla como una E3 ligasa en la vía de sumoilación. Por lo anterior es evidente que esta proteína está involucrada en uno o varios procesos vitales de la célula y consideramos entonces muy importante investigar más acerca de su(s) función(es), su localización sub-celular, sus blancos, etc.

## Hipótesis

Dado que TnaA puede ser una E3 ligasa de SUMO que se requiere para mantener la expresión de los genes HOX *Antp*, *Ubx*, *Scr* y *AbdB*, y que interacciona genéticamente con componentes de complejos remodeladores de cromatina y con subunidades del Mediador, se propone que TnaA podría interactuar físicamente con enzimas necesarias para la sumoilación y/o con alguna(s) proteína(s) involucrada(s) en la transcripción de los genes HOX.

## Objetivo General

Desarrollar herramientas que permitan identificar a la(s) proteína(s) que interactúe(n) físicamente con TnaA.

## Objetivos particulares:

1. Etiquetamiento molecular de TnaA, con el objeto de obtener una proteína recombinante de TnaA que nos permita purificarla de extractos bacterianos y de moscas transgénicas.
  - 1.1. Construcción de la proteína de fusión GST-TnaA para expresión y purificación en *E. coli*.
  - 1.2. Construcción de las fusiones *FLAG-tnaA* y *tnaA-FLAG* para la obtención de líneas de moscas transgénicas.
2. Obtención de líneas estables de moscas transgénicas que expresen TnaA etiquetada con el epítipo FLAG en sus extremos amino y carboxilo terminal.
3. Purificación de GST-TnaA y ensayos de interacción con extractos nucleares de embriones de *Drosophila*.
  - 3.1 Obtención de la fracción nuclear de embriones de 3 a 21 h de *Drosophila*.
  - 3.2 Ensayo tipo “pull down” de GST-TnaA.



## **ESTRATEGIA EXPERIMENTAL**

### **Objetivos 1 y 3: Etiquetamiento molecular de TnaA y purificación de GST-TnaA**

Con la finalidad de poder estudiar a detalle a TnaA, decidimos etiquetarla molecularmente con la proteína glutatión-S-transferasa (GST) y con el epítotope FLAG.

Para la sobre-expresión y purificación de TnaA recombinante de *E. coli*, se construyó una versión de TnaA etiquetada con GST en su extremo amino-terminal, ya que GST es una etiqueta grande y ampliamente utilizada para la obtención de proteínas recombinantes puras.

Para la generación de moscas transgénicas se utilizó el epítotope FLAG (DYKDDDDK) fusionado tanto al extremo amino como al extremo carboxilo de TnaA, de manera independiente. Esta etiqueta es ampliamente utilizada para marcar proteínas en *Drosophila* y el tener construcciones de fusión en cada uno de los extremos de la proteína nos brinda mayor versatilidad para los análisis posteriores.

### **Objetivo 2: Generación de moscas transgénicas y expresión de las proteínas recombinantes**

Las líneas de moscas que expresen a TnaA etiquetada son una herramienta muy valiosa para estudiar a TnaA en un contexto *in vivo*, ya que podemos rastrear a nuestra proteína por medio de su etiqueta. La generación de moscas transgénicas se basa en la naturaleza del elemento P que es una secuencia transponible de DNA que se encuentra naturalmente en *Drosophila* (Gilbert, 2003). Como se detalla más adelante, el procedimiento consiste esencialmente en la inyección de embriones con un plásmido que contiene *FLAG-tnaA* o *tnaA-FLAG* flanqueado por las secuencias invertidas repetidas del elemento P, lo cual permite su inserción en el genoma de *Drosophila*. Para la generación de moscas transgénicas que expresen a *tnaA* etiquetada con *FLAG*, se utilizó el vector pUAST. Este vector nos permite controlar la expresión del transgen de manera muy fina, utilizando el sistema UAS-GAL4 (Brand y Perrimon 1993). Dicho sistema utiliza el activador transcripcional GAL4, proveniente de *Saccharomyces cerevisiae* y ausente en *Drosophila*, y en las secuencias de unión a GAL4, UAS (“Upstream Activating Sequences”). El vector pUAST utilizado en este trabajo presenta la característica de poseer cinco secuencias UAS controlando la expresión del gen de interés de manera que

su expresión será dirigida por GAL4. Esto se logra cruzando a las moscas transgénicas con moscas con diferentes “drivers” que expresan a GAL4 de manera tejido- y/o temporalmente específicas. De dicha progenie solamente las moscas que posean a ambos elementos del sistema (*UAS-tnaA-FLAG* y GAL4) expresarán al gen de interés en los sitios ó etapas en los que se produzca el activador GAL4.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Amplificación por PCR

La reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl para las reacciones de síntesis de un nuevo fragmento de *tnaA* y en 10 µl para las reacciones de análisis de colonias positivas.

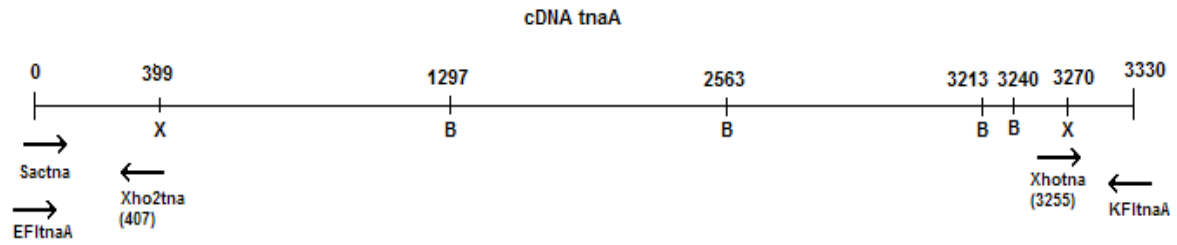
La reacción se llevó a cabo en las siguientes condiciones: oligonucleótidos 300 nM, dNTPs 200 µM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, 5 µl de buffer, 5 ng de DNA plasmídico y 5 U de Taq polimerasa (Roche). Para las reacciones a 10 µl de volumen final, se escalaron los volúmenes a la cantidad correspondiente y se utilizó una T<sub>m</sub> \* de 65°C. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

1 ciclo	2 min a 94°C,
30 ciclos	15 seg a 94°C, 30 seg a 58°C, T <sub>m</sub> * 45 seg a 72°C,
1 ciclo	7 min a 72°C

Los oligonucleótidos utilizados en la realización de este trabajo se indican en la Tabla 1.

Oligonucleótidos	Secuencia (5´- 3´)
Sactna	GGT GAG CTC AAC CAG CAG
Xho2tna	AGG CTC GAG CTG CTC AAT
EFltnaA	CAC GAA TTC ATG GAT TAC AAG GAT GAC GAC GAT AAG AAC CAG CAG GCG
KFltnaA	GGT ACC CTA CTT ATC GTC GTC ATC CTT GTA ATC GTC GAA TAA CGT GGC CAG
Flag5´	GAT TAC AAG GAT GAC GAC GAT
Flag3´	CTT ATC GTC GTC ATC CTT GTA

**Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.**



**Fig. 5 Esquema del cDNA de *tnaA* con la localización de los oligonucleótidos y los principales sitios de restricción utilizados en este trabajo.** Los números en la barra indican los nucleótidos y los números entre paréntesis, la posición de la primera base de cada oligonucleótido. X= *XhoI*, B= *BamHI*.

Los procedimientos usuales de Biología Molecular como las extracciones con fenol-cloroformo, la precipitación de DNA con etanol y las digestiones con enzimas de restricción, entre otros, se llevaron a cabo de acuerdo a Sambrook *et al.*, (1989).

## 2. Clonación

Vectores utilizados

Vector	Tamaño	Características	Resistencia
pBluescriptII KS <sup>+</sup> (pKS)	2.9 Kb	Vector multicopia con <i>lacZ</i> como gen reportero.	Ampicilina
pUAST	9 Kb	Vector de expresión inducida por Gal4 (sistema binario UAS/Gal4) en <i>D. melanogaster</i> , con promotor <i>Hsp70</i> y marcador <i>w<sup>+</sup></i> .	Ampicilina
pGEX4T-1	4.9 Kb	Vector de fusión a GST (Pharmacia)	Ampicilina

**Tabla 2. Vectores utilizados en este trabajo.**

### 2.1 Preparación del vector para clonación.

Los vectores se digirieron con las enzimas de restricción apropiadas, los fragmentos producidos por los cortes se analizaron por electroforesis en geles de agarosa de 0.8 a

1.5% dependiendo del tamaño del fragmento a analizar, para posteriormente purificar las bandas de interés.

Para evitar la religación de los extremos cohesivos de los vectores digeridos, éstos fueron defosforilados con 5 U de la enzima fosfatasa alcalina de calamar (SAP, Roche), por 2 h a 37°C. Posteriormente se inactivó la enzima por 30 min a 65°C.

## **2.2 Purificación de fragmentos de DNA**

Las muestras de DNA se cargaron en geles de agarosa al 0.8% (fragmentos mayores a 800 pb) y al 1.5% (fragmentos menores a 800 pb). Se cortaron las bandas del tamaño esperado y se purificaron con el kit QIAGEN según las especificaciones del proveedor.

## **2.3 Ligaciones**

Se llevaron a cabo ligaciones de los productos de PCR o de los fragmentos digeridos. Al mismo tiempo en cada ensayo, se realizó una reacción control de ligación del vector ligado sobre sí mismo.

Las condiciones para estas ligaciones fueron: 25 ng de vector en una relación molar inserto/vector 3:1 y de 5:1. Se incubó la reacción a 14°C durante 12 h y se utilizó 1 U de la enzima T4 DNA ligasa (Invitrogen) en un volumen final de 20  $\mu$ l. Posteriormente se purificó el DNA con varios lavados con 1-butanol.

## **2.4 Transformación por electroporación en *E. coli***

Se electroporaron bacterias *E. coli* preparadas para el procedimiento (Sambrook *et al.*, 1989) de la cepa DH5 $\alpha$  con 12 ng del vector ligado dando 1 pulso de 1.8 kV durante 5.9 ms y se recuperaron a 37°C durante 1 h en 1 ml de medio SOC (Sambrook *et al.*, 1989). Posteriormente se plaquearon en cajas con medio LB-agar y el antibiótico correspondiente.

## **2.5 Transformación por calor en *E. coli*.**

Se transformaron bacterias *E. coli* de las cepa BL21 y M15 (pREP4) con 100 ng de plásmido. Se mezclaron 0.5 ml de cultivo de *E. coli* BL21 (0.4 OD<sub>550</sub>) con 0.5 ml de TSS 2X (NaCl 1%, triptona 1%, extracto de levadura, 0.5%, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, PEG8000 20%, DMSO 10%, pH: 6.5) A 100  $\mu$ L de dicha mezcla se agregaron 100 ng de plásmido y se incubó 30 min en hielo. Posteriormente se dio choque térmico a las bacterias durante 5

min a 43°C incubando luego en hielo. Las bacterias se plaquearon por goteo en cajas LB-agar y el antibiótico correspondiente.

## **2.6 Análisis de plásmidos recombinantes**

Los plásmidos de las colonias recombinantes se extrajeron por el método de lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 1989) y se analizaron por patrón de restricción con las enzimas apropiadas para verificar la clonación del fragmento en turno.

Los plásmidos candidatos también se analizaron por PCR utilizando los oligonucleótidos específicos para cada fragmento clonado.

Para verificar que la clona obtenida estuviera en el marco de lectura correcto y/o que la enzima Taq polimerasa no hubiera introducido mutaciones se secuenciaron varias de las clonas obtenidas, en la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM.

Las secuencias de DNA fueron analizadas con los programas de análisis 4 Peaks, Enzyme X (Griekspoor y Groothuis versión 3.1) y DNA Strider (Mark, 1988).

## **3. Expresión, solubilización y purificación de GST-TnaA**

Se partió de una dilución 1:50 de un cultivo saturado de GST-TnaA, se incubó a 37°C y ~250 rpm hasta alcanzar una D.O<sub>600</sub> de entre 0.5-0.7. Se adicionó IPTG (IsoPropil-β-D-TioGalactósido) a una concentración final de 0.1 mM y se incubó durante 6 h a 18°C y ~250 rpm. Se recuperó la pastilla celular y se congeló a -20°C.

La solubilización de la proteína recombinante GST-TnaA se realizó de acuerdo al protocolo de solubilización de Frangioni *et al.*, (1993) con algunas modificaciones. Se resuspendió una pastilla celular de 250 ml de cultivo en 15 ml de STE frío (10 mM Tris-HCl pH: 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA), lisozima a 100 µg/ml e inhibidor de proteasas Complete (Roche). Se incubó de 15-30 min a 4°C, luego se adicionó 5 mM de DTT-STE y sarcosil-STE 1.5%, mezclándolo bien y se incubó 10 min a 4°C con agitación suave. Posteriormente la muestra se sonicó con cuatro pulsos de 30 seg, con intervalos de 45 seg a una amplitud de 35%, se agregó tritón-STE al 2% final y se volvió a incubar a 4°C con agitación suave durante aproximadamente 30 min. Luego se centrifugó la muestra a 10,000 rpm durante 15 min a 4°C y se recuperó la fracción soluble. En las ocasiones en que la fracción soluble era imposible de separar de la fracción “mucosa”, se incubó la muestra a 4°C durante 3-4 días.

Con la finalidad de enriquecer la fracción soluble con la forma completa de la proteína recombinante y eliminar los productos truncados o de degradación de la misma, la

fracción soluble se filtró en una columna de centración (Millipore) de 100 kDa siguiendo las instrucciones del fabricante.

Dicha fracción soluble filtrada se llevó a 1M de NaCl para disminuir las interacciones inespecíficas y se incubó con 250  $\mu$ l de perlas glutatión-sefarosa 4B (GE Healthcare) previamente equilibradas con PBS según indicaciones del proveedor, durante 1.5 h a 4°C con agitación suave. Posteriormente las perlas se lavaron 3-4 veces con 10 volúmenes de PBS, 1M de NaCl e inhibidor de proteasas (Complete Roche).

La elusión de GST-TnaA se realizó con glicina ácida pH 2. Las perlas (250  $\mu$ l) se incubaron con 300  $\mu$ l de glicina pH 2, durante 10 min, con agitación suave y a 4°C. Posteriormente se centrifugó la muestra y el sobrenadante se recuperó y neutralizó de inmediato con 9  $\mu$ l de Tris Base 1M pH 8.5.

#### **4. Obtención de extracto nuclear de embriones de 3 a 21 h de *Drosophila***

Para la purificación de la fracción nuclear soluble, se cultivaron moscas *D. melanogaster* silvestres OreR en dos jaulas grandes y se colectaron embriones cada 18 h en charolas con medio agar-piloncillo y jugo de uva (300 ml agar-piloncillo, 75 ml de jugo de uva, 5 ml de Nipagin). Las charolas colectadas se dejaron 3 h a temperatura ambiente para cumplir las 21 h de desarrollo y luego se guardaron a 4°C por un máximo de 3 días.

Se colectaron aproximadamente 40 g de embriones de 3 a 21 h y se procesaron de acuerdo a Kamakaka y Kadonaga (1994), para obtener las fracciones nuclear y citoplásmica.

#### **5. Obtención de extractos de proteínas totales de *Drosophila***

Se agregaron 100  $\mu$ l de buffer de fraccionamiento celular (250 mM sacarosa, 50 mM Tris pH 7.5, 25 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM EDTA, inhibidor de proteasas Complete (Roche), para cada 10 individuos adultos y se homogenizó en hielo. La mezcla se llevó a una concentración de 1% final de SDS y se incubó 10 min en hielo. Se agregaron 25  $\mu$ l de buffer Laemmli (4X) con  $\beta$ -mercaptoetanol (Sambrook *et al.*, 1989) y la muestra se hirvió durante 10 min. Posteriormente se centrifugó durante 3 min a 10,000 rpm, se recuperó el sobrenadante (fracción soluble del extracto) y la pastilla se resuspendió en el mismo volumen de buffer de fraccionamiento celular (fracción insoluble del extracto).

#### **6. Transferencia de proteínas y Western blot**

Las muestras corridas electroforéticamente en geles SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio Rad 3 mm) en una cámara de transferencia (Amersham)

durante 12 h a 80 mA y luego 1 h a 200 mA. La membrana se bloqueó con solución de bloqueo (PBS, Tween 20 0.1%, leche Carnation 10%) durante toda la noche a 4°C, para las muestras de extractos totales y de embrión y durante 2 h para las muestras para "pull down". Los lavados se realizaron con PBS-T [PBS, (Sambrook *et al.*, 1989) y Tween 20 0.05%]. Las diluciones de los anticuerpos utilizados debieron determinarse para cada experimento realizado (ver resultados). El anticuerpo secundario utilizado se encuentra conjugado a HRP (HorseRadish Peroxidase). La detección se realizó con "ECL Plus Kit" según indicaciones del proveedor (GE Healthcare).

### **7. Ensayo de interacción "Pull Down"**

El extracto nuclear (~90 µg) diluido en 225 µl de buffer de lisis B (Tris-HCl 20 mM pH: 7.5, NaCl 100 mM, NP-40 1%, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, DTT 1 mM, PMSF 0.2 mM, inhibidor de proteasas Complete (Roche)), se pre-adsorbió con GST y 100 µl de resina de glutatión sefarosa durante 45 min a 4°C con agitación suave. Se recuperó el extracto nuclear pre-adsorbido y se incubaron 250 µl del mismo con aproximadamente 20 µg de GST-TnaA purificada previamente en 90 µl de resina de glutatión sefarosa. Las condiciones de incubación fueron de 2 h a 4°C con agitación suave. Posteriormente la resina se lavó cuatro veces con el mismo buffer de lisis B utilizado para la interacción.

Como control negativo se realizó el mismo procedimiento de pre-adsorción del extracto nuclear y posterior incubación con aproximadamente 20 µg de GST sola acoplada a una misma cantidad de resina.

Las proteínas se eluyeron en buffer Laemmli 4X, hervidas durante 10 min y corridas electroforéticamente en un gel SDS-PAGE al 7.5%, para su posterior transferencia a una membrana de nitrocelulosa y detección por la técnica de Western (ver más adelante).

### **8. Obtención y mapeo de inserciones en líneas de moscas transgénicas**

La generación de moscas transgénicas se basa en la utilización del elemento P que es una secuencia transponible de DNA que se encuentra naturalmente en *Drosophila* y que se ha modificado artificialmente para poder albergar secuencias de interés (Gilbert, 2003).

Como se detalla más adelante, la obtención de moscas transgénicas consiste en la inyección de embriones con un plásmido que contiene al transgen de interés flanqueado

por las secuencias invertidas repetidas del elemento P, lo cual permite su inserción en el genoma de *Drosophila*.

### 8.1 Inyección de embriones

La inyección de los plásmidos pUAST con las respectivas construcciones de *tnaA* fusionada a FLAG la llevó a cabo la compañía Genetic Services, Inc. (<http://www.geneticservices.com>). Consistió en microinyectar embriones de la línea  $w^{1118}/w^{1118}$  antes de la formación de las células polares con los plásmidos pUAST::*FLAG-tnaA* y pUAST::*tnaA-FLAG*.

El plásmido pUAST contiene el promotor fuerte del gen *Hsp70* de *Drosophila* bajo la regulación de cinco secuencias de levadura *UAS* (Upstream Activator Sequences) inducibles por GAL4 también de levadura. *UAS* y GAL4 no se encuentran en el genoma de *Drosophila*. Bajo el promotor *Hsp70* se clona el gen de interés (en este trabajo las fusiones *FLAG-tnaA* ó *tnaA-FLAG*). En la secuencia de inserción también se encuentra el gen  $w^+$  de *Drosophila* que permite la síntesis del pigmento que confiere el color rojo a los ojos de las moscas. Por ser ésta una característica fácilmente observable se utiliza como marcador de transformación de individuos  $w^{1118}/w^{1118}$ , que al no poder sintetizar el pigmento, presentan ojos blancos. La secuencia de inserción con todos estos elementos está flanqueada por las secuencias invertidas repetidas del elemento P, y entonces es capaz de transponer en presencia de la enzima transposasa cotransformada durante la inyección en otro plásmido, lo cual permite su inserción al azar en el genoma de *Drosophila*. (Spradling, 1987).

Posteriormente se recuperan las larvas con inserciones (primero se recuperan todas las larvas inyectadas, transformadas ( $w^+$ ) y no transformadas ( $w^-$ ) y después en la siguiente generación se seleccionan los adultos con ojos rojos ( $w^+$ , que evidencia la presencia del transgen) y se establecen líneas transgénicas independientes, siguiendo la expresión de  $w^+$ .

### 8.2 Mapeo de la inserción

Para poder identificar el cromosoma en donde ocurrió la inserción, se seleccionaron machos de cada línea transgénica que expresaran el gen marcador  $w^+$  (ojos rojos) asociado al transgen, y se cruzaron de manera independiente con hembras vírgenes de una línea que tiene marcados los cromosomas 2 y 3 con distintos marcadores dominantes



(*CyO* para el cromosoma 2 (alas “curly”) y *Sb<sup>l</sup>* para el cromosoma 3 (quetas rasuradas y gruesas) (ver Cruza 1).

Se evaluó la progenie de todas las cruzas y se seleccionaron las moscas  $w^+$ , *CyO*, *Sb<sup>l</sup>* para cruzarlas con moscas de la línea  $w^{118}/w^{118}$ ; +/+; +/+ (ver Cruza 2) Se cuantificó el número de individuos obtenidos para cada clase y se asoció la presencia del transgen ( $w^+$ ) a los marcadores de cada uno de los cromosomas. De esta manera se pudo discernir en qué cromosoma ocurrió la inserción del transgen.

A continuación se presenta el esquema genético que se siguió, ejemplificado con el genotipo de líneas *UAS-Flag-tnaA*. El mismo esquema se siguió para mapear y balancear las líneas *UAS-tnaA-FLAG*.

**Cruza 1 Marcado de cromosomas 2 y 3 de las líneas transgénicas con los marcadores dominantes *CyO* y *Sb*.**

F0 ♂ *UAS-Flag-tnaA, w<sup>+</sup>/+* x ♀♀ vírgenes *CyO/Sp; MKRS, Sb/TM2, Ubx*  
 Ojos de color Ojos blancos



F1

En esta generación se puede distinguir líneas transgénicas con inserción en el cromosoma X, ya que todas las hembras tendrían los ojos rojos y todos los machos los tendrían blancos, obteniendo en este paso las líneas que tienen la inserción en el cromosoma X.

**Genotipos de individuos F1 de la Cruza 1, con inserción del transgen (ejemplificado como *T, w<sup>+</sup>*) en el cromosoma X:**

Ojos rojos, todas ♀

<i>T, w<sup>+</sup>/w<sup>-</sup>; CyO/+;</i> <i>TM2/+</i>	<i>T, w<sup>+</sup>/w<sup>-</sup>; CyO/+;</i> <i>MKRS/+</i>	<i>T, w<sup>+</sup>/w<sup>-</sup>;</i> <i>Sp/+ ; TM2/+</i>	<i>T, w<sup>+</sup>/w<sup>-</sup>; Sp/+;</i> <i>MKRS/+</i>
<i>w<sup>-</sup>/Y; CyO/+;</i> <i>TM2/+</i>	<i>w<sup>-</sup>/Y; CyO/+;</i> <i>MKRS/+</i>	<i>w<sup>-</sup>/Y ; Sp/+;</i> <i>TM2/+</i>	<i>w<sup>-</sup>/Y ; Sp/+;</i> <i>MKRS/+</i>

Ojos blancos, todos ♂

**Genotipos de individuos con inserción del transgen en el cromosoma 2, en este caso el genotipo del cromosoma X no se muestra:**

Ojos rojos

<i>CyO/ T, w<sup>+</sup>; TM2/+</i>	<i>CyO/ T, w<sup>+</sup>; MKRS/+</i>	<i>Sp/T, w<sup>+</sup>; TM2/+</i>	<i>Sp/T, w<sup>+</sup>; MKRS/+</i>
<i>CyO/+; TM2/+</i>	<i>CyO/+; MKRS/+</i>	<i>Sp/+; TM2/+</i>	<i>Sp/+; MKRS/+</i>

Ojos blancos

**Genotipos de individuos con inserción del transgen en cromosoma 3, en este caso el genotipo del cromosoma X no se muestra:**

Ojos rojos

<i>CyO/+; TM2/T, w<sup>+</sup></i>	<i>CyO/+; MKRS/T, w<sup>+</sup></i>	<i>Sp/+; TM2/T, w<sup>+</sup></i>	<i>Sp/+; MKRS/+</i>
<i>CyO/+; TM2/+</i>	<i>CyO/+; MKRS/+</i>	<i>Sp/+; TM2/+</i>	<i>Sp/+; MKRS/+</i>

Ojos blancos

### Cruza 2

Para el caso del mapeo de las inserciones del transgen en el cromosoma 2 ó 3 se siguieron los ligamientos del transgen (rastreado por la presencia de ojos de color, genotipo  $w^+$ ) con los marcadores *CyO* y *Sb* que indican la presencia de los cromosomas de prueba *CyO* y *MKRS* respectivamente y que son muy fáciles de observar (genotipos marcados con recuadro negro en la tabla de progenie F1 con inserción en cromosoma 2 y cromosoma 3 respectivamente)

♂  $w^{1118}/Y; P\{UAS-Flag-tnaA, w^+\}/CyO, +/MKRS, Sb$  x ♀♀ vírgenes  $w^{1118}/w^{1118}$

ó

♂  $w^{1118}/Y; +/CyO; P\{UAS-Flag-tnaA, w^+\}/MKRS, Sb$  x ♀♀ vírgenes  $w^{1118}/w^{1118}$



**F2**

Para el caso de las líneas que mapearon en cromosoma 2 los genotipos obtenidos serían (en las tablas siguientes  $T, w^+$  representa al transgen)

<b>Ojos rojos</b>	<b>Ojos blancos</b>
-------------------	---------------------

$T, w^{+}/+; MKRS/+$	$T, w^{+}/+; +/+$	$CyO/+; MKRS/+$	$CyO/+; +/+$
----------------------	-------------------	-----------------	--------------

Fenotipo → todas los individuos con ojos rojos son silvestres o *Sb*. Ningún individuo con alas “curly” tiene ojos rojos.

Para el caso de las líneas que mapearon en cromosoma 3 los genotipos obtenidos serían:

Ojos rojos		Ojos blancos	
$+/+; T, w^{+}/+$	$+/CyO; T, w^{+}/+$	$+/+; +/MKRS$	$+/CyO; +/MKRS$

Fenotipo → todos los individuos con ojos rojos tienen alas “curly” ó son silvestres.

### 9. Estabilización de las líneas transgénicas

La estabilización de las líneas transgénicas consiste en obtener moscas que contengan un cromosoma “balanceador” marcado en el cromosoma homólogo al que contiene al transgen. El cromosoma “balanceador” se caracteriza por poseer fragmentos invertidos en su secuencia en particular en la región de interés el transgen y así imposibilitar la pérdida de estas regiones por recombinación homóloga entre el cromosoma silvestre y el mutado. Estos cromosomas también poseen mutaciones letales recesivas que impiden que sobrevivan individuos homocigos para el cromosoma balanceador, de tal forma que en el "stock" sólo sobreviven individuos heterocigos para el cromosoma con la mutación de interés y el cromosoma balanceador, e individuos homocigotos para el cromosoma mutante, si la mutación de interés no causa letalidad en homocigosis.

Para la estabilización de las líneas transgénicas, se seleccionaron individuos con genotipo  $w^{+}, Sb$  de la progenie de la cruce 2 (recuadro grueso en la tabla correspondiente) y se cruzaron con individuos de la línea  $w^{1118}/w^{1118}; +/CyO; +/+$  (Cruza 3). De esta manera se obtienen individuos donde el transgen queda heterocigo al balanceador del cromosoma 2, *CyO*, por lo que, de la progenie de esta cruce, se seleccionaron individuos que fueran  $w^{+}$  (marcador asociado al transgen) y con alas “curly” (*CyO*) (recuadro grueso en la tabla siguiente) y así queda “balanceada” la línea transgénica en cromosoma 2. A continuación se presenta un esquema de la cruce realizada.

**Cruza 3** En la siguiente cruce se estabilizan las líneas transgénicas con inserción en cromosoma 2:

♂  $w^{1118}/Y; P\{UAS-Flag-tnaA, w^+\}/+$ ;  $MKRS/+$  x ♀♀ vírgenes  $w^{1118}/w^{1118}; +/CyO$   
 Ojos rojos, quetas Sb Ojos blancos y alas “curly”



$T, w^+/CyO; MKRS/+$	$T, w^+/CyO; +/+$	$CyO/+; +/+$
$T, w^+/+; MKRS/+$	$T, w^+/+; +/+$	$+/+; +/+$

Para el caso de líneas transgénicas con inserción en cromosoma 3 se seleccionaron individuos con fenotipo  $w^+$ ,  $Cy$  de la progenie de la craza 2 (recuadro grueso en la tabla correspondiente) y se cruzaron con individuos de la línea  $w^{1118}/w^{1118}; +/+; TM3B/TM6B$  (Cruza 4). En esta craza el cromosoma con el transgen queda heterócigo al cromosoma balanceador  $TM3$ , cuyos marcadores son *Sb*, *Serrated* (*Ser*, alas con bordes aserrados) y *ebony* (*e*, cutícula oscura) o con  $TM6B$  cuyos marcadores en esta versión son *Tubby* (*Tb*) (abdomen corto) y *e* (recuadros gruesos en la tabla siguiente). A continuación se describe la craza realizada.

**Cruza 4** En la siguiente craza se estabilizan las líneas transgénicas con inserción en cromosoma 3:

♂  $+/CyO, P\{UAS-Flag-tnaA, w^+\}/+$  x ♀♀ vírgenes  $w^{1118}/w^{1118}; TM3B/TM6B$   
 Ojos rojos, alas “curly” Ojos blancos, quetas gruesas y color ebony



$+/+; T, w^+/TM3B$	$CyO/+; T, w^+/TM3B$	$+/+; TM3B/+$	$CyO/+; TM3B/+$
$+/+; T, w^+/TM6B$	$CyO/+; T, w^+/TM6B$	$+/+; TM6B/+$	$CyO/+; TM6B/+$

### 10. Análisis de la expresión de las proteínas recombinantes FLAG-TnaA y TnaA-FLAG en la mosca.

Los transposones tienen la capacidad de rearrreglarse después de la integración en el genoma, lo cual puede modificar o eliminar su expresión (Ashburner, 2004); además la

expresión de la proteína recombinante puede variar de línea a línea, dependiendo del sitio de inserción del transgen en el genoma (en heterocromatina ó eucromatina). Debido a ésto siempre se debe corroborar la expresión de la proteína recombinante.

Con la intención de obtener moscas que expresen de manera ubicua a la proteína recombinante, se seleccionaron de manera arbitraria dos líneas con inserción del transgen en cromosoma 2 de cada construcción ( $w^-$ ;  $P \{w^+, UAS-FLAG-tnaA \text{ ó } tnaA-FLAG\}$ ), de ahora en adelante denominadas *FLAG-tnaA* y *tnaA-FLAG*) y se cruzaron con moscas que contienen el “driver” de expresión ubicua de GAL4:  $y^1 w^*$ ;  $P\{Act5C-GAL4\}25FO1/CyO$ ,  $y^+$ . A este “driver” lo llamaremos *Act-Gal4* de ahora en adelante.

F0                      ♀♀ vírgenes *Act-Gal4 / Act-Gal4* x ♂ *FLAG-tnaA / FLAG-tnaA*

F1                                      100% *FLAG-tnaA / Act-Gal4*

La presencia de las versiones FLAG-TnaA ó TnaA-FLAG se determinó a través de ensayos tipo Western de extractos totales de proteína de la progenie F1 con el anticuerpo que reconoce al epítoto FLAG (M2 Sigma, dilución 1:1000).

### **Líneas de *Drosophila melanogaster* empleadas**

$w^{1118}/w^{1118}$ ; +/+; +/+ : línea  $w^-$ , individuos con ojos blancos, marcador asociado al cromosoma X.

$w^{1118}/w^{1118}$ ; *CyO/Sp*; *MKRS/TM2*: línea “Triple Balancer” (TB) se utilizó para marcar todos los cromosomas y permitir el mapeo de la inserción en las distintas líneas transgénicas.

*yw*; *Trfp/CyO*; +/+ : se utilizó para balancear las líneas de moscas transgénicas con inserción en cromosoma 2.

$w^{1118}/w^{1118}$ ; +/+; *TM3B/TM6B*: se utilizó para balancear las líneas de moscas transgénicas con inserción en cromosoma 3.

En la siguiente tabla se muestran los distintos balanceadores y marcadores utilizados en este trabajo.

<b>Cromosoma</b>	<b>Balaceador</b>	<b>Marcador</b>	<b>Fenotipo</b>
1 ó X		<i>white (w-)</i>	Ojos blancos

1 ó X		<i>yw</i>	Cutícula amarilla
2	<i>CyO</i>	<i>Curly (CyO)</i>	Alas curvas
3	<i>TM2</i>	<i>Ultrabithorax (Ubx)</i>	Quetas en los halterios
3	<i>MKRS</i>	<i>Stubble (Sb)</i>	Quetas rasuradas y gruesas
3	<i>TM6B</i>	<i>Tubby (Tb)</i>	Larvas, pupas y adultos pequeños
3		<i>ebony</i>	Cutícula mas oscura
3	<i>TM3</i>	<i>Serrated (Ser)</i>	Alas serruchadas en su extremo

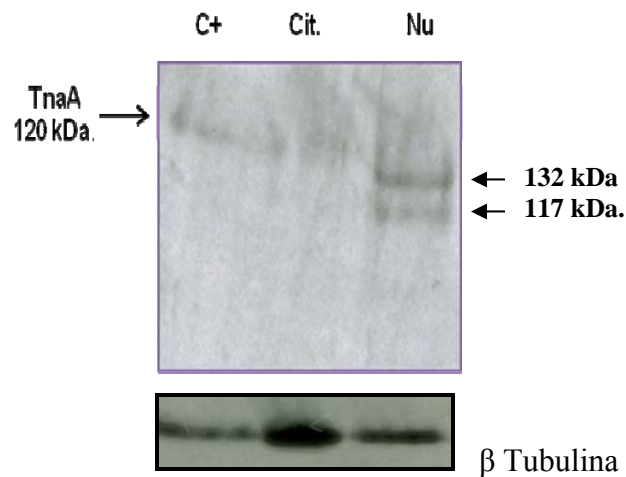
Los “stocks” y las cruza se mantuvieron a 25°C en un medio conocido como piloncillo.

## RESULTADOS

### 1. Detección de proteína TnaA endógena en extractos nuclear y citoplásmico de embriones de moscas silvestres OreR

La caracterización de *tna* (Gutiérrez *et al.*, 2003) predice que esta proteína contiene una señal de localización nuclear (NLS por sus siglas en inglés). Para probar si TnaA se encuentra en la fracción nuclear, se realizó un ensayo tipo Western con el anticuerpo que reconoce a la región amino terminal de TnaA (L. Gutiérrez, A. Juárez y M. Vázquez, datos no publicados), en las fracciones nuclear y citoplásmica de embriones silvestres de 3- 21 h.

Como se puede apreciar en la Fig. 6, en la fracción nuclear pueden distinguirse dos isoformas de TnaA.



**Fig. 6 Detección de TnaA en la fracción nuclear y citoplásmica de embriones de Drosophila de 3-21 h.** Western blot de extractos de proteínas solubles de embriones de 3-21 h C+: extracto de proteínas solubles de machos OreR como control positivo. Cit.: fracción citoplásmica de embriones 3 a 21 h. Nu.: fracción nuclear de embriones de 3 a 21 h. Nótese dos isoformas de TnaA exclusivamente en la fracción nuclear. El anticuerpo primario se levantó contra la región amino de TnaA y se utilizó en una dilución 1:1000. En el panel inferior se muestra el control de carga con anti  $\beta$  Tubulina.

Este experimento confirma que TnaA se encuentra en los núcleos de embriones silvestres de 3-21 h de desarrollo. No es clara su presencia en la fracción citoplásmica.

## **2. Etiquetamiento molecular de TnaA.**

Los antecedentes de este trabajo nos permiten tener algunos candidatos para la interacción física con TnaA y todos ellos son proteínas nucleares. La detección de TnaA en la fracción nuclear de embriones de Drosophila en condiciones silvestres nos hizo percatarnos que para la búsqueda e identificación de las proteínas que interaccionan físicamente con TnaA sería muy útil tener versiones de TnaA etiquetadas molecularmente.

La primera etiqueta elegida fue el epítipo FLAG pues es ampliamente utilizada para la detección de proteínas en Drosophila en situaciones *in vivo*. El tener etiquetas en cada uno de los extremos de la proteína de interés, nos brinda mayor versatilidad para los análisis posteriores por lo que se planteó construir versiones de TnaA fusionadas al epítipo FLAG en el extremo amino ó en el extremo carboxilo.

Para los objetivos de bioquímica *in vitro*, inicialmente se etiquetó a TnaA con una cola de histidinas, sin embargo, como no logamos una buena inducción de la proteína recombinante en *E. coli* (datos no mostrados), decidimos utilizar la etiqueta GST.

En las siguientes secciones se mostrarán los resultados de las construcciones planeadas y los experimentos que se hicieron con ellas en este trabajo.

### **2.1 Construcción de la fusión FLAG-tnaA.**

Debido a que el cDNA de *tnaA* tiene un tamaño de 3.3 kb, se debió idear una estrategia de varios pasos para la construcción de las proteínas etiquetadas con FLAG. Para esto, se sintetizaron fragmentos modificados del cDNA de *tnaA* por la técnica de PCR y se fueron ligando sucesivamente en un vector huésped.

### A) Síntesis del nuevo extremo amino-terminal *FLAG-tnaA*.

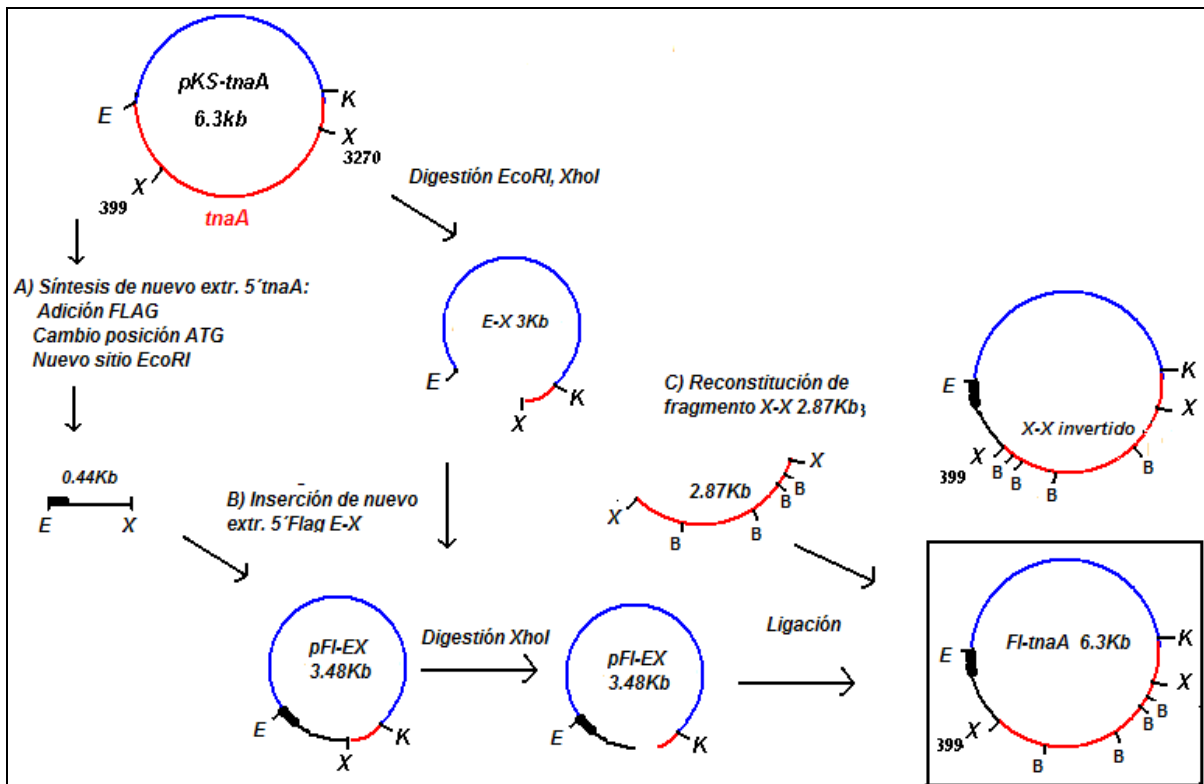
Para construir la fusión *FLAG-tnaA* se partió del plásmido pKS-*tnaA*\* (Tesis de Licenciatura, R. Pérez, 2005), el cual contiene el cDNA de *tnaA* con su codón de inicio pero sin su codón de término, flanqueado por los sitios *SacI* y *KpnI* en sus extremos amino y carboxilo respectivamente. Se diseñó una estrategia de varios pasos para sintetizar por PCR un nuevo extremo amino terminal del cDNA de *tnaA* con las siguientes características (Fig. 7):

1. Secuencia codificante FLAG fusionada 5' a *tnaA*.
2. Cambio de lugar del codón de inicio.
3. Nuevo sitio de restricción *EcoRI* que permita unir este fragmento a la clona original.

Para este propósito se diseñó un oligonucleótido (Tabla 1) como "primer" 5' (EFltnaA) que contiene la secuencia 5' CAC GAA TTC ATG GAT TAC AAG GAT GAC GAC GAT AAG AAC CAG CAG GCG 3'. Del nucleótido 1 al 9 se tiene la secuencia de restricción para *EcoRI* y 3 bases espaciadoras. Inmediatamente adyacente, se agregó el codón de inicio ATG seguido de los 24 nucleótidos que codifican para el FLAG (DYKDDDDK), y del nucleótido 36 en adelante contiene la secuencia inicial del cDNA *tnaA* sin su codón de inicio. Como "primer" 3' se utilizó el oligonucleótido Xho2tna.

La amplificación con los primers EFltnaA y Xho2tna genera un fragmento de 0.4 kb, que fue purificado y digerido con las enzimas *EcoRI* y *XhoI* para su posterior ligación al vector.





**Fig. 7 Estrategia para construir el transgen *FLAG-tnaA*.** Se indica el plásmido de donde se obtiene el cDNA de *tnaA* (*pKS-tnaA*), los plásmidos intermedios y el plásmido final (*FL-tnaA*) el cual contiene a *tnaA* con el epítoto FLAG en su extremo amino. Se indican también los sitios de restricción utilizados. E: *EcoRI*, X: *XhoI*, K: *KpnI*, B: *BamHI*.

### B) Inserción del nuevo extremo 5' para obtener la fusión *FLAG-tnaA*.

El plásmido *pKS-tnaA*\* se digirió con *EcoRI* y *XhoI*, lo cual produjo un fragmento de 3 kb y además liberó el extremo amino terminal de 0.4 kb de *tnaA*, y el fragmento *XhoI-XhoI* 2.87 kb, el cual posteriormente se reconstituyó (Fig. 7).

Una vez verificadas las digestiones anteriores, el plásmido se digirió también con la enzima *HindIII* para cortar en trozos más pequeños los fragmentos que no eran necesarios y así obtener una diferencia suficiente en tamaño para poder purificar la banda correspondiente al fragmento de 3 kb necesario para insertar el nuevo fragmento amino terminal de *tnaA* (0.44 kb).

Una vez ligado, se transformaron bacterias de la cepa *DH5 $\alpha$*  y se llevaron a cabo análisis de restricción de los plásmidos de 10 colonias resistentes a ampicilina.

Los plásmidos obtenidos se analizaron con una doble digestión *EcoRI/XhoI*. Los plásmidos que liberaron un fragmento de aproximadamente 0.44 kb fueron posteriormente analizados por PCR para confirmar que tenían la secuencia FLAG.

Para dicho análisis, se diseñó un oligonucleótido 5' (Flag5') con la secuencia 5'GAT TAC AAG GAT GAC GAC GAT3' que corresponde a la secuencia codificante para FLAG.

La amplificación con los "primers" Flag5'y Xho2tna genera un fragmento de 0.44 kb únicamente si el DNA templado contiene la secuencia codificante para FLAG, ubicada en el extremo 3' de *tnaA*. Se obtuvieron dos plásmidos con el patrón de restricción correcto. Se obtuvo la secuencia nucleotídica de uno de ellos para confirmar la fusión correcta del FLAG a *tnaA* y la ausencia de mutaciones. A este plásmido se le llamó pFl-EX (Fig 6.).

### **C) Reconstitución del fragmento original *XhoI-XhoI* (2.87 kb) de *tnaA* en el plásmido pFL-EX.**

El fragmento *XhoI-XhoI* de 2.87 kb se purificó de la digestión de pKS-*tnaA*\* con las enzimas *XhoI* y *ScaI* (Fig. 7). El vector pFL-EX se digirió con *XhoI* y se defosforiló para evitar la religación de sus extremos. A este vector se ligó el fragmento *XhoI-XhoI* de 2.87 kb purificado anteriormente.

La identidad del plásmido correcto se verificó en las colonias resistentes a ampicilina con una doble digestión: *EcoRI* y *BamHI*. Como el fragmento *XhoI-XhoI* (2.87 kb) se podía ligar en ambas orientaciones, se utilizaron estas enzimas por tener sitios de reconocimiento asimétricos dentro del fragmento de interés. Así pudimos elegir el plásmido con la orientación adecuada. A este plásmido le llamamos pFl-*tnaA*.

### **D) Subclonación de *FLAG-tnaA* en el vector pUAST para expresión en moscas.**

El siguiente paso fue clonar la fusión *FLAG-tnaA* en el vector pUAST para la obtención de moscas transgénicas. Primero se digirió el plásmido pFl-TnaA con las enzimas de restricción *KpnI* y *EcoRI* para liberar al inserto *FLAG-tnaA* y purificarlo por QIAGEN (GEL EXTRACTION KIT). El vector pUAST se digirió con las mismas enzimas lo que permitió fusionar al inserto en el marco de lectura apropiado para la traducción de *FLAG-tnaA*.

Se extrajo el plásmido de algunas colonias seleccionadas por la resistencia a ampicilina conferida por el plásmido pUAST. Estos plásmidos se digirieron con *XhoI* y también con *EcoRI* y *BamHI*, para confirmar la inserción de *FLAG-tnaA* en el vector pUAST. A ésta construcción le llamamos pUAST-FlTnaA.

## 2.2 Construcción de la fusión *tnaA-FLAG*.

### A) Generación del nuevo extremo carboxilo terminal *tnaA-FLAG*.

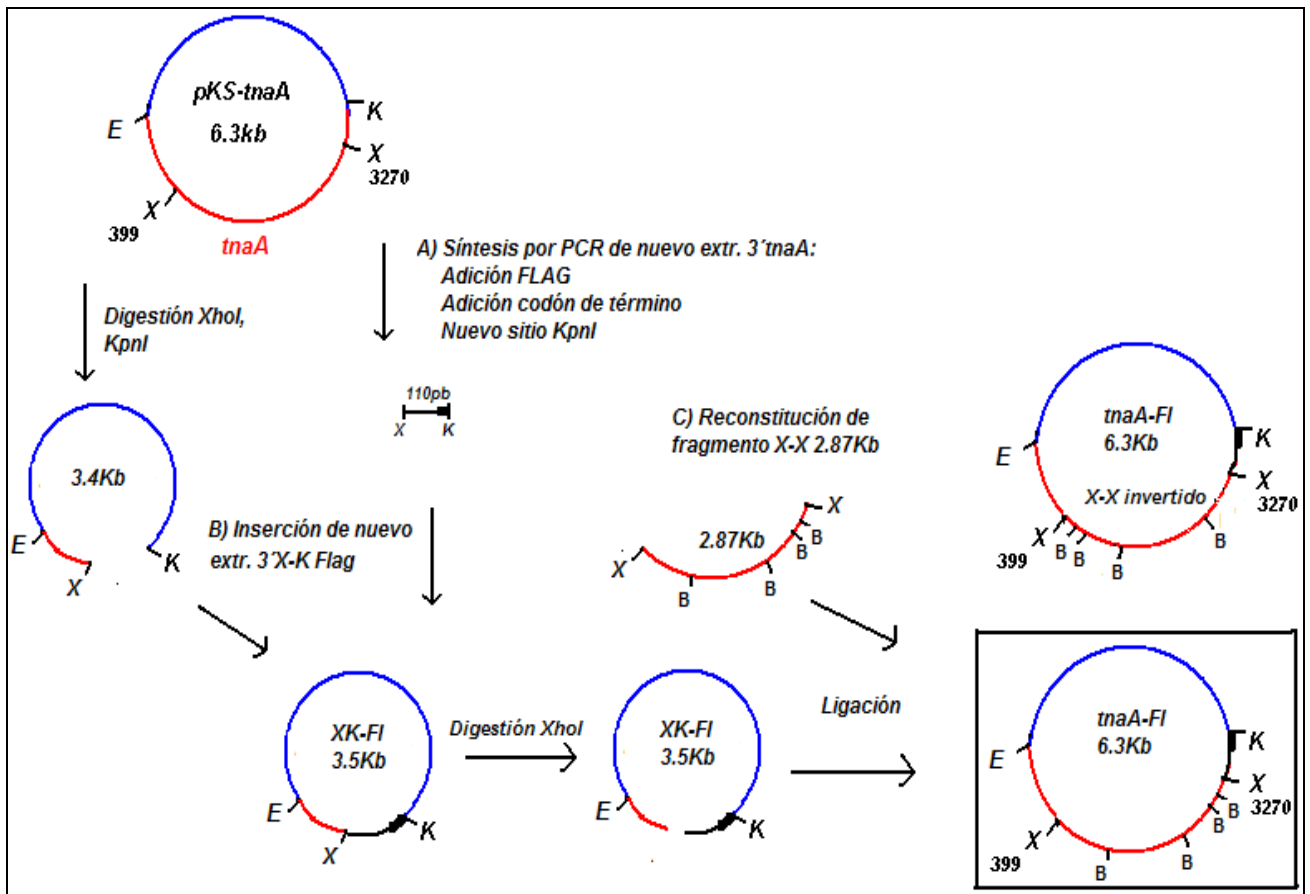
Para construir la fusión *tnaA-FLAG* también se partió del plásmido pKS-*tnaA*\* y se diseñó una estrategia similar a las anteriores (Fig. 8) para amplificar por PCR un nuevo extremo carboxilo terminal del cDNA *tnaA* con las siguientes características:

1. Secuencia codificante para FLAG fusionada al 3' de *tnaA*.
2. Inserción de codón de término.
3. Nuevo sitio de restricción *KpnI* que permita unir este fragmento a la clona original.

Para este propósito se diseñó un oligonucleótido (Tabla 1) como "primer" 3' (KFltnaA) que contiene la secuencia 5'GGT ACC CTA CTT ATC GTC GTC ATC CTT GTA ATC GTC GAA TAA CGT GGC CAG3'. Los nucleótidos 1 al 6 constituyen el sitio de restricción de *KpnI*. Inmediatamente adyacente a éste, se agregó el codón de término (TAG) seguido de los 24 nucleótidos que codifican para el FLAG (DDKKK), y del nucleótido 33 en adelante contiene la secuencia carboxilo terminal del cDNA de *tnaA*.

Como *primer* 5' se utilizó el oligonucleótido Xhotna, ya existente, que contiene la secuencia del cDNA de *tnaA* que corresponde al sitio *XhoI* en el nucleótido 3270.

La amplificación con los "primers" KFltna y Xhotna genera un fragmento de 110 pb, que fue purificado y digerido con las enzimas *KpnI* y *XhoI* para su posterior ligación al vector.



**Fig. 8. Estrategia para construir el transgen *tnaA-FLAG*.** Se indica el plásmido de donde se obtiene el cDNA de *tnaA* (*pKS-tnaA*), los plásmidos intermedios y el plásmido final (*ptnaA-Fl*) el cual contiene a *tnaA* con el epítipo FLAG en su extremo carboxilo. Se indican también los sitios de restricción utilizados. E: *EcoRI*, X: *XhoI*, K: *KpnI*, B: *BamHI*.

### B) Substitución del extremo 3' para obtener el transgen *tnaA-Flag*.

El plásmido *pKS-tnaA\** se digirió con *KpnI* y *XhoI*, lo cual produjo un fragmento de 3.4 kb y además liberó tanto el extremo carboxilo terminal de *tnaA*, como el fragmento *XhoI-XhoI* 2.87 kb.

Una vez verificadas las digestiones anteriores, el plásmido se digirió con la enzima *HindIII* para cortar en trozos más pequeños los fragmentos que no eran necesarios y así obtener una diferencia suficiente en tamaño para poder purificar la banda correspondiente al fragmento de 3.4 kb necesario para la posterior ligación del nuevo fragmento carboxilo terminal de *tnaA*.

Una vez ligado, se transformaron bacterias de la cepa *DH5α* y se llevaron a cabo análisis de restricción de los plásmidos de 10 colonias resistentes a ampicilina.

La identidad de los plásmidos obtenidos se verificó con una doble digestión *KpnI/EcoRI*. Los plásmidos que liberaron un fragmento de aproximadamente 0.44 kb fueron posteriormente analizados por PCR. Para dicho análisis, se diseñó un oligonucleótido 3'

(Flag3´) con la secuencia 5´ CTT ATC GTC GTC ATC CTT GTA ´ que corresponde a la secuencia complementaria para FLAG. La amplificación con los "primers" Flag3´ y Sactna debería generar un fragmento aproximadamente 500 pb únicamente si el DNA templado contiene la secuencia FLAG en el extremo 3´de *tnaA*. Sin embargo, como los resultados de PCR no fueron claros, se seleccionó una de las clonas positivas por restricción y se envió a secuenciar para confirmar la fusión correcta del FLAG a *tnaA* y la ausencia de mutaciones. A esta construcción se le denominó pXK-FI (Fig.8).

**B) Reconstitución del fragmento original *XhoI-XhoI* (2.87 kb) de *tnaA* en el plásmido pXK-FI y**

**C) Subclonación de *tnaA-FLAG* en vector pUAST para expresión en mosca.**

La reconstitución del fragmento *XhoI-XhoI* (2.87 kb) en pXK-FI y la subsecuente clonación del transgen *tnaA-FLAG* en el vector pUAST se llevó a cabo de manera semejante a lo realizado para el transgen *FLAG-tnaA*.

**3. Obtención y mapeo de inserciones en líneas transgénicas.**

La obtención de moscas transgénicas es una herramienta de mucho valor para estudiar a un gen de interés en un contexto *in vivo*. Se pueden estudiar sus interacciones físicas, genéticas, sus funciones, sus efectos al sobreexpresarse o atenuarse su expresión en la mosca, entre otras muchas cosas.

Para obtener a las líneas transgénicas, los plásmidos pUAST que contienen el cDNA de *tnaA* fusionado a FLAG en su extremo amino y carboxilo respectivamente, obtenidos en la sección 1.2 y 1.3 de Resultados, fueron enviados a la compañía Genetic Services, Inc (ver Material y Métodos) para la inyección de embriones y la obtención de líneas transgénicas.

De la compañía obtuvimos 10 líneas con la construcción *FLAG-tnaA* las cuales se denominaron; *FLAG-TnaA* 1, 2, 3...10 y nueve líneas con la construcción *tnaA-FLAG* las cuales se denominaron; *TnaA-FLAG* 1, 2, 3...9. *tna* se encuentra en el cromosoma 3 y uno de los objetivos en los proyectos del laboratorio es manipular a los transgenes en fondos genéticos mutantes para *tna*. Este objetivo se facilitaría si lográbamos identificar y mantener líneas transgénicas donde los transgenes estuvieran insertados en un cromosoma diferente al cromosoma 3. No se buscaron inserciones en el cromosoma 4

porque prácticamente nunca suceden debido a que este cromosoma es muy pequeño y esencialmente heterocromático (Ashburner, 2004).

En cada línea de moscas transgénicas cada individuo puede representar un evento de inserción único y para conocer en que cromosoma se había insertado el transgen se seleccionaron tres machos de cada línea (*FLAG-TnaA* 1.1, 1.2, 1.3; 2.1, 2.2, 2.3.....10.3 y *TnaA-FLAG* 1.1, 1.2, 1.3, 2.1, 2.2, 2.3....9.3) para el de mapeo de la inserción (ver Material y Métodos).

Con esta estrategia se lograron identificar individuos donde los transgenes se insertaron en diversos cromosomas del genoma de *Drosophila*.

De las líneas mapeadas para la construcción *FLAG-tnaA*, se obtuvieron:

En el cromosoma X: 2 líneas (*FLAG-TnaA* 10.1 y 10.2)

En el cromosoma 2: 4 líneas (*FLAG-TnaA* 2.2; 4.2; 9.2 y 9.3)

En el cromosoma 3: 6 líneas (*FLAG-TnaA* 1.3; 3.1; 3.3; 6.2; 7.2; 8.1)

De las líneas mapeadas para la construcción *tnaA-FLAG*, se obtuvieron:

En el cromosoma X: ninguna

En el cromosoma 2: 2 líneas (*TnaA-FLAG* 9.2; 9.3a)

En el cromosoma 3: 10 líneas (*TnaA-FLAG* 1 2.1; 3.1; 3.2; 6.2; 6.3; 7.1; 7.3; 8.2; 8.3; 9.1)

Una vez conocido el cromosoma en el que se encontraba la inserción en cada línea, se construyeron líneas estables de cada una de ellas.

#### **4. Estabilización de las líneas transgénicas mapeadas.**

En la sección anterior, logramos identificar inserciones de los transgenes en diferentes sitios del genoma. Uno de los retos en la Genética es que una vez que se identifica la mutación deseada, se establezcan líneas de animales que puedan mantener a largo plazo la mutación de interés. En *Drosophila* esto se logra con la introducción de un cromosoma “balanceador” en el cromosoma homólogo al que contiene el transgen. El cromosoma balanceador se caracteriza por poseer fragmentos invertidos en su secuencia en particular en la región de interés donde se encuentre una mutación ó en este caso el transgen y así

imposibilita la pérdida de estas regiones por recombinación homóloga entre el cromosoma silvestre y el que contiene la mutación de interés. Además el cromosoma balanceador contiene mutaciones recesivas letales que impiden que los individuos homocigos para este cromosoma, sobrevivan.

Dicho esto, el siguiente paso fue introducir en las líneas transgénicas mapeadas anteriormente, cromosomas balanceadores 2 y 3. Para el balanceo de las líneas transgénicas con inserción del transgen en cromosoma 2, se seleccionaron individuos con ojos rojos y quetas gruesas, de la progenie de la cruce 2 ( $w^{1118}/Y$ ;  $P\{UAS-Flag-tnaA, w^+\}/+$ ;  $MKRS, Sb/+$ ) y se cruzaron con individuos de la línea  $w^{1118}/w^{1118}$ ;  $+/CyO$ ;  $+/+$  (Cruza 4 sección Material y Métodos). En esta cruce, una de las clases que se obtiene son individuos en donde el transgen queda heterocigo al cromosoma 2 balanceador llamado  $CyO$  ( $P\{UAS-Flag-tnaA, w^+\}/CyO$ ;  $+/+$ ). Esta es la clase balanceada con la que se puede generar una línea transgénica estable.

Para el caso de líneas transgénicas con inserción en cromosoma 3 se seleccionaron individuos con ojos rojos y alas “curly” de la progenie de la cruce 2 ( $w^{1118}/Y$ ;  $+/CyO$ ,  $P\{UAS-Flag-tnaA, w^+\}/+$ ) y se cruzaron con individuos de la línea  $w^{1118}/w^{1118}$ ;  $+/+$ ;  $TM3B/TM6B$  (cruza 5 sección Material y Métodos). En esta cruce, una de las clases que se obtiene presenta el transgen heterocigo al cromosoma balanceador 3:  $TM3B$  o  $TM6B$  ( $+/+$ ;  $P\{UAS-Flag-tnaA, w^+\}/TM3B$  ó  $TM6B$ ) y es la clase balanceada que genera una línea transgénica estable.

## **5. Expresión de las proteínas recombinantes FLAG-TnaA y TnaA-FLAG en la mosca.**

Antes de comenzar con ensayos más específicos se debe corroborar la expresión de la proteína recombinante en las moscas transgénicas ya que los transposones tienen la capacidad de rearrreglarse después de la integración en el genoma, lo cual puede modificar o eliminar su expresión (Ashburner, 2004), además la expresión de la proteína recombinante puede variar de línea a línea, dependiendo del sitio de inserción del transgen en el genoma (en heterocromatina ó eucromatina).

Los transgenes *FLAG-tnaA* y *tnaA-FLAG* construidos en este trabajo, están regulados por la secuencia *UAS* de levadura, por lo que su expresión está dirigida mediante el sistema *UAS-GAL4* de este organismo. Este sistema, permite la inducción de la proteína de interés espacio y /ó temporalmente-dirigida, manipulando el sitio donde se exprese el activador *GAL4*. Esto se logra eligiendo de una colección amplia en el acervo

comunitario de *Drosophila*, líneas de moscas que expresan GAL4 en tejidos y/o etapas de desarrollo de interés. A estas líneas se les conoce como "drivers" y están disponibles libremente.

El obtener moscas que expresen a las proteínas recombinantes en algunas de estas condiciones, nos permitirá realizar diversos análisis. En primera instancia podremos manipular la expresión de TnaA en la mosca, podremos realizar ensayos bioquímicos para identificar proteínas que interactúen con TnaA y podremos realizar ensayos de rescate de letalidad de individuos mutantes para *tna*, entre otros.

Entonces, para determinar si algunas de las líneas transgénicas establecidas podían expresar a las proteínas TnaA etiquetadas, lo primero que evaluamos fue la expresión ubicua, primero para confirmar que funcionaba el sistema, es decir, que se lograba expresar a la proteína recombinante y segundo para evaluar el efecto de dicha expresión en la mosca. Para este objetivo se cruzaron dos líneas con la inserción de los transgenes en el cromosoma 2, de cada construcción (*FLAG-tnaA* 2.2 y 4.2 y *tnaA-FLAG* 9.2 y 9.3a) con moscas que contienen el "driver" de expresión ubicua de Gal4: *P{Act5C-GAL4}25FO1/CyO, y<sup>+</sup>*. A este "driver" lo llamaremos *Act-Gal4* de ahora en adelante.

Las cruza se realizaron con individuos homocigos para los genes recombinantes así como también para el "driver" *Act-Gal4*, de tal manera que el 100% de la progenie fuera la clase esperada.

F0                    ♀ *Act-Gal4 / Act-Gal4*            X    ♂ *FLAG-tnaA / FLAG-tnaA*

F1                    100%                    *FLAG-tnaA / Act-Gal4*

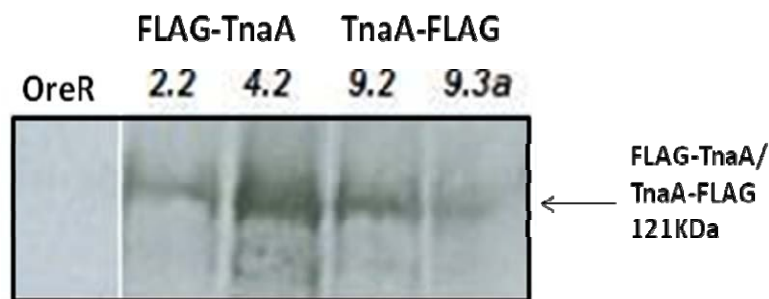
La cruza se realizó a 25°C y no se obtuvo progenie. Este resultado pudiera deberse a que la expresión ubicua, de TnaA etiquetada con FLAG sea tóxica y/o que la expresión haya sido demasiado fuerte.

Se encuentra reportado que la actividad de GAL4 es dependiente de la temperatura, siendo su máxima actividad a 29°C y su mínima actividad a 16°C (Duffy, 2002). Con el objeto de atenuar la expresión de TnaA etiquetada y poder obtener individuos que expresen a la proteína pero que sobrevivan a estadio adulto se realizó la misma cruza a temperaturas más bajas. Las temperaturas utilizadas fueron 18 y 22°C. En estas cruza también se utilizaron individuos homocigos de tal manera que el 100% de la progenie fuera la clase esperada.



A diferencia de cuando se llevó a cabo la cruce a 25°C, a 18°C se obtiene la progenie esperada en las cuatro líneas utilizadas. Sin embargo, no se detecta la proteína recombinante por análisis tipo Western con anticuerpo anti-FLAG (FlagM2, Sigma), en extractos de proteína solubles totales de individuos adultos (datos no mostrados). Este resultado podría deberse a que a 18°C la actividad de GAL4 es tan baja que la expresión del transgen es mínima y no alcanzó a detectarse por la técnica de Western.

Cuando la cruce se llevó a cabo a temperatura intermedia (22°C), también se obtiene la progenie esperada en las cuatro líneas utilizadas y en este caso sí detectamos la expresión de la proteína recombinante (Fig. 9). En la Tabla 3 se resumen los resultados de esta sección.



**Fig. 9. Detección de las proteínas FLAG-TnaA y TnaA-FLAG en moscas adultas a 22°C.** Extractos de proteína de la fracción insoluble de moscas adultas *FLAG-tnaA* y *tnaA-FLAG/Act-Gal4* líneas 2.2, 4.2, 9.2 y 9.3a y como control negativo, fracción insoluble de moscas silvestres *OregonR* analizados por la técnica de Western con el anticuerpo anti-FLAG 1:1000.

Temperatura	Progenie <i>FLAG-tnaA</i> ó <i>tnaA-FLAG/Act-Gal4</i>	Detección de FLAG-TnaA o TnaA-FLAG
25°C	No	--
18°C	Sí	No
22°C	Sí	Sí

**Tabla 3. Resultados de la expresión de las proteínas recombinantes a diferentes temperaturas.**

## 6. Construcción de la fusión GST-TnaA.

Para el etiquetamiento de TnaA con GST se partió del plásmido pKS-*tnaA*<sub>TGA</sub> (Tesis de Licenciatura, R. Pérez, 2005), el cual contiene el cDNA de *tnaA* completo. Dicho cDNA fue escindido del plásmido con las enzimas de restricción *EcoRI* en su extremo amino

terminal y *SalI* en su extremo carboxilo terminal y fue clonado en el plásmido pGEX4T-1, previamente digerido con *EcoRI* y *XhoI*. Las enzimas *XhoI* y *SalI* generan extremos compatibles entre el vector y el cDNA de *tnaA* para su posterior ligación y clonación direccional.

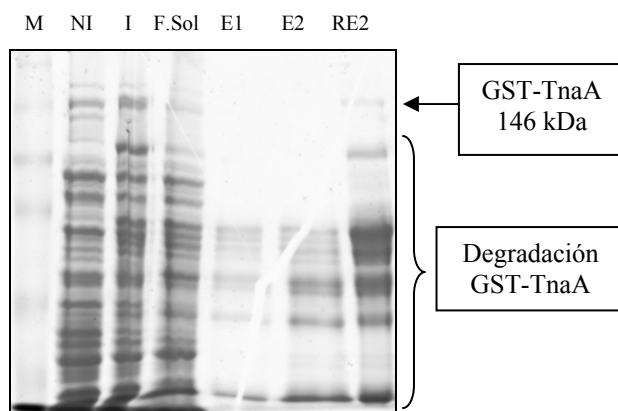
La identidad del plásmido se verificó en las colonias resistentes a ampicilina con una doble digestión *EcoRI/SalI*. Los plásmidos que liberaron un fragmento de aproximadamente 3.3 kb fueron considerados positivos. Se seleccionó uno de ellos y se envió a secuenciar para corroborar que la clonación del cDNA de *tnaA* quedó en el marco de lectura correcto.

### 7. Expresión y purificación de la proteína de fusión GST-TnaA en *E. coli*.

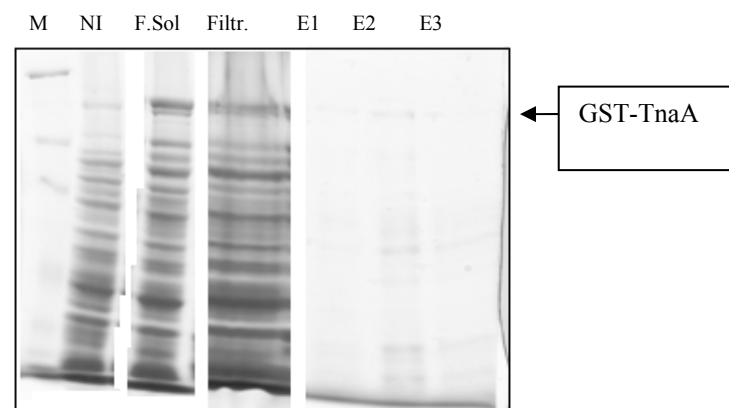
Se probaron diversas condiciones de inducción de la proteína de fusión GST-TnaA en *E. coli* con el resultado de condiciones óptimas de inducción y posterior solubilización; 0.1 mM de IPTG, tiempo de inducción 5-6 h, 18°C (Fig. 10a).

La proteína de fusión GST-TnaA tiene el peso esperado de 146 kDa. Su purificación se llevó a cabo mediante la unión a perlas de sefarosa con glutatión acoplado. Siguiendo el protocolo de purificación del proveedor (GE Healthcare) obtuvimos un pegado muy pobre de la forma completa de la proteína de fusión (Fig. 10a). Esto se debe a que los productos de degradación de la proteína de fusión y/o los productos trancos de la misma compiten por la unión a las perlas, siendo los de menor tamaño quienes se unen más eficientemente (Frangioni *et al.*, 1993) (carril RE2, Fig. 10a).

10a.



10b.



**Fig. 10 Inducción de GST-TnaA a 37°C (a) y 18°C (b).** Se señala con flecha negra la banda correspondiente a GST-TnaA y con un corchete la degradación de GST-TnaA. M: Marcador preteñido SDS PSBR; NI: Cultivo no inducido I: cultivo inducido con IPTG 0.1 mM; F.Sol: Fracción soluble; E1 y E2: eluciones con 20 mM de glutatión reducido; RE2: Resina glutatión sefarosa luego de eluciones. b. Filtr: fracción filtrada en centricon de 100 kD, E1, E2 y E3: eluciones con glicina pH:2.

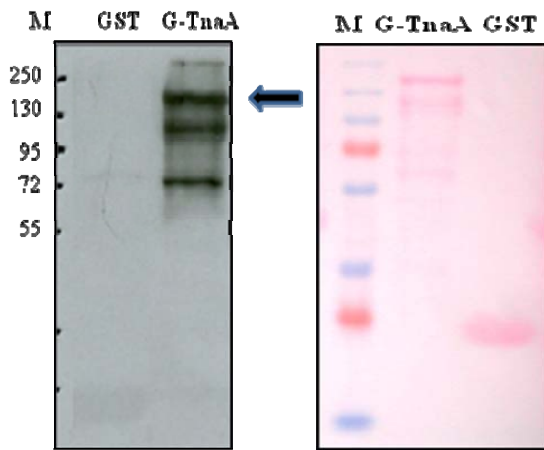
Para obtener una mayor cantidad de la forma completa de GST-TnaA para unirla a las perlas de glutatión-sefarosa, se llevó a cabo un paso previo donde se filtró la fracción soluble del lisado de *E. coli* con un centrífugo con corte de 100 kDa para quedarnos con las proteínas mayores de este peso (incluyendo la forma completa de GST-TnaA), antes de someterlo a interacción con las perlas de sefarosa-glutatión. De esta manera se logró la unión de mayor cantidad de GST-TnaA completa a las perlas y se pudo seguir con la purificación (comparar E1 y E2 de Fig. 10a y 10b).

Para la elusión de la proteína de fusión también tuvimos que recurrir a condiciones alternativas, puesto que no se logró una elusión eficiente de la proteína con glutatión reducido como lo indica el protocolo estándar. Para el establecimiento de estas condiciones alternativas, se contó con el antecedente de trabajo de A. Juárez (Tesis de Maestría, 2009), quien había establecido que algunos fragmentos de GST-TnaA unidos a perlas de glutatión sefarosa se eluyen con glicina ácida, pH 2. Con este antecedente, se logró la elusión de GST-TnaA completa en las mismas condiciones, como se describe en la sección de Material y Métodos.

### **8. Ensayo de interacción tipo “Pull Down” en extracto nuclear de embriones de 3 a 21 h.**

La proteína Brm se encuentra en embriones de *Drosophila* (Elfring, et al., 1998)) y en el inicio de esta sección se demostró que TnaA se encuentra en los núcleos de embriones de 3- 21 h. *tna* fue identificado en un "screening" de genes que interaccionan con *brm*, y la proteína Brm es por lo tanto uno de los principales candidatos para tener una interacción física con TnaA. Para confirmar esta hipótesis se realizó un ensayo de interacción tipo “Pull Down” utilizando como carnada la proteína recombinante GST-TnaA de proteínas presentes en el extracto nuclear de embriones de 3 a 21 h. Como control negativo se utilizó como carnada la proteína GST. Ambas proteínas se manejaron acopladas a la resina de glutatión sefarosa. Para la detección se utilizó un anticuerpo específico para Brm de *Drosophila* (Elfring, et al., 1998).

En este ensayo se encontró que la proteína Brm interaccionó físicamente con GST-TnaA y no con GST (Fig. 11), lo cual indica que estas dos proteínas podrían interactuar físicamente *in vivo*.



**Fig. 11. Brm interacciona físicamente con TnaA.** M: Marcador SDS PSBR, GST: proteínas que interaccionaron con GST como control negativo. GST-TnaA: proteínas que interaccionaron con GST-TnaA. Anticuerpo primario: anti-Brm 1:1500. La flecha roja indica la banda correspondiente a Brm (186 kDa).

Aunque el Pull Down no es un ensayo estrictamente *in vivo* las proteínas “blanco” se encuentran en su contexto natural en el extracto y en cantidades nativas. Para corroborar este resultado es necesario hacer una co-inmunoprecipitación de ambas proteínas en extractos nucleares de embriones silvestres y/o en extractos nucleares de las moscas que expresan a TnaA etiquetada con FLAG. De igual manera para confirmar que la interacción física es directa entre estas dos proteínas es necesario realizar ensayos de interacción “uno a uno”, como por ejemplo “pull down” o ensayo de dos híbridos utilizando como carnada a TnaA y como anzuelo a Brm y vice-versa.

## Discusión

En el presente trabajo se ha identificado a TnaA silvestre en la fracción nuclear de embriones de *Drosophila* y se ha identificado que TnaA interacciona con Brm con la técnica de "Pull Down" a partir de extractos nucleares de embriones. Además se han desarrollado diversas herramientas que permiten conocer más acerca del papel de TnaA a nivel celular y en el organismo completo.

La caracterización molecular de *tna* (Gutiérrez *et al.*, 2003) permitió predecir la existencia de por lo menos dos isoformas llamadas TnaA y TnaB. TnaA contiene una señal de localización nuclear (NLS) y un dominio SP-RING característico de proteínas con actividad E3 ligasa de SUMO. Las secuencias que codifican para estos dominios se pierden en el “splicing” alternativo que genera a TnaB (Gutiérrez *et al.*, 2003). *tna* interactúa genéticamente con varios genes trithorax: *brm*, *osa*, *mor* que codifican para

subunidades del complejo remodelador de la cromatina Brm, así como con *kis* y con *skd* que codifican para la ATPasa de otro complejo remodelador de la cromatina y un componente del Mediador, respectivamente (Gutiérrez *et al.*, 2003). Estos antecedentes sustentan la hipótesis de que TnaA sea una E3 ligasa de SUMO que podría interactuar físicamente con alguna(s) o todas las proteínas mencionadas anteriormente y que podría incluso estar participando en su sumoilación. La sumoilación es una modificación post-traduccional que tiene variados efectos sobre las proteínas modificadas, siendo algunos de ellos su estabilización, la provocación de su transporte al núcleo, promover ó impedir interacciones proteína-proteína, entre otros, lo cual lleva a la pregunta inmediata de ¿qué efecto tiene TnaA sobre las proteínas con quien interactúa físicamente y/o sumoila?

Debido a esto, nos propusimos diseñar las herramientas que permitan identificar a las proteínas que interactúen físicamente con TnaA. Comenzamos por etiquetar molecularmente a TnaA, con GST en su extremo amino para la expresión y purificación de GST-TnaA de *E. coli* y poder realizar posteriormente ensayos bioquímicos *in vitro*. Debido a que el transcrito de *tnaA* y la proteína se encuentran en todos los estadios del desarrollo de *Drosophila* (Gutiérrez *et al.*, 2003, Fig. 3, Juárez, Tesis de Maestría 2009) y a que es más sencillo trabajar con extractos de embrión para ensayos bioquímicos, se obtuvo la fracción nuclear de embriones de 3 a 21 h. En estos embriones ya ha terminado la dependencia materna, ya hay transcripción cigótica y se están llevando a cabo múltiples procesos que desembocan en la formación de la larva de 1er instar.

Ya que TnaA contiene una NLS, en primera instancia se verificó su presencia en la fracción nuclear mediante ensayos tipo Western blot. Como se ve en la Figura 6 se detectaron dos bandas correspondientes a TnaA, y no se detectó su presencia en la fracción citoplásmica en las condiciones probadas. La diferencia de peso entre dichas bandas es de 10 kDa aproximadamente, similar al peso de SUMO que es de 11 kDa. La posibilidad de que el mismo TnaA se esté sumoilando es interesante pues existen reportes de otras E3 ligasas de SUMO, con dominios SP-RING, que se sumoilan y esta modificación favorece su actividad como E3 ligasa (Palvimo, 2007). Igualmente pudiera ser otra la modificación post-traduccional que sufriera TnaA y tendríamos que hacer un ensayo tipo Western blot con anti-SUMO para saber si TnaA se encuentra sumoilada.

TnaA es una proteína de 120 kDa, que por su tamaño es difícil expresar y purificar de bacterias. La proteína de fusión GST-TnaA fue útil para purificar la proteína completa y se pudieron realizar ensayos de interacción física de TnaA con proteínas del extracto nuclear de embriones de 3 a 21 h. Inicialmente se realizaron ensayos tipo Far Western,

en los cuales las proteínas del extracto nuclear de embriones se transfirieron a una membrana de PVDF, que se incubó posteriormente con GST-TnaA como carnada para detectar interacciones utilizando un anticuerpo contra la región amino de TnaA. Este ensayo nos permitiría obtener proteínas (identificadas como bandas y por su peso en la membrana) que interactuaran con TnaA y las cuales deberían de secuenciarse para su identificación. Este ensayo no brindó resultados muy claros ya que en las condiciones probadas no se pudieron identificar bandas diferenciales con el control negativo, (datos no mostrados).

El resultado más interesante obtenido con la versión GST-TnaA fue mediante el ensayo de "Pull Down", en el cual GST-TnaA acoplada a una resina de glutatión-sefarosa precipitó a la proteína Brm desde un extracto nuclear de embriones de 3 a 21 h (Fig. 11). Este es un resultado muy importante ya que TnaA se identificó por su interacción genética con Brm (Gutiérrez *et al.*, 2003) y es entonces una proteína candidata para llevar a cabo una interacción física con TnaA, lo cual comienza a comprobarse con este primer resultado. Aunque el "Pull Down" no es un ensayo estrictamente *in vivo* las proteínas "blanco" se encuentran en su contexto natural en el extracto y en cantidades nativas. El paso inmediato para corroborar la interacción física será coimmunoprecipitar ambas proteínas a partir de extractos nucleares de embriones silvestres o embriones que expresen a TnaA etiquetada (ver más adelante).

La estrategia para conocer a las proteínas que interactúan con TnaA en *Drosophila* también incluyó la obtención de líneas de moscas transgénicas que pudieran expresar a TnaA etiquetada con FLAG. Estas moscas nos permitirían realizar, ensayos de interacción *in vivo* que apoyarían o no a los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* con GST-TnaA. La etiqueta FLAG en los extremos amino y carboxilo de TnaA se eligió porque es una etiqueta que funciona bien en *Drosophila*, a diferencia de otras etiquetas que no son detectables ó que cruzan con proteínas endógenas, como lo es la cola de histidinas (M. Herrera, Tesis de Maestría 2007).

En este trabajo se obtuvieron diversas líneas transgénicas estables con la fusión de la etiqueta FLAG a TnaA en ambos extremos de la proteína. Una vez obtenidas las moscas transgénicas debimos mapear el cromosoma donde ocurrió la inserción para cada transgen, lo cual es imprescindible para todos los estudios genéticos.

Posteriormente se realizaron ensayos de expresión de las proteínas etiquetadas en la mosca donde se obtuvieron resultados interesantes. Para obtener individuos que expresaran las versiones de TnaA etiquetadas, se aprovechó el sistema UAS-GAL4, en

donde la expresión de los transgenes de interés está controlada por el activador transcripcional de levadura que reconoce a las secuencias UAS que se encuentran en el promotor de los transgenes. Los transgenes entonces se expresan en la etapa y/o el lugar donde se exprese GAL4. En este caso se eligió como primer intento, promover la expresión ectópica de GAL4 y por ende de *UAS-tnaA-Flag* ó *UAS-Flag-tnaA*, utilizando el “driver” *Act5C-GAL4*. Llevando a cabo esta cruce a 25°C encontramos que la expresión ectópica de las versiones etiquetadas de TnaA causa letalidad. Como la actividad de GAL4 es dependiente de la temperatura (Duffy, 2002) realizamos la misma cruce a temperaturas menores para atenuar la expresión de GAL4 y por lo tanto de TnaA etiquetada y así obtener individuos de etapas post-embrionarias que expresaran a la proteína recombinante. Encontramos que a 22°C las moscas sobreviven y expresan a las proteínas etiquetadas (Fig. 9) y no presentan fenotipos homeóticos.

Estudios previos habían mostrado que *tna* es un gen esencial, pues fondos mutantes de pérdida de función, ocasionan letalidad (Gutiérrez *et al.*, 2003). En este trabajo encontramos que la situación contraria, es decir, la expresión ectópica de las proteínas FLAG-TnaA y TnaA-FLAG (a 25°C) también es letal. Aunque aún no tenemos información suficiente como para entender la razón de la letalidad observada, podemos recordar que TnaA es una posible E3 ligasa de SUMO que de alguna forma está ligada genéticamente a los complejos remodeladores BRM y que es indispensable para la expresión de los genes HOX (Gutiérrez *et al.*, 2003). Los genes HOX y su correcta expresión son a su vez indispensables para la sobrevivencia de los organismos. Las mutaciones en dichos genes son contra-seleccionadas por la naturaleza, ocasionan la muerte en etapas embrionarias tanto en *Drosophila* como en mamíferos o mueren en etapa pre-reproductiva. La regulación de la expresión de los genes HOX debe de ser por lo tanto muy precisa y posiblemente sea esta la causa de la letalidad en individuos que tienen un exceso de TnaA. Además, en términos generales, la vía de la sumoilación se encuentra involucrada en otros procesos vitales de la célula como son el ciclo celular, la reparación de daño al ADN, la replicación del ADN, y la regulación de la expresión de diversos genes. Por lo tanto una des-regulación de la sumoilación puede provocar daños severos en la célula y el organismo. TnaA como E3 ligasa de SUMO, al ser expresada en exceso y en tejidos y/o etapas en dónde quizás normalmente no se expresa, puede estar sumoilando en exceso y/o sumoilando proteínas que normalmente no debería de sumoilar y por lo tanto provocando un desequilibrio en las células.

Debido a lo expuesto en el párrafo anterior y para después poder utilizar estas versiones etiquetadas como herramientas en la identificación de las proteínas que interactúen físicamente con ellas, debemos comprobar que las proteínas FLAG-TnaA y TnaA-FLAG llevan a cabo la función silvestre de TnaA. Esto se llevará a cabo ensayando si estas proteínas, rescatan la letalidad de moscas homócigas mutantes en *tna* que mueren en etapas previas a la etapa adulta (Gutiérrez *et al.*, 2003). En este trabajo logramos encontrar que a 22°C la expresión de FLAG-TnaA ó de TnaA-FLAG es detectable y no causa letalidad. Por lo tanto, el ensayo de rescate de la letalidad presentada por las mutantes de falta de función de *tna* se llevará a cabo a la temperatura permisiva determinada en este trabajo (22°C).

Por otro lado, con estas líneas transgénicas se podrán realizar ensayos *in vivo* de interacción que podrían validar los resultados obtenidos en el "Pull Down" y obtener nuevos candidatos de interacción. Asimismo, estas líneas de moscas transgénicas pueden cruzarse con otros "drivers" para dirigir la expresión de TnaA etiquetada específicamente a algún tejido o etapa del desarrollo.

Llevando la discusión a un plano más amplio recordemos que los CRC Brahma median la remodelación dependiente de ATP de la cromatina y se sabe que su actividad es crítica para la diferenciación y proliferación celular (revisado en Reisman *et al.*, 2009). Estos complejos están presentes en todos los organismos eucariontes y la mayoría de sus subunidades se encuentran conservadas. La pérdida de función del CRC Brahma y/o Brg1 en humano se ha asociado a transformaciones malignas. La subunidad Baf47 (Snr1 en *Drosophila*) fue el primer componente del complejo identificado como un supresor tumoral (Muchardt y Yaniv, 2001, Roberts y Orkin, 2004). Posteriormente se descubrió que en varias líneas tumorales, así como en 10 a 20% de cáncer de pulmón primario, Brg1 y Brm se encuentran ausentes concomitantemente (Muchardt y Yaniv, 2001, Reisman *et al.*, 2002, Glaros y Reisman 2007). Mientras que la deficiencia de Brg1 en líneas tumorales se debe a mutaciones génicas (Wong *et al.*, 2000), la deficiencia de Brm debe regularse epigenéticamente ya que su secuencia génica no se encuentra alterada (Glaros, 2007).

Existe una búsqueda exhaustiva de recursos que permitan estabilizar o reconstituir a Brm en diversos tipos de cáncer. Por ejemplo, se están llevando a cabo ensayos clínicos con inhibidores de HDAC (deacetilasas de histonas) en células tumorales con el propósito de aumentar la cantidad de Brm en estas células (Yamamichi, *et al.*, 2005, Muchardt *et al.*, 2009). Sin embargo, aunque dichos inhibidores aumentan la expresión de la proteína



también inhiben en cierto grado su función, ya que Brm se acetila en dos sitios, inactivándose (Glaros, 2007). Por otro lado, los inhibidores de HDAC no son específicos por lo cual pueden tener efectos colaterales.

Considero que estas vertientes del estudio de Brm en cáncer, plantean un panorama muy interesante con respecto a TnaA como E3 ligasa de SUMO, su interacción genética con *brm* y el resultado de este trabajo, donde encontramos que Brm interacciona físicamente con TnaA por la técnica de "Pull Down". Brm presenta en su secuencia ocho posibles sitios consenso de sumoilación, aunque este hecho no permite tener la certeza de que la proteína se sumoile, cabe la posibilidad de que así sea. Si TnaA fuese la E3 ligasa de SUMO que interviene en dicha modificación, y recordando que la sumoilación puede estabilizar a la proteínas, TnaA podría ser un candidato para estabilizar a Brm en células tumorales sin afectar posiblemente muchas otras funciones (como es el caso de los inhibidores de HDACs y otros). Esto quiere decir que TnaA no sólo jugaría un papel muy importante en la célula en *Drosophila*, sino que también pudiera tener potencial como agente terapéutico en células tumorales deficientes en Brm.

Regresando al origen de este proyecto y al objetivo general del laboratorio que es conocer más acerca de los mecanismos para la expresión del genoma eucarionte, resulta esencial ubicar a *tna* dentro de este proceso. Recordemos de manera amplia que aunque hay factores "basales" de transcripción como son la RNA polimerasa II y sus factores asociados conocidos como TFII ("Transcription Factor for RNA pol II"), el mecanismo de expresión de cada gen es prácticamente único ya que puede involucrar a factores de activación/represión específicos para el gen y/o secuencias en el promotor específicas y/o marcas en la cromatina específicas. La combinación de todas estas variables sumada a la regulación de los activadores y/o represores involucrados resulta en la expresión o represión de un gen. Como se mencionó en la Introducción, los genes HOX constituyen un excelente modelo para el estudio de la expresión génica y *tna* que es un gen *trxG* se requiere para la correcta expresión de los genes HOX. Los genes *trxG* actúan de diversas maneras. Varios de ellos codifican para subunidades de CRC como por ejemplo: *brm*, *mor*, *osa*, *snr1* (CRC Brahma) y *kis* (CRC Kismet). *tna* interacciona genéticamente con estos genes, sin embargo, no creemos que TnaA forme parte de los CRC, sino que podría ser un regulador de los mismos mediante la sumoilación de alguna(s) de sus subunidades. La sumoilación podría por ejemplo favorecer el ensamblaje, la estabilidad y por ende la actividad de los CRC y/o podría modificar la especificidad de los mismos.

Las subunidades Brm, Mor, Osa, Snr1 y Kis poseen sitios consenso de sumoilación y un estudio reciente de sumoilación global en *Drosophila* reporta a Osa como un blanco de SUMO (Nie *et al.*, 2009), datos que concuerdan con nuestra hipótesis.

Los CRC BAP y PBAP en *Drosophila* coinciden en algunas regiones de cromosomas politénicos de *Drosophila* pero no coinciden en otras, lo cual podría indicar que regulan la transcripción de diferentes genes (Mohrmann *et al.*, 2004). No se sabe exactamente cómo es que estos CRC son reclutados a los promotores pertinentes pero se cree que esto debe ocurrir por medio de factores de transcripción con unión a secuencias específicas de DNA.

Los promotores de los genes HOX presentan la característica de no contener la caja TATA en su secuencia sino al elemento DPE (“Downstream Promoter Element”) que se sitúa a una distancia precisa río abajo del sitio de inicio de la transcripción (Inr) (Juven-Gershon *et al.*, 2009). Existen factores de transcripción específicos para promotores con DPE, como por ejemplo Caudal en *Drosophila* (Juven-Gershon *et al.*, 2009) y podría ser que alguno de éstos reclute al CRC BAP por ejemplo. La acción de TnaA como E3 ligasa de SUMO podría ser a este nivel también, es decir, que regule por sumoilación la actividad de los factores que dirijan al CRC Brahma a promotores específicos.

Los datos con los que contamos hasta ahora indican que TnaA es una proteína muy importante para la célula y la identificación de sus blancos así como el estudio de su actividad como E3 ligasa de SUMO brindará información valiosa para el campo de la transcripción eucarionte.

## **Conclusiones**

1. Se logró precipitar a Brm de extracto nuclear de embriones de 3 a 21 h con GST-TnaA.
2. Se obtuvieron líneas estables de moscas transgénicas que pueden expresar a FLAG-TnaA y TnaA-FLAG.

Las subunidades Brm, Mor, Osa, Snr1 y Kis poseen sitios consenso de sumoilación y un estudio reciente de sumoilación global en *Drosophila* reporta a Osa como un blanco de SUMO (Nie *et al.*, 2009), datos que concuerdan con nuestra hipótesis.

Los CRC BAP y PBAP en *Drosophila* coinciden en algunas regiones de cromosomas politénicos de *Drosophila* pero no coinciden en otras, lo cual podría indicar que regulan la transcripción de diferentes genes (Mohrmann *et al.*, 2004). No se sabe exactamente cómo es que estos CRC son reclutados a los promotores pertinentes pero se cree que esto debe ocurrir por medio de factores de transcripción con unión a secuencias específicas de DNA.

Los promotores de los genes HOX presentan la característica de no contener la caja TATA en su secuencia sino al elemento DPE (“Downstream Promoter Element”) que se sitúa a una distancia precisa río abajo del sitio de inicio de la transcripción (Inr) (Juven-Gershon *et al.*, 2009). Existen factores de transcripción específicos para promotores con DPE, como por ejemplo Caudal en *Drosophila* (Juven-Gershon *et al.*, 2009) y podría ser que alguno de éstos reclute al CRC BAP por ejemplo. La acción de TnaA como E3 ligasa de SUMO podría ser a este nivel también, es decir, que regule por sumoilación la actividad de los factores que dirijan al CRC Brahma a promotores específicos.

Los datos con los que contamos hasta ahora indican que TnaA es una proteína muy importante para la célula y la identificación de sus blancos así como el estudio de su actividad como E3 ligasa de SUMO brindará información valiosa para el campo de la transcripción eucarionte.

## **Conclusiones**

1. Se logró precipitar a Brm de extracto nuclear de embriones de 3 a 21 h con GST-TnaA.
2. Se obtuvieron líneas estables de moscas transgénicas que pueden expresar a FLAG-TnaA y TnaA-FLAG.

## Perspectivas

El panorama con respecto a *tna* es muy amplio y diverso, por lo tanto hay mucho por hacer para ir descubriendo más acerca de su función en la célula y en *Drosophila*. En relación a este trabajo considero que las perspectivas inmediatas son las siguientes:

1. Confirmar la interacción *in vivo* de TnaA y Brm mediante coimmunoprecipitación en extractos nucleares silvestres de embriones de *Drosophila* ó de extractos de embriones de las líneas transgénicas que expresan a TnaA etiquetada con FLAG. También se puede profundizar en dicha interacción y caracterizarla, realizando ensayos tipo "Pull Down" con fragmentos de TnaA y de Brm para conocer qué regiones de cada proteína son las involucradas en la interacción.
2. Analizar si Brm se encuentra sumoilada en la célula, realizando el Pull Down de Brm con GST-TnaA y luego revelando con anti-SUMO.
3. Continuar buscando blancos de interacción física con TnaA mediante ensayos *in vitro* (dos híbridos, "Pull Down") e *in vivo* (coIP).
4. Realizar el ensayo de complementación de individuos mutantes de *tna* con las moscas transgénicas *FLAG-tnaA* y *tnaA-FLAG*.
5. Dirigir la expresión de *FLAG-tnaA* y *tnaA-FLAG* a tejidos y/o etapas específicas, utilizando diferentes drivers de expresión de Gal4.

## BIBLIOGRAFÍA

- Armstrong, J.A., Bieker, J.J., Emerson, B.M.** (1998) A SWI/SNF-related chromatin remodeling complex, E-RC1, is required for tissue-specific transcriptional regulation by EKLF in vitro. *Cell* **95**, 93-104.
- Belikov, S., Gelius, B., Wrangé, O.** (2001). Hormone-induced nucleosome positioning in the MMTV promoter is reversible. *EMBO J.* **20**, 2802-2811.
- Bernier-Villamor, V., Sampson, D.A., Matunis, M.J., Lima, C.D.** (2002). Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1. *Cell* **108**, 345-356.
- Bourachot, B., Yaniv, M., Muchardt, C.** (2003) Growth inhibition by the mammalian SWI/SNF is regulated by acetylation. *EMBO J.* **22**, 6505-6515.
- Brizuela, B. J., Kennison, J. A.** (1997). The *Drosophila* homeotic gene *moira* regulates expression of *engrailed* and HOM genes in imaginal tissues. *Mech. Dev.* **65**, 209 -220.
- Chalkley, G.E., Moshkin, Y.M., Langenberg, K., Bezstarosti, K., Blastyak, A., Gyurkovics, H., Demmers, J.A., Verrijzer, C.P.** (2008) The transcriptional coactivator SAYP is a trithorax group signature subunit of the PBAP chromatin remodeling complex. *Mol. Cell Biol.* **28**, 2920-2929.
- Collins, R., Furukawa, T., Tanese, N., Treisman, J.** (1999) Osa associates with the Brahma chromatin remodeling complex and promotes the activation of some target genes. *EMBO J.* **18**, 7029-7040.
- Duffy, J.** (2002) Gal4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss Army knife. *Genesis* **34**, 1-15.
- Elfring, L., Daniel, C., Papoulas, O., Deuring, R., Sarte, M., Moseley, S., Beek, S., Waldrip, R., Daubresse, G., DePace, A., Kennison, J.A., Tamkun, T.** (1998) Genetic analysis of *brahma*: the *Drosophila* homolog of the yeast chromatin remodeling factor SWI2/SNF2. *Genetics* **148**, 251-265
- Fazio, T.G., Tsukiyama, T.** (2003). Chromatin remodeling *in vivo*: evidence for a nucleosome sliding mechanism. *Mol. Cell.* **12**, 1333-1340.
- Flaus, A., Owen-Hughes, T.** (2001). Mechanisms for ATP-dependent chromatin remodelling. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**, 148 -154.
- Fraser, A.G., Kamath, R.S., Zipperlen, P., Martinez-Campos, M., Sohrmann, M., Ahringer, J.** (2000). Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature* **408**, 325-330.
- Glaros, S., Cirrincione, G.M., Muchardt, C., Kler, C.G., Michael, C.W., Reisman, D.** (2007) The reversible epigenetic silencing of Brahma: implications for clinical targeted therapy. *Oncogene* **26**, 7058-7066.
- Griekspoor, A, Groothuis, T. Enzyme X versión 3.1**
- Gutiérrez, L., Zurita, M., Kennison, J.A., Vázquez, M.** (2003). The *Drosophila* trithorax group gene *tonalli* (*tna*) interacts genetically with the Brahma remodeling complex and encodes an SP-RING finger protein. *Development* **130**, 343-54.
- Hari, K.L., Cook, K.R., Karpen, G.H.** (2001). The *Drosophila* *Su(var)2-10* locus regulates chromosome structure and function and encodes a member of the PIAS protein family. *Genes Dev.* **15**, 1334-1348.
- Hayashi, T., Seki, M., Maeda, D., Wang, W., Kawabe, Y., Seki, T., Saitoh, H., Fukagawa, T., Yagi, H., Enomoto, T.** (2002). Ubc9 is essential for viability of higher eukaryotic cells. *Exp. Cell Res.* **280**, 212-221.
- Hochstrasser, M.** (2001). SP-RING for SUMO: new functions bloom for a ubiquitin-like protein. *Cell* **107**, 5-8.
- Huang, C.Y., Beliakoff, J., Lee, J., Li, X., Sharma, M., Lim, B., Sun, Z.** (2005). Zimp7, a novel PIAS-like protein, enhances androgen receptor-mediated transcription and interacts with SWI/SNF-like BAF complexes. *Mol. Endocrinol.* **19**, 2915-29.
- Juven-Gershon, T., Hsu, J.Y., Kadonaga, J. T.** (2009). Caudal, a key developmental regulator, is a DPE-specific transcriptional factor. *Genes Dev.* **22**, 2823-2830.

- Kagey, M.H., Melhuish, T.A., Wotton, D.** (2003). The Polycomb protein Pc2 is a Sumo E3. *Cell* **113**, 127-137.
- Kal, A., Mahmoudi, T., Zak, N., Verrijzer, C.** (2000) The Drosophila Brahma complex is an essential coactivator for the trithorax group protein Zeste. *Genes. Dev.* **14**, 1058-1071.
- Kang, J.S., Saunier, E.F., Akhurst, R.J., Derynck, R.** (2008) The type I TGF- $\beta$  receptor is covalently modified and regulated by Sumoylation *Nat Cell Biol.* **10**: 654–664.
- Kaufman, T., Lewis, R., Wakimoto, B.** (1980) Cytogenetic analysis of chromosome 3 in *Drosophila melanogaster*: the homeotic gene complex in polytene chromosome interval 84A-B. *Genetics* **94**, 115–133.
- Kamakaka, R.T., Kadonaga, J.T.** (1994) The soluble nuclear fraction, a highly efficient transcription extract from *Drosophila* embryos. *Meth. Cell. Biol.* **44**, 225-35.
- Kennison J.** (2004) Introduction to the Trx-G and Pc-G genes. *Meth. Enzymol.* **377**, 61-70.
- Kennison, J. A. and M. A. Russell** (1987). "Dosage-dependent modifiers of homeotic mutations in *Drosophila melanogaster*." *Genetics* **116**: 75-86.
- Kirsh, O., Seeler, J.S., Pichler, A., Gast, A., Muller, S., Miska, E., Mathieu, M., Harel-Bellan, A., Kouzarides, T., Melchior, F., Dejean, A.** (2002). The SUMO E3 ligase RanBP2 promotes modification of the HDAC4 deacetylase. *EMBO J.* **21**, 2682-2691.
- Kurepa, J., Walker, J.M., Smalle, J., Gosink, M.M., Davis, S.J., Durham, T.L., Sung, D.Y., Vierstra, R.D.** (2003). The small ubiquitin-like modifier (SUMO) protein modification system in Arabidopsis. Accumulation of SUMO1 and -2 conjugates is increased in stress. *J. Biol. Chem.* **278**, 6862-6872.
- Lawrence, P., Morata, G.** (1994). Homeobox genes: their function in *Drosophila* segmentation and pattern formation. *Cell* **78**, 181-189.
- Lee, J., Beliakoff, J., Sun, Z.** (2007). The novel PIAS-like protein hZimp10 is a transcriptional co-activator of the p53 tumor suppressor. *Nucleic Acids Res.* 1-12.
- Lessard, J., Wu J.I., Ranish, J.A., Wan, M., Winslow, M.M., Staahl, B.T., Wu, H., Aebersold, R., Graef, I.A., Crabtree, G.R.** (2007) An essential switch in subunit composition of a chromatin remodeling complex during neural development. *Neuron* **55**, 201-215.
- Lewis E.** (1978) A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* **276**, 565–70.
- Li, S.J., Hochstrasser, M.** (1999). A new protease required for cell-cycle progression in yeast. *Nature* **398**, 246-251.
- Li, T., Evdokimov, E., Shen, R.F., Chao, C.C., Tekle, E., Wang, T., Stadtman, E.R., Yang, D.C., Chock, P.B.** (2004) SUMOylation of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins, zinc finger proteins, and nuclear pore complex proteins: a proteomic analysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 8551–8556.
- Mark, C.** (1988) 'DNA Strider': a 'C' program for the fast analysis of DNA and protein sequences on the Apple Macintosh family of computers. *Nucl. Acids Res.* **16**: 1829–1836.
- Mizuguchi, G., Shen, X., Landry, J., Wu, W.H., Sen, S., Wu, C.** (2003). ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science*. **303**, 343-348.
- Modena, P., Lualdi, E., Facchinetti, F., Galli, L., Teixeira, M.R., Pilotti, S., Sozzi, G.** (2005) SMARCB1/INI1 tumor suppressor gene is frequently inactivated in epithelioid sarcomas. *Cancer Res.* **65**, 4012–4019.
- Mohrmann, L., Langenberg, K., Krijgsveld, J., Kal, A.J., Heck, A.J., Verrijzer, C.P.** (2004). Differential targeting of two distinct SWI/SNF-related *Drosophila* chromatin-remodeling complexes. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 3077-3088.
- Mohrmann, L., C. P. Verrijzer.** (2005) Composition and functional specificity of SWI2/SNF2 class chromatin remodeling complexes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1681**, 59–73.
- Muchardt C, Yaniv M.** (2001). When the SWI/SNF complex remodels the cell cycle. *Oncogene* **20**, 3067–3075.
- Muller, S., Hoege, C., Pyrowolakis, G. and Jentsch, S.** (2001) SUMO, ubiquitin mysterious cousin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 202 -210.

**Nie, M., Xie, Y., Looi, J.A., Courey, A.J.** (2009) Genetic and proteomic evidence for roles of Drosophila SUMO in cell cycle control, ras signaling, and early pattern formation. *PLoS One*. **4**, e5905.

**Palvimo, J.J.** (2007). PIAS proteins as regulators of small ubiquitin-related modifier (SUMO) modifications and transcription. *Biochem Soc Trans*. **35**, 1405-8. Rev.

**Papoulas O, Beek S, Moseley S, Mc Callum C, Sarte M, Shearn A, Tamkun J.** (1998) The Drosophila trithorax group proteins BRM, ASH1 and ASH2 are subunits of distinct protein complexes. *Development* **125**, 3955-3966.

**Pichler, A., Gast, A., Seeler, J.S., Dejean, A., Melchior, F.** (2002). The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell* **108**, 109-120.

**Pungaliya, P, Kulkarni, D, Park, H.J., Marshall, H, Zheng, H, Lackland, H, Saleem, A, Rubin, E.** (2007) TOPORS Functions As A SUMO-1 E3 Ligase for Chromatin-Modifying Proteins. *J. Prot. Res.* **6**, 3918-3923.

**Reinke, H., Horz, W.** (2003). Histones are first hyperacetylated and then lose contact with the activated PHO5 promoter. *Mol. Cell*. **11**, 1599-1607.

**Reisman, D.N., Strobeck, M.W., Betz, B.L., Sciarrotta, J., Funkhouser, Jr W, Murchardt C, Yaniv M, Sherman LS, Knudsen ES, Weissman BE.** (2002) Concomitant downregulation of BRM and BRG1 in human tumor cell lines: differential effects on RB-mediated growth arrest vs. CD44 expression. *Oncogene* **21**, 1196-1207.

**Reisman DN, Sciarrotta J, Wang W, Funkhouser WK, Weissman BE.** (2003) Loss of BRG1/BRM in human lung cancer cell lines and primary lung cancers: correlation with poor prognosis. *Cancer Res.* **63**, 560-566.

**Roberts C, Orkin S.** (2004) The SWI/SNF complex-chromatin and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 133-142

**Rodríguez, M.S., Dargemont, C, Hay, R.T.** (2001) SUMO-1 conjugation *in vivo* requires both a consensus modification motif and nuclear targeting. *J. Biol. Chem.* **276**, 12654-12659.

**Saitoh, H. Hinchey, J.** (2000). Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *J. Biol. Chem.* **275**, 6252-6258.

**Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.** (1989) Molecular Cloning. Laboratory Manual. 2<sup>da</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

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

**Schmidt D, Müller S.** (2002) Members of the PIAS family act as SUMO ligases for c-Jun and p53 and repress p53 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 2872-7.

**Seufert, W., Futcher, B., Jentsch, S.** (1995). Role of ubiquitin-conjugating enzyme in degradation of S- and M-phase cyclins. *Nature* **373**, 78-81.

**Sharma, M, Li X, Wang Y, Zarnegar M, Huang CY, Palvimo JJ, Lim B, Sun Z.** (2003). hZimp10 is an androgen receptor co-activator and forms a complex with SUMO-1 at replication foci. *EMBO J.* **22**, 6101-14.

**Sif, S., Saurin, A.J., Imbalzano, A.N., Kingston, R.E.** (2001) Purification and characterization of mSin3A-containing Brg1 and hBrm chromatin remodeling complexes. *Genes Dev* **15**: 603-618

**Spradling, A. C.** (1987). P element-mediated transformation. In: Drosophila a practical approach, (ed. D.B. Roberts), 175-197. Oxford, Washington D.C.: IRL Press.

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

**Tatham, M.H., Jaffray, E., Vaughan, O.A., Desterro, J.M., Botting, C.H., Naismith, J.H., Hay, R.T.** (2001). Polymeric chains of Sumo-2 and Sumo-3 are conjugated to protein substrates by Sae1/Sae2 and Ubc9. *J. Biol. Chem.* **276**, 35368-35374.

**Vázquez, M., Moore, L. and Kennison, J. A.** (1999). The trithorax-group gene *osa* encodes an ARID-domain protein that interacts with the Brahma chromatin-remodeling factor to regulate transcription. *Development* **126**, 733 -742.

**Vázquez, M., Cooper, M.T., Zurita, M., Kennison, J.A.** (2008) gammaTub23C interacts genetically with Brahma chromatin-remodeling complexes in Drosophila *melanogaster*. *Genetics* **180**, 835-43.

**Versteeg, I., Sévenet, N., Lange, J., Rousseau-Merck, M.F., Ambros, P., Handgretinger, R., Aurias, A., Delattre, O.** (1998) Truncating mutations of hSNF5/INI1 in aggressive paediatric cancer. *Nature* **394**, 203–206.

**Vignali, M., Hassan, A. H., Neely, K. E. and Workman, J. L.** (2000) ATP-dependent chromatin remodeling complexes. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 1899 -1910.

**Wong, A.K., Shanahan, F., Chen, Y., Lian, L., Ha, P., Hendricks, K., Ghaffari, S., Iliev, D., Penn, B., Woodland, A.M., Smith, R., Salada, G., Carillo, A., Laity, K., Gupte, J., Swedlund, B., Tavigian, S.V., Teng, D.H., Lees, E.** (2000) BRG1, a component of the SWI-SNF complex, is mutated in multiple human tumor cell lines. *Cancer Res* **60**, 6171–6177.

**Yamamichi, N., Yamamichi-Nishina, M., Mizutani, T., Watanabe, H., Minoguchi, S., Kobayashi, N., Kimura, S., Ito, T., Yahagi, N., Ichinose, M., Omata, M., Iba, H.** (2005). The Brm gene suppressed at the post-transcriptional level in various human cell lines is inducible by transient HDAC inhibitor treatment, which exhibits antioncogenic potential. *Oncogene* **24**, 5471–5481.

**Zhao J.** (2007) Sumoylation regulates diverse biological processes. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**, 3017-33.