



IBt UNAM

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**



**Localización de la proteína del grupo trithorax, TnaA, en
glándulas salivales y en cromosomas politénicos de larvas de
tercer estadio de *Drosophila melanogaster*.**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
PRESENTA
BIOL. RAFAEL ALEJANDRO JUÁREZ URIBE**

**TUTOR
DRA. MARTHA VÁZQUEZ LASLOP**

Cuernavaca, Morelos a 18 de octubre de 2010



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.

**A MIS PADRES Y HERMANO
CON AMOR.**

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
La Expresión de Genes del Desarrollo en <i>Drosophila</i>	3
La sumoilación.....	8
ANTECEDENTES	11
HIPÓTESIS	14
OBJETIVO GENERAL	15
OBJETIVOS PARTICULARES	15
1. Establecer si la "carnada" BD-TnaA puede ser utilizada en un ensayo de dos híbridos.....	15
2. Establecer las condiciones para que las líneas de moscas transgénicas expresen proteínas TnaA etiquetadas molecularmente con FLAG.	15
3. Purificación de anticuerpos anti-TnaA _{NH3} y anti-TnaA _{XSPRING}	16
4. Localización de TnaA en glándulas salivales y en cromosomas politénicos utilizando anticuerpos anti-TnaA y/o anti-FLAG en fondos silvestre y transgénicos.....	16
Esquema General.....	17
MATERIALES Y MÉTODOS	18
1. Pruebas para establecer la viabilidad de BD-tnaA como "carnada" para el ensayo de dos híbridos.....	18
a) Preparación de células de levadura competentes (método LiAc).....	18
b) Transformación de levadura con el plásmido de fusión pGBKT7.....	19
c) Prueba para activación de la transcripción por la proteína de fusión BD-TnaA.....	20
d) Ensayo en solución Z/X-gal.....	20
e) Prueba de toxicidad para la proteína de fusión BD-TnaA.....	21
2. purificación de anticuerpos por afinidad con proteínas de fusión a GST.....	22
a) Obtención de proteínas de fusión a GST.....	22
b) Purificación de anticuerpos por cromatografía de afinidad utilizando resina de glutatión reducido (Método 1).....	23
c) Purificación de anticuerpos por cromatografía de afinidad con glutatión sefarosa (método 2).....	25
3. Inmunotinción de glándulas salivales y cromosomas politénicos.....	26
a) Preadsorción del anti-suero.....	26
b) Cultivo de <i>D. melanogaster</i> para obtener larvas de 3 ^{er} estadio.....	27
c) Inmunotinción de glándulas salivales.....	27
d) "Squash" y "semi-squash" de cromosomas politénicos.....	28
e) Inmunotinción de cromosomas politénicos.....	29
4.- Extracción de proteínas de <i>D. melanogaster</i> . y ensayo tipo Western.....	30
a) Extracción de proteínas de individuos de diferentes etapas de desarrollo de <i>D. melanogaster</i>	30
c) Extracción de proteínas de glándulas salivales.....	31
d) Análisis tipo Western	31
RESULTADOS	33
1.-Determinación de la capacidad de la proteína de fusión BD-TnaA para ser utilizada como "carnada" para un ensayo de dos híbridos.....	33

a) Prueba de toxicidad para TnaA-BD.....	35
b) Prueba de activación de la transcripción para TnaA-BD.....	35
2.- Establecimiento de líneas de moscas transgénicas que expresen proteínas TnaA etiquetadas molecularmente con FLAG.....	38
a) Expresión ectópica de TnaA-FLAG y FLAG-TnaA en moscas transgénicas	38
b) Expresión de TnaA-FLAG y FLAG-TnaA en glándulas salivales de larvas de 3 ^{er} instar.....	41
3. Purificación de anticuerpos anti-TnaA _{NH3} y anti-TnaA _{XSPRING}	46
a) Purificación de anti-TnaA _{NH3} por afinidad a la proteína de fusión GST-TnaA _{NH3}	47
b) Purificación de los anticuerpos anti-TnaA _{XSPRING} y elusión de la proteína GST-TnaA _{XSPRING} de la resina de glutatión sefarosa.....	49
4.- Inmuntinción de cromosomas politénicos y glandulas salivales de larvas de 3 ^{er} estadio.....	53
a) Presencia de TnaA-FLAG en cromosomas politénicos.....	53
b) Ensayo de competencia del anticuerpo anti-TnaA _{XSPRING} en cromosomas politénicos.....	55
c) Localización de TnaA en glándulas salivales.....	58
d) Presencia de TnaA en eucromatina de cromosomas politénicos silvestres.....	66
e) TnaA colocaliza con Osa en cromosomas politénicos silvestres.....	69
5.- Búsqueda consenso de unión a SUMO en TnaA y en proteínas con las que posiblemente interaccione.....	71
DISCUSIÓN	73
Solubilización del dominio XSPRING.....	74
TnaA como activador transcripcional. Dominios ricos en glutamina	75
TnaA como activador transcripcional. La sumoilación	76
La sumoilación y sus efectos en transcripción.....	76
TnaA en la cromatina interfásica.....	78
La sumoilación y la expresión de los genes homeóticos.....	81
CONCLUSIONES	84
Perspectivas	84
ANEXO	85
1.- Presencia de tnaA durante el desarrollo de <i>D. melanogaster</i>	85
2.- Prueba de proteólisis de la proteína GST-TnaA _{XSPRING} con trombina.....	86
REFERENCIAS	91

FIGURAS

Figura.1- Ciclo de vida de <i>D. melanogaster</i>	3
Figura 2. Cascada de regulación genética en el desarrollo de <i>D. melanogaster</i>	5
Figura 3. Acción de los complejos formados por proteínas trithorax y Polycomb.....	6
Figura 4. Los complejos Brahma: BAP y PBAP.....	7
Figura. 5. Vía de conjugación de SUMO.....	9
Figura 6. Las proteínas Tonalli en <i>D. melanogaster</i>	12
Figura 7. Expresión de mRNA de <i>tna</i> en el desarrollo de <i>D. melanogaster</i>	13
Figura 8. Las proteínas Tonalli en diferentes estadios del desarrollo de <i>D. melanogaster</i>	14
Figura 9. Principio teórico del ensayo de dos híbridos.....	34
Figura 10. La proteína de fusión BD-TnaA activa la expresión	

del gen reportero <i>MEL1</i>	36
Figura 11. La proteína de fusión BD-TnaA activa la expresión del gen reportero <i>lacZ</i>	37
Figura 12. Esquema del funcionamiento del sistema UAS-GAL4 en <i>D. melanogaster</i> para TnaA-FLAG.....	40
Figura 13. Expresión de TnaA-FLAG en glándulas salivales de líneas transgénicas de <i>D. melanogaster</i>	43
Figura 14. Expresión de FLAG-TnaA en glándulas salivales de líneas transgénicas de <i>D. melanogaster</i>	44
Figura 15. Expresión de FLAG-TnaA en glándulas salivales de líneas transgénicas de <i>D. melanogaster</i>	45
Figura 16. Ensayo tipo Western de los anticuerpos anti-TnaA _{NH3} purificados por afinidad en extractos de <i>E. coli</i> y de <i>D. melanogaster</i>	48
Figura 17. Purificación por afinidad del anticuerpo anti-TnaA _{XSPRING}	59
Figura 18. Prueba de anticuerpos anti-GST-TnaA _{XSPRING} purificados.....	50
Figura 19. Elusión de GST-TnaA _{XSPRING} con glicina-HCl 0.1 M pH 2.5.....	52
Figura 20. Presencia de TnaA-FLAG en cromosomas politénicos de la línea TnaA-FLAG 8.3.....	54
Figura 21. Ensayo de competencia del anticuerpo anti-GST-TnaA _{XSPRING}	56
Figura 22. Inmunotinción de TnaA en cromosomas politénicos compitiendo el anticuerpo anti-TnaA _{XSPRING}	57
Figura 23. Localización de TnaA en glándulas salivales de larvas de 3er instar silvestres.....	59
Figura 24. Localización de TnaA en glándulas salivales de la línea transgénica TnaA-FLAG.....	61
Figura 25. Localización de TnaA en glándulas salivales de la línea FLAG-TnaA.....	62
Figura 26. TnaA endógeno no se detecta con el anticuerpo anti-TnaA _{XSPRING} en glándulas salivales silvestres.....	63
Figura 27. Localización de TnaA en núcleos de glándula salivales de la línea TnaA-FLAG.....	64
Figura 28. Distribución de TnaA en células aisladas de glándulas salivales de las líneas TnaA-FLAG y silvestre.....	65
Figura 29. Localización de TnaA endógeno en los cromosomas politénicos de la línea silvestre.....	66
Figura 30. Localización de TnaA en cromosomas politénicos de la línea TnaA-FLAG.....	68
Figura 31. Colocalización de TnaA y Osa en cromosomas politénicos de la línea silvestre.....	70
Figura 32. Las proteínas Tna en diferentes estadios del desarrollo de <i>D. melanogaster</i>	85
Figura 33. Obtención de TnaA _{XSPRING} por procesamiento con trombina de la proteína de fusión GST-TnaA _{XSPRING}	87
Figura 34. Ensayo de obtención de GST-TnaA _{XSPRING} con trombina por corte de la proteína GST-TnaA _{XSPRING} en diferentes buffers.....	88
Figura 35. Análisis de procesamiento de GST-TnaA _{XSPRING} con trombina.....	89

TABLAS

Tabla 1. La expresión ectópica de las formas de TnaA etiquetadas molecularmente es letal.....	40
Tabla 2. La expresión en glándulas salivales de las formas de TnaA etiquetadas molecularmente no es letal.....	42
Tabla 3. Secuencias de unión covalente y no covalente de TnaA y de algunas de las proteínas cuyos genes interaccionan con <i>tna</i>	72

INTRODUCCIÓN

La Expresión de Genes del Desarrollo en *Drosophila*.

Drosophila melanogaster (*D. melanogaster*) se considera un modelo experimental ideal para el estudio genético y molecular de un gran número de procesos biológicos. Su ciclo de vida dura de 10 a 14 días dependiendo de la temperatura y consta de: 16 estadios embrionarios donde ocurre la celularización, la gastrulación y donde se forman las capas dérmicas; tres estadios larvarios en los cuales se identifican los discos imagales; el estadio de pupa donde ocurre la metamorfosis; y finalmente el estadio adulto (Fig. 1). Durante el tercer estadio larvario, *D. melanogaster* presenta unas estructuras llamadas glándulas salivales, en donde se encuentran células con cromosomas politénicos, en las cuales el DNA se replica varias veces (hasta 1024) sin separación de las cromátidas. El patrón de bandas que presenta cada cromosoma es único y característico para cada uno de ellos (Demakov *et al.*, 2004).

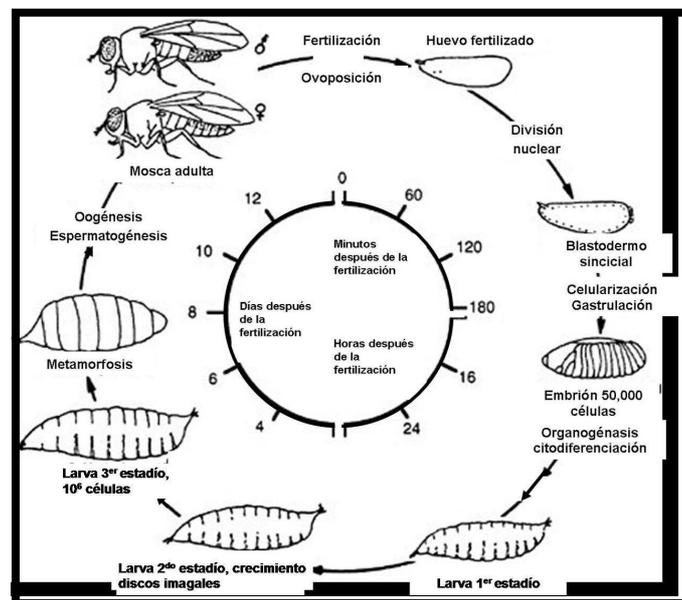


Figura.1- Ciclo de vida de *D. melanogaster*. El huevo después de ser fertilizado y ovopositado, pasa por los estadios embrionarios; larva de 1^{er}, 2^{do} y 3^{er} estadio; pupa, donde sufre metamorfosis para finalmente dar origen a la mosca adulta. (Modificado de *Scientific Frontiers in Developmental Toxicology and Risk Assessment*, 2000).

A lo largo del desarrollo de *D. melanogaster* existe una jerarquía y regulación de la expresión genética. Al inicio, en el folículo, las células nodrizas depositan en el oocito

proteínas y RNA, los cuales son productos de los “genes maternos”. Tales productos forman gradientes de concentración pues los RNAs tienen una localización restringida mientras que las proteínas pueden difundir mejor (morfógenos). Esto hace que el citoplasma no sea homogéneo, lo cual da una primera polaridad al embrión. En el siguiente nivel de la cascada se encuentran los genes de segmentación, los cuales determinan el número y la organización general de los segmentos corporales. Tales genes se han dividido en tres grupos: los genes “gap”, los genes de la regla par y los genes de polaridad de segmento. La acción de los genes “gap” divide al embrión en regiones grandes, vistas como bandas transversales, y éstos a su vez activan la expresión de los siguientes genes en la cascada: los genes de la regla par y los genes homeóticos. Los genes de la regla par controlan segmentos pares (uno de cada dos) y comienzan a determinar la naturaleza de éstos. La acción de los genes “gap” y la de los genes de la regla par activan la expresión de los genes de polaridad de segmento, que definen los límites y la polaridad de los segmentos. La acción conjunta de los genes de segmentación modula la expresión de los genes homeóticos (Gilbert, 2000). Los genes homeóticos se encargan de determinar la identidad de cada segmento del cuerpo y se encuentran agrupados en dos complejos: el complejo Antennapedia que incluye los genes *Antennapedia (Antp)*, *Sex comb reduced (Scr)*, *Deformed (Dfd)*, *proboscipedia (pb)* y *labial (lab)* (revisado en Kaufman *et al.*, 1990); y el complejo bithorax que está formado por los genes *Ultrabithorax (Ubx)*, *abdominal-A (abd-A)* y *Abdominal-B (Abd-B)* (revisado en Busturia *et al.*, 1989). Para un desarrollo correcto, los genes homeóticos deben ser expresados dentro de sus dominios normales y silenciados fuera de éstos (Fig. 2).

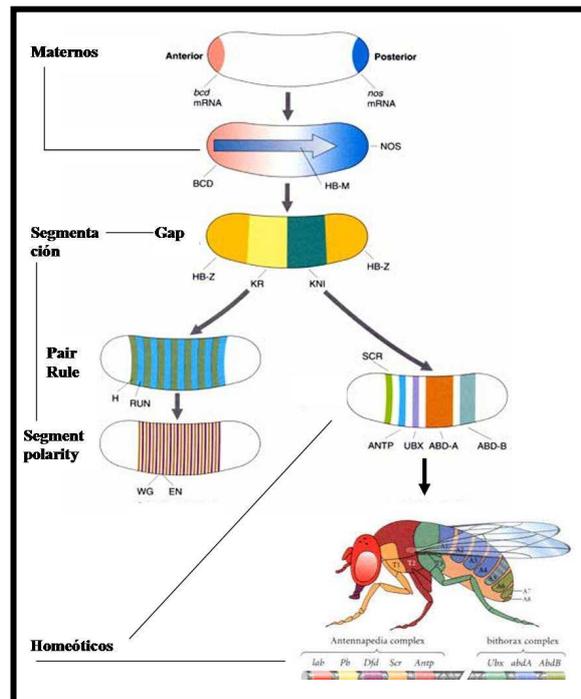


Figura 2. Cascada de regulación genética en el desarrollo de *D. melanogaster*. Los genes maternos; los genes de segmentación: genes “gap”, genes de la regla par y genes de polaridad de segmento; y los genes homeóticos, agrupados en el complejo Antennapedia (*lab*, *pb*, *Dfd*, *Scr* y *Antp*) y el complejo bithorax (*Ubx*, *abd-A* y *Abd-B*) (modificado de Gilbert, 2000).

Pocas horas después de que los patrones de expresión de los genes homeóticos son establecidos, la expresión de los genes de segmentación decae. A pesar de esto, los patrones de expresión persisten debido a la acción de los genes del grupo trithorax (*trxG*) y los genes del grupo Polycomb (*PcG*).

Los genes del *trxG* se definen como genes requeridos para el mantenimiento de la expresión de los genes homeóticos. Por el contrario, los genes del *PcG* son genes requeridos para el mantenimiento del silenciamiento de los genes homeóticos. Muchas proteínas del *trxG* y del *PcG* son capaces de formar complejos multiméricos implicados en fenómenos epigenéticos. Dichos complejos reconocen secuencias de DNA conocidas como TREs y PREs (“trithorax and Polycomb Response Elements”) y pueden actuar en la remodelación de la cromatina o en el marcaje de histonas (revisado en Grimaud *et al.*, 2006), lo cual favorece o no, la accesibilidad de la maquinaria de transcripción a sus secuencias blanco (Fig. 3).

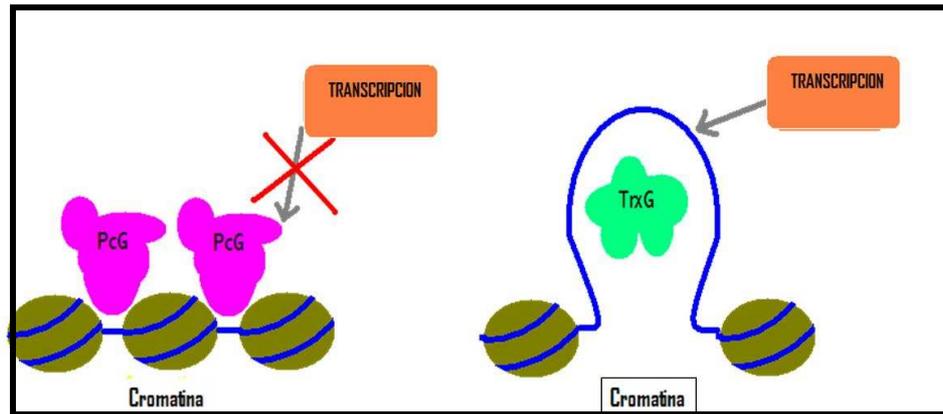


Figura 3. Acción de los complejos formados por proteínas trithorax y Polycomb. Algunas proteínas del trxG permiten la accesibilidad de la maquinaria de transcripción. Algunas proteínas del PcG mantienen la inaccesibilidad de la maquinaria de transcripción.

Drosophila presenta un complejo remodelador de la cromatina de la familia SWI/SNF llamado Brahma (BRM). Se ha sugerido que dicho complejo se requiere para la transcripción de la mayoría de los genes transcritos por la RNA polimerasa II, pues se ha observado una reducción en los niveles de RNA polimerasa II en cromosomas politénicos cuando hay pérdida de la función del complejo BRM (Armstrong *et al.*, 2002). Del complejo BRM se han purificado dos tipos o subfamilias: el complejo BAP y el complejo PBAP. En ambos complejos la proteína Brahma cumple la función de ATPasa. El complejo BAP se define por la presencia de Osa, mientras que el complejo PBAP por la presencia de Polybromo, BAP170 y SAYP (Chalkley *et al.*, 2008) (Fig. 4). Ambos complejos muestran patrones de distribución similares en cromosomas politénicos, predominando su asociación con regiones de cromatina “abierta” hiperacetilada.

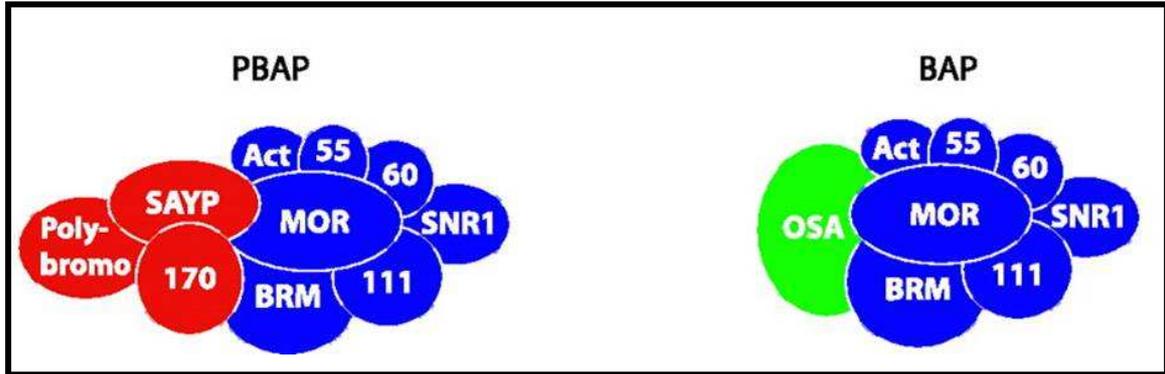


Figura 4. Los complejos Brahma: BAP y PBAP. Ambos complejos comparten las subunidades BAP111, Actina, BAP60, Snr1, BAP55, MOR y la ATPasa Brahma. BAP contiene a OSA. PBAP contiene a BAP170, PB y SAMP (tomado de Chalkley *et al.*, 2008).

La proteína del grupo trithorax Kismet-L (KIS-L) es un miembro de la familia CHD de factores remodeladores de la cromatina que juegan un papel global en la transcripción por RNA polimerasa II. KIS-L actúa reclutando a P-TEFb (“Positive Transcription Elongation Factor b”) río-abajo para estimular la elongación por la RNA polimerasa II. Diversos experimentos sugieren que KIS-L también contrarresta la represión del grupo Polycomb al reclutar a otros complejos del *trxG* con actividad de metiltransferasa de histonas conocidos como TRX y ASH1 (Srinivasan *et al.*, 2008).

Otro complejo involucrado en la expresión genética y que contiene subunidades codificadas por genes del *trxG* es el complejo Mediador, el cual transduce señales entre activadores específicos y factores basales de la transcripción. Dicho complejo consta de al menos 20 subunidades, entre las cuales se encuentran las proteínas del *trxG*: MED12 (Trap 230) y MED13 (Trap240) codificadas en *Drosophila* respectivamente por los genes trithorax *kohtalo*, (*kto*) y *skuld* (*skd*) (Kennison y Tamkun, 1988).

La Sumoilación.

La sumoilación es una modificación postraduccional, donde la proteína SUMO se une a sus blancos de forma covalente (en determinadas lisinas) y en algunos casos también de forma no-covalente. La unión no-covalente de SUMO es mediada por la presencia de un dominio SIM (“SUMO-interacting motif”), el cual consiste de un dominio central hidrofóbico “V/I-X-V/I-V/I” (X = cualquier a.a.) flanqueado por residuos de aminoácidos acídicos, cuya estructura tridimensional forma un péptido extendido el cual interacciona hidrofobicamente con láminas- β y α -hélices de SUMO, las cuales forman un canal (revisado en Kerscher, 2007). Para la unión covalente se requiere de la presencia de cuatro enzimas principales: la E1 activadora, la E2 conjugante, la E3 ligasa e isopeptidasas específicas de SUMO. Para que SUMO se una a su blanco, se requiere que éste sea cortado hacia su carboxilo terminal por una isopeptidasa de SUMO, conocida como SENP (homóloga de la familia Ulp). La proteína SUMO en *Drosophila* (Smt3) es cercanamente relacionada a su homóloga en vertebrados SUMO-2/3 (73% de identidad) y es expresada a todo lo largo del desarrollo, siendo más abundante durante la embriogénesis y en adultos hembras. En el preblastodermo del embrión se acumulan por herencia materna, altos niveles de la proteína y del transcrito *smt3* que se distribuyen uniformemente durante las etapas de blastodermo celular y de la gastrulación. Inicialmente la proteína se acumula en el citoplasma y rápidamente pasa hacia el núcleo, donde se localiza en un patrón punteado. Por otro lado, el transcrito se acumula preferencialmente en el sistema nervioso central y en las gónadas. En el núcleo interfásico, SUMO se acumula en los cromosomas politénicos (Capelson y Corces, 2006) y durante la mitosis se redistribuye en el citoplasma y se localiza en la región media celular durante la citocinesis (revisado en Talamillo *et al.*, 2008b).

Posteriormente es necesaria la presencia del heterodímero Aos1/Uba2 que es la enzima E1 activadora y una enzima E2 conjugante Ubc9. Las E3 ligasas que son las enzimas más variadas de la vía, junto con las proteasas SENP, aportan la especificidad en el reconocimiento de los blancos (Hilgarth *et al.*, 2004; Bossis y Melchior, 2006) (Fig. 5).

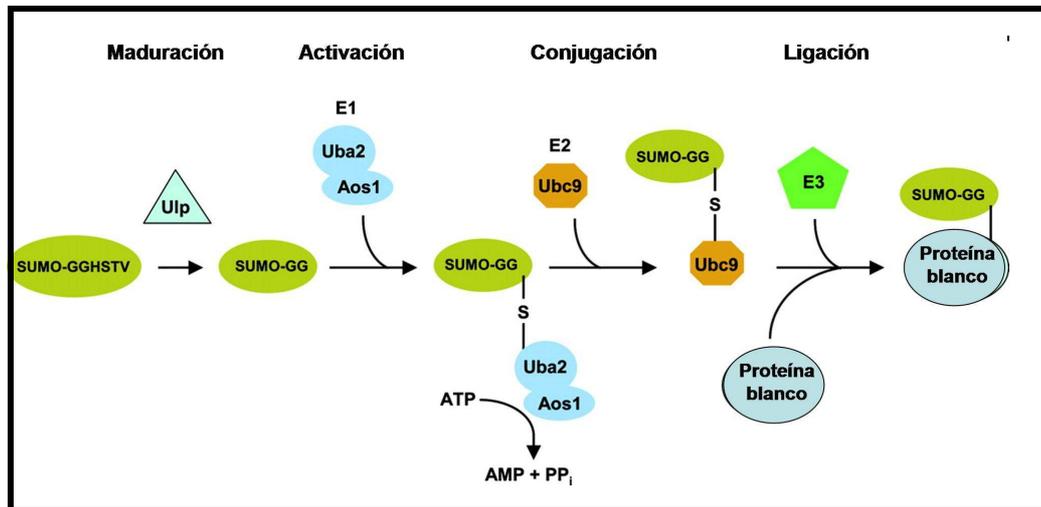


Figura. 5. Vía de conjugación de SUMO. SUMO madura al ser cortado por una proteasa de SUMO. El siguiente paso, es la activación de forma ATP-dependiente por conjugación con la subunidad Uba2 del heterodímero E1 activador Aos1/Uba2. Después de la activación, SUMO es transferido a la enzima E2 conjugante Ubc9. En el paso final SUMO es transferido en una reacción de ligación a sus proteínas sustrato formando una unión isopeptídica entre la glicina terminal de SUMO y el grupo amino de la lisina en la proteína blanco. Esta reacción es auxiliada por la proteína E3 ligasa de SUMO, la cual puede interactuar directamente con la E2 o la proteína blanco (modificado de Hilgarth, 2004).

Se han descrito tres tipos de E3 ligasas de SUMO: 1) las proteínas que contienen un dominio SP-RING; 2) el representado por la proteína RanBP2/Nup358, la cual es componente del poro nuclear; y 3) el representado por la proteína Polycomb Pc2. Las E3 ligasas de SUMO que contienen un SP-RING, forman un gran grupo que puede ser a su vez subdividido en otros tres. El primero consiste de la familia de proteínas PIAS, también conocida como proteínas Siz de levadura. Los miembros de esta familia comparten un dominio NH₃ terminal conservado de ~400 aminoácidos adicional al SP-RING. Otro grupo incluye a MMS21 (también conocida como NSE2), que es una proteína que forma parte de un complejo octamérico SMC5-SMC6 (“Structural Maintenance of Chromosomes”) el cual es esencial para la división celular, la reparación del DNA, y para un mecanismo de elongación de telómero independiente de

telomerasa en células cancerosas. Un último grupo es el representado por la proteína Zip3, la cual es parte de un complejo de iniciación de la sinapsis cromosómica. Se ha observado que el dominio SP-RING es esencial para la función de sumoilación y se predice que éste forma una estructura similar al dominio RING de ubiquitin-ligasas. Las SP-RING ligasas unen directamente a Ubc9 y a sus blancos, y se unen a SUMO no-covalentemente vía un dominio SIM. Por lo tanto, este tipo de E3 ligasas debe funcionar como plataforma para colocar el blanco y a la Ubc9-tioéster-cargada en una posición favorable para la transferencia de SUMO (revisado en Geiss-Friedlander y Melchior, 2007).

En *D. melanogaster* se ha encontrado que el gen de la familia PIAS (dPIAS) llamado *Su(var)2-10* contiene también un dedo de zinc del tipo SP-RING (Hochstrasser 2001). Los análisis moleculares de *Su(var)2-10* demostraron que produce al menos seis diferentes transcritos por "splicing" alternativo, de los cuales se predicen como mínimo cuatro productos proteicos. Dichas proteínas SU(VAR)2-10 se han localizado predominantemente en la región perinuclear de células interfásicas de larvas de 3^{er} estadio. También se ha observado su presencia en extractos nucleares y citoplásmicos de embriones de 0 a 12 h (Hari *et al.*, 2001). SU(VAR)2-10 se ha implicado en el mantenimiento de la estructura cromosómica y en la herencia cromosómica. Algunas combinaciones de mutantes para *su(var)2-10* mueren en estadios larvarios tardíos o como pupas tempranas, y presentan tumores melanóticos (revisado en Talamillo *et al.*, 2008b).

Se ha observado que las E3 ligasas facilitan la sumoilación de sus proteínas blanco *in vitro*, particularmente en presencia de niveles bajos de la enzima conjugante. Se ha propuesto que las enzimas E3 ligasas permiten el reconocimiento de Ubc9 por los

distintos sitios de unión de SUMO presentes en las proteínas blanco (Melchior *et al.*, 2003). La mayoría de las proteínas sumoiladas presenta una secuencia consenso Ψ KXE (Ψ -hidrofóbico; X-cualquiera), la cual es reconocida por la enzima E2. Un análisis mostró que las proteínas en el proteoma completo de *Drosophila* contienen un promedio de 0.76 sitios consenso de posible conjugación de SUMO por proteína, es decir, que tres de cada cuatro proteínas contienen un dominio consenso de sumoilación (Nie *et al.*, 2009). Por otro lado, ya que no todas las proteínas que son sumoiladas presentan la secuencia consenso, probablemente existan otros mecanismos para reclutar a SUMO, como por ejemplo la presencia del dominio SIM (revisado en Meulmeester y Melchior, 2008). Dentro de la gran cantidad de proteínas blanco de la sumoilación podemos encontrar factores de transcripción, proteínas involucradas en la transducción de señales y en la remodelación de la cromatina, enzimas o proteínas virales, ribonucleoproteínas involucradas en el metabolismo del mRNA, entre otras. Se ha propuesto que la sumoilación puede modificar la interacción entre proteínas o entre proteínas y el DNA, la localización subcelular, así como la actividad y/o la estabilidad de sus blancos.

ANTECEDENTES

El gen *tonalli* (*tna*) se identificó, entre otros, como un gen que interacciona genéticamente con *brahma* (*brm*), que es el gen que codifica para la subunidad ATPasa de los complejos Brm. En *Drosophila*, los individuos que contienen mutaciones en *tna* y en *brm* tienen un fenotipo de extensión de alas, resultado de una mala regulación en uno de los dos promotores del gen homeótico *Antp* (Vázquez *et al.*, 1999; Gutiérrez *et al.*, 2003).

las enzimas E3 ligasas permiten el reconocimiento de Ubc9 por los distintos sitios de unión de SUMO presentes en las proteínas blanco (Melchior *et al.*, 2003). La mayoría de las proteínas sumoiladas presenta una secuencia consenso Ψ KXE (Ψ -hidrofóbico; X-cualquiera), la cual es reconocida por la enzima E2. Un análisis mostró que las proteínas en el proteoma completo de *Drosophila* contienen un promedio de 0.76 sitios consenso de posible conjugación de SUMO por proteína, es decir, que tres de cada cuatro proteínas contienen un dominio consenso de sumoilación (Nie *et al.*, 2009). Por otro lado, ya que no todas las proteínas que son sumoiladas presentan la secuencia consenso, probablemente existan otros mecanismos para reclutar a SUMO, como por ejemplo la presencia del dominio SIM (revisado en Meulmeester y Melchior, 2008). Dentro de la gran cantidad de proteínas blanco de la sumoilación podemos encontrar factores de transcripción, proteínas involucradas en la transducción de señales y en la remodelación de la cromatina, enzimas o proteínas virales, ribonucleoproteínas involucradas en el metabolismo del mRNA, entre otras. Se ha propuesto que la sumoilación puede modificar la interacción entre proteínas o entre proteínas y el DNA, la localización subcelular, así como la actividad y/o la estabilidad de sus blancos.

ANTECEDENTES

El gen *tonalli* (*tna*) se identificó, entre otros, como un gen que interacciona genéticamente con *brahma* (*brm*), que es el gen que codifica para la subunidad ATPasa de los complejos Brm. En *Drosophila*, los individuos que contienen mutaciones en *tna* y en *brm* tienen un fenotipo de extensión de alas, resultado de una mala regulación en uno de los dos promotores del gen homeótico *Antp* (Vázquez *et al.*, 1999; Gutiérrez *et al.*, 2003).

tna es considerado un gen del *trxG* porque suprime los fenotipos de pérdida de función de genes del PcG y aumenta el efecto de las mutaciones de pérdida de función en genes del *trxG* como por ejemplo *snr1* (*snr1*), *moira* (*moi*), *osa* (*osa*) y *kismet* (*kis*), que codifican para subunidades de complejos remodeladores de cromatina. *tna* es indispensable para la expresión de varios genes homeóticos como son *Antp*, *Ubx*, *Scr* y *abdB*.

tna codifica, en teoría, por lo menos para dos isoformas TnaA y TnaB. TnaA posee un dominio SP-RING que es la firma que caracteriza a un tipo de E3 ligasas de SUMO. A diferencia de TnaB, TnaA posee además del SP-RING una señal de localización nuclear (NLS) (Fig. 6).

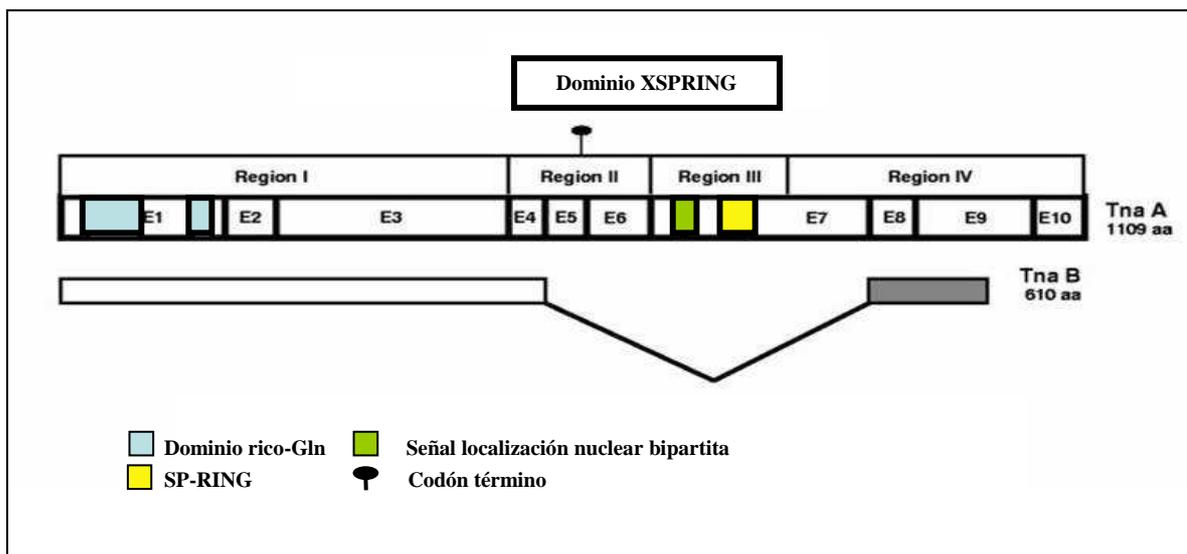


Figura 6. Las proteínas Tonalli en *D. melanogaster*. TnaA (1109 aa) presenta un dominio XSPRING, el cual a su vez contiene al SP-RING (amarillo) y una señal de localización bipartita (verde). TnaB (610 aa) y TnaA comparten un dominio rico en glutamina (azul) (modificado de Gutiérrez *et al.*, 2003).

El estudio de la expresión de *tna* a lo largo del desarrollo reveló que en los primeros estadios embrionarios se detecta un transcrito de 6.1 kb (*tnaA*) que se mantiene hasta las etapas adultas; a partir del tercer estadio larvario aparece un segundo transcrito de 4.2 kb (*tnaB*), el cual también prevalece hasta la etapa adulta (Fig. 7) (Gutiérrez *et al.*,

2003). El análisis de expresión de *tna* por microarreglos, mostró que hay una reducción de su expresión en tejidos reproductivos (tracto reproductivo) de hembras después del apareamiento (Mack *et al.*, 2006), también se induce su expresión en estadios tardíos de la celularización embrionaria, y se expresa diferencialmente en la región de la cabeza del embrión (revisado en Talamillo *et al.*, 2008b). Los análisis genéticos mostraron que la falta de la(s) proteína(s) Tna es letal en estadios post-embrionarios (Gutiérrez *et al.*, 2003). Lo anterior muestra que la función de *tna* se requiere en diferentes estadios del desarrollo de *D. melanogaster*, lo que hace importante el estudio de esta(s) proteína(s) en las diferentes etapas del desarrollo.

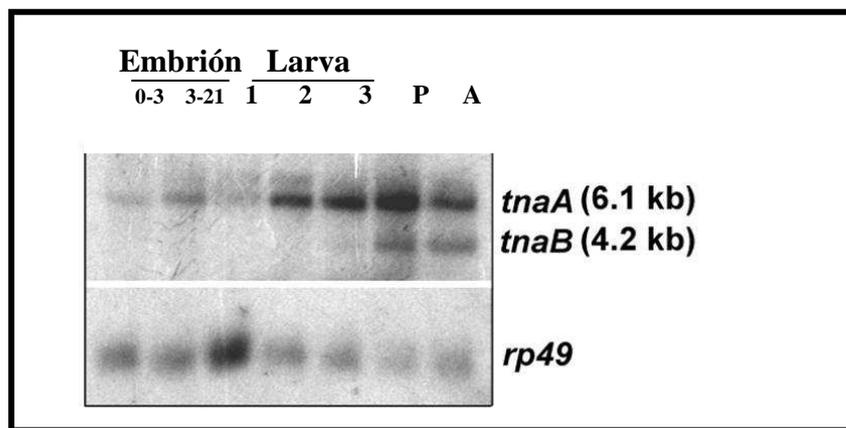


Figura 7. Expresión de mRNA de *tna* en el desarrollo de *D. melanogaster*. Por la técnica de Northern se observa que hay transcritos de *tnaA* a todo lo largo del desarrollo: RNA poliA⁺ de embrión de 0-3 y 3-21 h, de los tres estadios larvarios, de pupa y de adulto. Los transcritos de *tnaB* se presentan a partir de larva de 3^{er} estadio hasta adulto. Control de carga: mRNA de la proteína ribosomal Rp49. El probador es un cDNA que contiene la región codificante de *tnaA* (tomado de Gutiérrez *et al.*, 2003).

Con el interés de reconocer y discriminar a TnaA y a TnaB en diferentes ambientes y condiciones, así como para estudiar el papel de los diferentes dominios de dichas proteínas, se obtuvieron las proteínas de fusión: GST-TnaA_{NH₃}, GST-TnaA_{XSPRING} y GST-TnaA_{COO} (L. M. Gutiérrez y M. Vázquez). Estas proteínas de fusión se purificaron por afinidad y se produjeron anticuerpos policlonales contra cada una de ellas mediante un proceso de inmunización en ratas (R. A. Juárez-Uribe, Tesis de Licenciatura 2007). Estos anticuerpos anti-GST-TnaA_{NH₃} y anti- GST-TnaA_{COO} pueden reconocer y diferenciar a TnaA y TnaB, mientras que el anti- GST-TnaA_{XSPRING} sólo reconocería a

TnaA. Utilizando extractos de diferentes estadios del desarrollo de *D. melanogaster* y los anticuerpos policlonales, hemos detectado por experimentos de tipo Western a las probables proteínas TnaA y TnaB (Fig. 8).

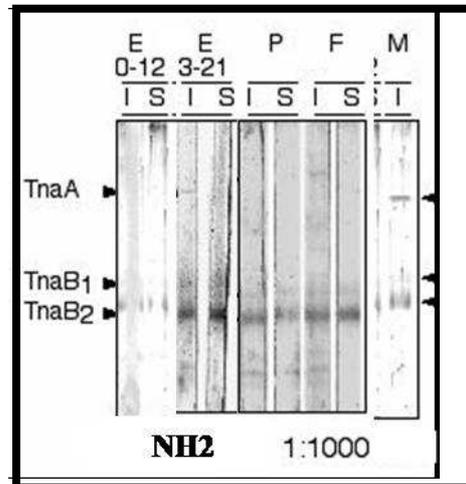


Figura 8. Las proteínas Tonalli en diferentes estadios del desarrollo de *D. melanogaster*. Por la técnica de Western en extractos protéicos solubles (S) (mayoritariamente fracción citoplásmica) e insolubles (I) (mayoritariamente fracción nuclear) se muestran los estadios de embrión (E) de 0-12 y 3-21 h, pupa (P), faratos (F) y macho adulto (M). El anticuerpo anti-GST-TnaANH₃ (NH₂) se utilizó en una dilución 1:1000. TnaA se observa en las fracciones de embrión 3-21 h insoluble, faratos insoluble y macho adulto insoluble. Se observan dos formas cortas (TnaB₁ y TnaB₂), donde TnaB₂ podría ser TnaB y TnaB₁ una forma modificada de la misma.

HIPÓTESIS.

Dado que TnaA puede ser una E3 ligasa de SUMO que se requiere para la expresión de los genes homeóticos y debido a que interacciona genéticamente con componentes de complejos remodeladores de la cromatina y con subunidades del complejo Mediador, es probable que su localización subcelular funcional sea similar a la de las proteína(s) implicada(s) en sumoilación y/o a la de algún(os) componente(s) de la vía de conjugación

anti-GST-TnaA_{NH₃} y anti- GST-TnaA_{COO} pueden reconocer y diferenciar a TnaA y TnaB, mientras que el anti- GST-TnaA_{XSPRING} sólo reconocería a TnaA. Utilizando extractos de diferentes estadios del desarrollo de *D. melanogaster* y los anticuerpos policlonales, hemos detectado por experimentos de tipo Western a las probables proteínas TnaA y TnaB (Fig. 8).

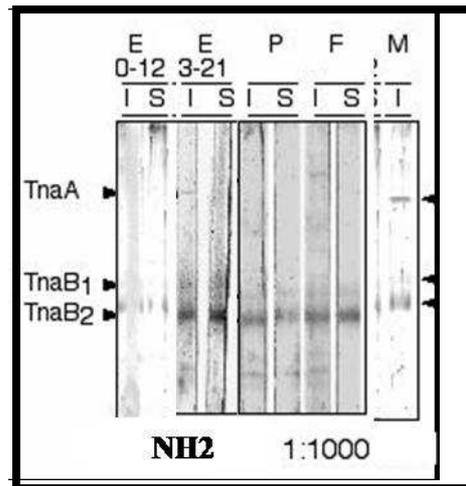


Figura 8. Las proteínas Tonalli en diferentes estadios del desarrollo de *D. melanogaster*. Por la técnica de Western en extractos proteicos solubles (S) (mayoritariamente fracción citoplásmica) e insolubles (I) (mayoritariamente fracción nuclear) se muestran los estadios de embrión (E) de 0-12 y 3-21 h, pupa (P), faratos (F) y macho adulto (M). El anticuerpo anti-GST-TnaA_{NH₃} (NH2) se utilizó en una dilución 1:1000. TnaA se observa en las fracciones de embrión 3-21 h insoluble, faratos insoluble y macho adulto insoluble. Se observan dos formas cortas (TnaB₁ y TnaB₂), donde TnaB₂ podría ser TnaB y TnaB₁ una forma modificada de la misma.

HIPÓTESIS.

Dado que TnaA puede ser una E3 ligasa de SUMO que se requiere para la expresión de los genes homeóticos y debido a que interacciona genéticamente con componentes de complejos remodeladores de la cromatina y con subunidades del complejo Mediador, es probable que su localización subcelular funcional sea similar a la de las proteína(s) implicada(s) en sumoilación y/o a la de algún(os) componente(s) de la vía de conjugación de SUMO y/o a la de alguna(s) proteína(s) involucrada(s) en la transcripción de los genes homeóticos y que interaccione físicamente con alguna de estas proteínas.

OBJETIVO GENERAL

Generar y mejorar herramientas para estudiar a TnaA bioquímicamente y determinar si TnaA está presente en los cromosomas politénicos de larvas de 3er instar de *D. melanogaster* silvestre y en líneas transgénicas con TnaA etiquetada con FLAG.

OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Establecer si la "carnada" BD-TnaA puede ser utilizada en un ensayo de dos híbridos

a) Determinar si TnaA fusionado al dominio BD (“DNA Binding Domain”) de GAL4 es o no tóxico en levadura. Esto se llevará a cabo probando el crecimiento de levaduras que expresen la proteína de fusión a partir del plásmido pGBKT7-BD-TnaA.

b) Determinar si TnaA fusionado al dominio BD es capaz de activar la transcripción

de genes reporteros de levadura propios del ensayo de dos híbridos.

2. Establecer las condiciones para que las líneas de moscas transgénicas expresen proteínas TnaA etiquetadas molecularmente con FLAG.

Dado que los transgenes FLAG-TnaA y TnaA-FLAG están construidos bajo el sistema

de expresión GAL4/UAS:

a) Generar diferentes genotipos a través de cruces de Genética clásica para probar diferentes “drivers” que expresan GAL4 en diferentes etapas y tejidos.

b) Monitorear por ensayos tipo Western la expresión de las versiones etiquetadas de TnaA en individuos de los genotipos apropiados con los anticuerpos anti-FLAG en extractos proteicos de los tejidos y/o estadios apropiados.

3. Purificación de anticuerpos anti-GST-TnaA_{NH3} y anti-GST-TnaA_{XSPRING}

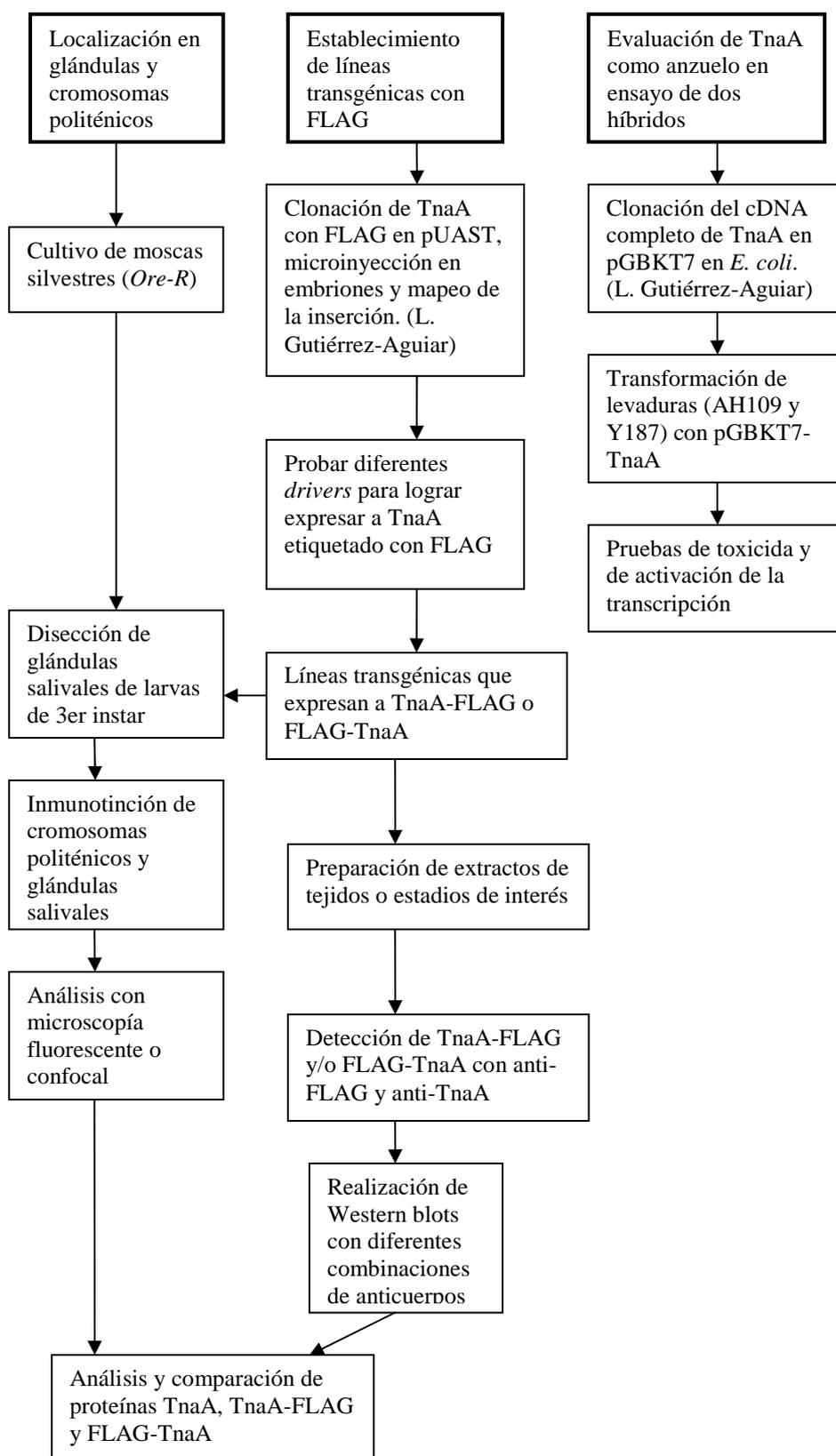
a) Purificación de los anticuerpos anti-TnaA (anti-GST-TnaA_{NH3} y anti-GST-TnaA_{XSPRING}) por afinidad. Se utilizará el método de purificación por afinidad uniendo los anticuerpos a las proteínas de fusión correspondientes inmovilizadas en resinas de Affigel (BioRad).

4. Localización de TnaA en glándulas salivales y en cromosomas politénicos utilizando

anticuerpos anti-TnaA y/o anti-FLAG en fondos silvestre y transgénicos.

- a) Determinar si los anticuerpos contra TnaA y contra FLAG son funcionales para ensayos de inmunotinción de cromosomas politénicos.
- b) Realizar inmunotinciones de glándulas salivales completas de líneas silvestre y transgénicas utilizando anticuerpos anti-TnaA y/o anti-FLAG con anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforos.
- c) Realizar inmunotinciones de cromosomas politénicos de líneas silvestre y transgénicas utilizando anticuerpos anti-TnaA y/o anti-FLAG con anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforos.
- d) Analizar las preparaciones en microscopía de fluorescencia o confocal.

Esquema general



MATERIALES Y MÉTODOS.

1.- Pruebas para establecer la viabilidad de BD-tnaA como “carnada” para el ensayo de dos híbridos.

Para la sección correspondiente a la evaluación de la "carnada" BD-TnaA para el ensayo de dos híbridos (incisos a, b, c, d y e) se utilizaron tanto el manual como las cepas y anexos proporcionadas por el "kit" de construcción y análisis de biblioteca (BD Biosciences PT3529-1 y PT3024-1). La cepa W303 fue proporcionada amablemente por el laboratorio del Dr. Nieto.

a) Preparación de células de levadura competentes (método LiAc).

Se siembran platos de agar YPDA con las líneas de levadura Y187 y/o AH109. Posteriormente se incuban a 30°C hasta que las colonias aparezcan (de 3-6 días). Se inocula con una de las colonias más grandes (de 2-3 mm de diámetro) 3 ml de YPD en un tubo estéril. Se incuba a 30°C con agitación de 250-270 rpm por 12 h. Posteriormente se inocula con este cultivo a 50 ml de YPD en un matraz de 250 ml hasta alcanzar 0.3 DO₆₀₀. Posteriormente se incuba a 30°C con agitación de 230 a 250 rpm hasta alcanzar 0.5 DO₆₀₀ (aproximadamente 2-3 h). Se divide el cultivo en dos y se centrifuga a 1000 rpm por 10 min a temperatura ambiente.

Línea	AH109	Y187	W303
Genotipo	<i>MATa, trp1-901, leu2-3,112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1_{UAS}⁻, GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}⁻, GL2_{TATA}-ADE2, URA3::MEL1_{UAS}⁻, MEL1_{TATA}-lacZ, MEL1</i>	<i>MATa, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4Δ, met⁻, gal80Δ, URA3::GAL1_{UAS}⁻, GAL1_{TATA}-lacZ, MEL1</i>	<i>leu2-3,112, his3-11,15, ura3-1, trp1-1</i>

Se descarta el sobrenadante y se resuspenden las células en un mismo volumen de H₂O bidestilada estéril. Se centrifuga en las mismas condiciones. Se descarta el sobrenadante y las células se resuspenden en 3 ml de la solución 1.1 TE/LiAc (1.5 ml por tubo). Se centrifugan los tubos a 13000 rpm por 15 s a temperatura ambiente. Se descarta el sobrenadante y nuevamente se resuspende cada tubo en 600 µl de la solución 1.1 TE/LiAc (para mayor eficiencia de transformación se recomienda utilizar las células en no más de 1 h).

b) Transformación de levadura con el plásmido de fusión pGBKT7.

Se toma un tubo estéril y se agregan: 50 µl de células de levadura competentes (inciso a), 250 ng del plásmido pGBKT7, 5 µl del acarreador de DNA desnaturalizado (10mg/ml) y 500 µl de la solución PEG/LiAc. Se mezcla vortexeando suavemente. Se incuba 30 min a 30°C y se agita suavemente cada 10 min. Se agregan 20 µl de DMSO, se mezcla y se coloca en un baño a 42°C por 15 min con agitación cada 5 min. Se centrifuga a 13000 rpm por 15 min a temperatura ambiente. Se descarta el sobrenadante y se resuspende en 1 ml de YPDA 2X. Se incuba 90 min a 30°C. Se centrifuga a 13000 rpm por 15 s a temperatura ambiente. Se descarta el sobrenadante y se resuspende en 1 ml de la solución NaCl 0.9% por pipeteo.

YPD y YPDA	1.1 TE/LiAc (5ml)
-20 g peptona Difco -10 g extracto de levadura -20 g agar (para platos) - Aforar a 950 ml con H ₂ O *Esterilizar autoclave -50 ml glucosa 40% (al momento de usar) -30 mg Adenina (para YPDA)	-550 µl TE (10X) -550 µl LiAc 1M (10X) -3.9 ml H ₂ O estéril

Se siembra en medios SD/-Trp selectivos para la complementación *trp*⁺ la cual es conferida por el plásmido pGBKT7. Se incuban a 30°C durante 4-8 días. Este método también se utiliza para transformación con el vector pGBKT7-BD-TnaA.

c) Prueba para activación de la transcripción por la proteína de fusión BD-TnaA.

Se transforma (inciso “b”) la línea AH109 tanto con el vector vacío pGBKT7 (control negativo) como con pGBKT7-BD-TnaA. Ambas transformantes se siembran en placas con los medios: SD/-Trp, SD/-Trp/X-α-Gal, SD/-His/-Trp/X-α-Gal, SD/-Ade/-Trp/X-α-Gal. Se realiza también el ensayo con solución-Z/X-gal (inciso “d”). Se incuban a 30°C durante 4-8 días. Se analizan los resultados observando el crecimiento y coloración de las colonias. Para el caso de la prueba con el medio SD/-Trp/X-α-Gal, se colocan las transformantes controles positivo (P53/SV40) y negativo (Lam/SV40) proporcionados por el "kit".

d) Ensayo en solución Z/X-gal.

Se toma un fragmento de papel Whatman estéril del tamaño y forma adecuada. Se humedece por inmersión en solución Z/X-gal. Se toma otro trozo de papel Whatman estéril

PEG/LiAc (3.75ml)	NaCl 0.9% (25ml)
<ul style="list-style-type: none"> - 3 ml PEG 50% - 375 µl TE (10X) - 375 µl LiAc 1M (10X) 	<ul style="list-style-type: none"> - 225 mg NaCl - 25 ml H₂O <p>*Esterilizar autoclave</p>

y seco, con ayuda de pinzas estériles se coloca sobre las colonias frescas a probar (crecimiento en placa) hasta que éstas se adhieran al papel. Posteriormente, se separa el papel de la placa y se sumerge en nitrógeno líquido por 10 s. Se descongela el papel a temperatura ambiente. Una vez descongelado y seco, en una caja Petri estéril, se coloca sobre el papel previamente humedecido, evitando burbujas de aire entre ellos y procurando mantener las colonias hacia arriba. Se incuba a 30°C. Se analizan las cajas periódicamente hasta un máximo de 96 h, observando el desarrollo de coloración azul.

e) Prueba de toxicidad para la proteína de fusión BD-TnaA.

Se agregan 3 ml de SD/-Trp a tres tubos para cultivo. A cada tubo se le trata de la siguiente manera: el primero se deja tal cual (control de contaminación); el segundo se inocula con una cepa que contenga el plásmido a probar (vector utilizado + proteína de interés); y el tercero con una cepa con el vector utilizado vacío. Se incuban a 30°C en agitación (250-270 rpm) por 12 h. Se inoculan dos matraces con 50 ml de SD/-Trp/Kan (20µg/ml) con los precultivos. Se incuban en las mismas condiciones por 24 h. Se analizan los cultivos en espectrofotómetro a DO₆₀₀ comparando las mediciones.

Solución Z/X-gal	
- 100 ml solución Z - 1.67 ml solución X-gal - 0.27 ml β-mercaptoetanol	
Solución Z	Solución X-gal (1 ml)
- 4.025 gr Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O - 1.374 gr NaH ₂ PO ₄ - 0.187 gr KCl - 61.5 mg MgSO ₄ * pH 7. Esterilizar en autoclave	- 20 mg X-GAL - 1 ml DMF (N,N-dimetilformamida). * Almacenar en oscuridad a 20°C

2. Purificación de anticuerpos por afinidad con proteínas de fusión a GST.

a) Obtención de proteínas de fusión a GST.

Se inoculan 6 ml de medio LB-Amp con la cepa que expresa la proteína de fusión con GST. Se incuba a 37°C por 12-16 h (precultivo). Este precultivo se agrega a un matraz con 294 ml de LB-Amp, para obtener un volumen de cultivo de 300 ml. Nuevamente se incuba con agitación a 37°C aproximadamente 2 h (cultivo), hasta alcanzar 0.5 DO_{600nm}. Se agrega IPTG 0.4 mM (isopropil β-D-tiogalactósido) a un cultivo con 0.5 DO_{600nm}. Se incuba con agitación a 37°C por 2 h y se vierte en un tubo estéril. Se centrifuga a 10,000 rpm durante 15 min a 4°C, se descarta el sobrenadante y se conserva la pastilla (se puede guardar a -20°C). Se resuspende la pastilla en 12 ml de STE frío, correspondientes a un 4% del volumen de cultivo (300 ml). Se agrega lisozima 1%, se agita suavemente y se dejar reposar 15 min en hielo. Se adiciona DTT 5 mM ("stock" de STE con DTT 10%). Hasta este punto se tiene el volumen intermedio. Se agrega sarcosil 4% ("stock" STE con N-lauroilsarcosil 10%). Se sonica con cuatro pulsos de 45 s a intervalos de 1 min con una amplitud de 35%, manteniendo la muestra en hielo durante los pulsos, y se dejar reposar 1 h a 4°C. Se adiciona Tritón X-100 10.66% (porcentaje con respecto al volumen intermedio), se agita y nuevamente se deja reposar 1 h a 4°C. Se agrega 0.1% del volumen de cultivo de perlas glutatión-sefarosa 4B (marca Amersham) (ver inciso "c).1") y se deja en agitación 1h a temperatura ambiente. Previamente las perlas se lavan siete veces con PBS, con la finalidad de hidratarlas y eliminar el conservador de origen. Posteriormente, el lisado con perlas se centrifuga 5

STE	Solución de elusión
-Tris 10mM -NaCl 150mM -EDTA 1mM -pH 8.0	-Glutatión reducido 15mM -Hepes 50mM (solvente)

min a 3000 rpm, se tira el sobrenadante cuidadosamente y se conservan las perlas sedimentadas. Para realizar el “primer lavado” se agrega PBS hasta alcanzar un volumen igual al anterior (antes de tirar el sobrenadante), se agita 10 min a temperatura ambiente, se centrifuga a 3000 rpm por 5 min y se tira el sobrenadante. Este procedimiento se repite dos veces más, para constituir el “segundo y tercer lavado”. Después de los lavados, se agrega un volumen de solución de elusión igual al volumen de perlas, se agita 10 min a temperatura ambiente, se centrifuga 5 min a 3000 rpm y se guarda el sobrenadante a -20°C. Estas eluciones deben repetirse hasta que la mayoría de la proteína de fusión se haya liberado de las perlas, lo cual se determina por SDS-PAGE.

b) Purificación de anticuerpos por cromatografía de afinidad utilizando resina de glutatión reducido (Método 1).

La proteína de fusión unida a la resina de glutatión-sefarosa se lava tres veces con 3 ml de la solución "wash-crosslinking". Se descarta el sobrenadante por centrifugación a 500 g por 10 min. Se toman 5 µl de la resina como muestra, para monitoreo. Se agregan 2 ml de solución “crosslinking” fría y se deja incubando 60 min con agitación a 4°C. Posteriormente se centrifuga 2 min a 500 g y se descarta el sobrenadante. Se agregan 2 ml de etanolamina 200 mM por 30 min. Se centrifuga dos min a 500 g. Se adicionan 2 ml de solución “wash-crosslinking” y se transfiere la resina a las columnas de purificación. Se toman 5 µl de la resina como muestra, para monitoreo. Se lava la resina dos veces con 2 ml de la solución de glicina para elusión, con la finalidad de remover uniones no covalentes. Se lava la resina nuevamente dos veces con 3 ml de TBSA-azida (0.05% azida de sodio). En este punto la resina puede ser guardada a 4°C hasta que se

use. Para la preparación de ligando y unión a la resina se toman 600 µl del suero a purificar y se diluyen 1:1 con TBSA. Posteriormente se pasan por un filtro de 0.2 µm. Se añade el suero filtrado a la columna con la resina y se deja incubando 30 min, durante este tiempo la columna se debe recargar 5 veces con el sobrante eluido. Se lava la columna con 5 volúmenes de TBSA. Se lava la columna con 5 volúmenes de solución de lavado. Se lava la columna nuevamente con 5 volúmenes de TBSA. Para eluir los anticuerpos se añaden 2 ml (o menos) de la “Solución de glicina para elusión”. Se colectan las elusiones en fracciones de 500 µl en tubos eppendorf que contengan 50 µl de Tris 2 M (pH 8.5). Se lava la columna con 10 volúmenes de TBSA. Se lava la columna con 5 volúmenes de TBSA y se guarda a 4°C para su posterior reutilización.

Solución “wash-crosslinking”	Solución “crosslinking”	Solución glicina para elusión	TBSA	Solución lavado
-200mM HEPES -pH 8.5	-20mM DMP -En solución “wash-crosslinking”	-150 mM de NaCl -200mM de glicina-HCl -pH 2.0	-25mM tris -150mM NaCl	-500mM NaCl -20mM tris -0.1% triton -pH 7.4

c) Purificación de anticuerpos por cromatografía de afinidad con glutatión sefarosa (método 2) (basado en Bar-Peled y Raikhel, 1996).

Una vez que se tienen unidos 5 mg de proteína de fusión a glutatión-sefarosa, se dan cinco lavados de 5 min con solución de lisis 0.5 % Tritón X-100. Posteriormente se dan dos lavados de 5 min con 10 ml de borato-NaOH 0.2 M pH 8.6, se centrifuga 5 min a 500 g a 4°C y se descarta el sobrenadante. Se añaden 2 ml de solución DMP fría por mililitro de resina unida (DMP 20 mM final) y se incuba en agitación 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifuga dos minutos a 500 g a 4°C y se descarta el sobrenadante. Se

agregan 10 ml de etanolamina-HCl 0.2 M pH 8.2 y se incuba en ligera agitación por una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se lava la resina dos veces con 2 ml de glicina-HCl 0.1 M pH 2.5. Se agregan 10 ml de TBSB frío y se agita 5 min. Posteriormente se monta la resina en una columna para cromatografía y se eluye el exceso de TBSB. Se toman 5 µl de la resina para monitoreo. Si se desea almacenar la columna a 4°C se agrega 0.02 % de azida de sodio. A 40 mg de suero crudo (aprox. 1 ml) se agrega el mismo volumen de TBSB (1:1 v/v) y se centrifuga 15 min a 12,000 g a 4°C. Se toman 5 µl para monitoreo. El sobrenadante se agrega a las perlas, se cierra la columna y se incuba en agitación 4 h a 4°C. Posteriormente se eluye el sobrenadante de la columna, esta fracción eluida se pasa dos veces más por la columna. Se toman 5 µl para monitoreo. Se dan cinco lavados de cinco minutos con TBSB frío. Se dan dos lavados con TBSB 0.1 X. Los anticuerpos se eluyen agregando ≥ 1 ml de glicina-HCl

Solución de lisis	Solución DMP	TBSB
20mM HEPES NaOH pH7.5 1mM EDTA 150mM NaCl Inhibidor de proteasas	2ml Trietanolamina 0.2M pH 8.3 15.5mg DMP (dimetilpimelimidato)	20 mM de Tris-HCl pH 7 150mM NaCl

0.1 M pH 2.5 y se colectan fracciones de 300 μ l en tubos que contengan 9 μ l de Tris 2 M pH 8.5 y se almacenan a -20°C . Se toman 5 μ l para monitoreo. Para regenerar la resina se incuba en fosfato 0.1 M pH 12 por cinco minutos y se lava con TBSB. Se realiza el análisis de la purificación utilizando los muestreos y las fracciones obtenidas utilizando el espectrofotómetro, SDS-PAGE y análisis tipo Western.

3. Inmunotinción de glándulas salivales y cromosomas politénicos.

a) Preadsorción del anti-suero (basado en Sullivan *et al.*, 2000).

Se realiza una colecta de embriones de 0-3 hr y se lavan con PBS frío. Si se desea, se pueden almacenar a -70°C . Los embriones se decorionan 1-3 min en hipoclorito de sodio 2.5% (ó 50% blanqueador Clorox) y se fijan en paraformaldehido 4% y en PBS-n-heptano (concentración 1:1 v/v), se agita vigorosamente 15 s y se deja reposar por 20 min. Se remueve el paraformaldehido-PBS sin remover los embriones. Se lava tres veces con metanol 100% con agitación vigorosa por 10 s y 1 min de reposo (los embriones desvitelinizados precipitan) hasta remover el heptano de la fase superior (primeros dos lavados en vial de centelleo y último en tubo eppendorf). Se pueden almacenar en metanol 100% a -70°C (o a 4°C por un día). Se dan tres lavados con PBST (0.3% Tritón X100 en PBS) estéril de 10 min c/u y se deja reposar 30 min a temperatura ambiente. Se retira el exceso de PBST. Se agrega el antisuero diluido 1/10 en PBS con 0.1% de azida de sodio, se incuban tres volúmenes de esta solución con un volumen de los embriones fijados. Se incuban TN (toda la noche) a 4°C . Se almacenan a 4°C por un año.

b) Cultivo de *D. melanogaster* para obtener larvas de 3^{er} estadio.

Se siembra una población de moscas adultas (aproximadamente 30 moscas por botella), de la línea apropiada, en mínimo tres botellas de cultivo con medio de piloncillo. Se incuban a 25°C. Al pasar tres días, se retiran los individuos adultos. Se permite el desarrollo en el tiempo necesario para que se alcance el estadio que se desea coleccionar, en este caso, para coleccionar larvas de 3^{er} estadio, la colecta se realiza a los seis días.

c) Inmunotinción de glándulas salivales (basado en Bettinger *et al.*, 1996).

Se disecan al menos 15 pares de glándulas salivales de larvas de 3^{er} estadio en PBS frío con inhibidores de proteasas. Se hace un recambio de PBS. Se lava rápidamente con agua bidestilada. Las glándulas se fijan incubando con agitación leve en solución de fijación Ruvkun 1X con formaldehído 2% durante 3.5 h a 4°C. Se lava con solución Tris/Tritón. Se incuban en Tris/Tritón/1% β-mercaptoetanol por 4 h a 37°C con agitación leve. Se lava con solución BO₃ y se incuban en solución BO₃/10 mM DTT a 37°C con agitación leve por 15 min. Se lava nuevamente con solución BO₃. Se incuban en solución “B” por 30 min a temperatura ambiente con agitación leve. Las larvas fueron almacenadas en solución “A” (solución “A” = solución “B” con 1% BSA) a 4°C. Se incuban las glándulas con el anti-suero preadsorbido disuelto en solución “A” (dilución 1:500) y se incuban TN a 4°C con agitación leve. Se dan 5-7 lavados de 30 min

Sol. Ruvkun 2X	Sol. Tris/Tritón	Sol. BO₃	Sol. “B”	Sol. “H”
160 mM KCl 40 mM NaCl 20 mM EGTA 10 mM- espermidina 30 mM PIPES- pH 7.4 50% metanol	100 mM Tris pH 7.4 1% tritón X100 1 mM EDTA	0.01 M H ₃ BO ₃ pH 9.2 0.01 M NaOH	PBS 0.1% BSA 0.5% Tritón X100 0.05% azida de sodio 1 mM EDTA	750 mM KCl 500 mM Tris- HCl pH 7.5 30 mM MgCl ₂

con solución “B”. Las glándulas se incuban con el anticuerpo secundario en solución “A” (dilución 1:200) por 3.5-4 h. Se dan dos lavados de 30 min con solución “C” (solución “C” = solución “B” sin EDTA). Se incuban en solución “C” con 100 μ M RNAsa y 10% (v/v) solución “H” por una hora a 37°C con agitación leve. Se incuban con Sytox 0.01 μ M por 10 min a temperatura ambiente. Se dan 5-7 lavados de 30 min con solución “B” y uno final con PBS. Se montan en Citifluor (TED PELLA INC.) y se observan en microscopía de fluorescencia y/o confocal.

d) “Squash” y “semi-squash” de cromosomas politénicos. (basado en Sullivan *et al.*, 2000 y Corona *et al.*, 2004).

Se cubren los porta-objetos con poli-L-lisina (tres veces) y se dejan secar 30 min, si se desea se guardan a 4°C. Se cubren los cubre-objetos en la solución Sigmacote (SIGMA) y se dejan secar a temperatura ambiente. Posteriormente se enjuagan los cubre-objetos con etanol absoluto y se dejan secar. Se disecan las glándulas salivales de larvas de 3^{er} estadio y se limpian y mantienen en NaCl 0.7%. Se sumergen las glándulas 10 seg en la Solución-1. Inmediatamente se sumergen 2 min en la Solución-2. Se colocan dos pares de glándulas salivales (por muestra) sobre el porta-objetos. Se separan o dividen utilizando el cubre-objetos, el cual posteriormente se coloca encima. El cubre-objetos se desliza varias veces hacia lados contrarios haciendo ligera presión y dando unos golpes suaves para romper y disgregar los cromosomas (técnica “squash”). Posteriormente se observa en el microscopio y se analiza la calidad de la preparación. Inmediatamente después se congela la preparación en nitrógeno líquido, se remueve el cubre-objetos y se almacenan en metanol absoluto a 4°C. Para realizar la técnica de “semi-squash” se realiza el mismo protocolo de “squash” pero en lugar de golpear para romper los

núcleos, solo se presiona ligeramente con el pulgar, de forma que solo se aplanen los núcleos.

e) Inmunotinción de cromosomas politénicos (basado en Sullivan *et al.*, 2000 y Corona *et al.*, 2004)

Posteriormente se hidrata la preparación con tres incubaciones de 15 min en PBS con ligera agitación y con volumen que cubra totalmente el cubre-objetos. Se remueve el PBS y se agrega la solución de bloqueo de politénicos. Se incuba por 2 h con ligera agitación a temperatura ambiente. Se remueve la solución de bloqueo y se agrega el anticuerpo primario (purificado ó preadsorbido) diluido 1:50 en solución de bloqueo politénicos. Se incuba 12 h a 4°C en un recipiente húmedo con agitación leve. Se realizan tres lavados de 15 min con solución de lavado “A” y dos lavados con solución de lavado “B” (sol. lavado “B” = sol. lavado “A” con 400 mM NaCl). Se agrega la solución de bloqueo de politénicos y se incuba por 1 h a temperatura ambiente. Se agrega el anticuerpo secundario acoplado al fluoróforo diluido 1:100 en solución de bloqueo de politénicos y se incuba por 2 h a temperatura ambiente. Se realizan tres lavados de 15 min con solución de lavado “A”.

Solución-1 (500µl)	Solución-2 (500µl)	Sol. lavado “A”
185 µl 10% Paraformaldehido/PBS 5 µl Tritón X-100 310 µl PBS	185 µl 10% Paraformaldehido/H ₂ O 250 µl Ac. Acético 65 µl H ₂ O	PBS 300 mM NaCl 0.2% Tween 0.2% NP40

Se agrega una solución de Sytox (1 µg/ml en PBS) y se incuba 10 min a temperatura ambiente. Se dan dos lavados con solución de lavado “B”. Se monta con Citifluor. Finalmente se observan las preparaciones bajo microscopio de fluorescencia o confocal. En caso de realizar una doble inmunotinción, se repite el procedimiento a partir del paso de incubación con solución de bloqueo y se recorre la incubación con Sytox para el final de la segunda tinción.

4.- Extracción de proteínas de *D. melanogaster* y ensayo tipo Western.

a) Extracción de proteínas de individuos de diferentes etapas de desarrollo de *D. melanogaster*.

Una vez realizada la colecta del estadio de interés, se coloca en un tubo estéril y se pesa. Se recomienda alcanzar mínimamente un gramo de biomasa. Se enjuaga dos veces con PBS frío, con la finalidad de quitar el medio de piloncillo. Se agrega *buffer* de fraccionamiento celular frío, lo necesario para cubrir la colecta. Posteriormente, se homogeniza en hielo, agregando poco a poco *buffer* de fraccionamiento celular, manteniendo finalmente una relación de 1g de biomasa por 5 ml de *buffer*. Al obtener un extracto homogéneo, se agrega

Solución bloqueo politénicos	Medio de piloncillo (1L)	PBS (<i>buffer</i> de sales fosfato) (1L)
1- 0.1% NP40 (o igepal SIGMA) 2- 3% BSA Fracción V 3- En PBS.	-Extracto de levadura – 100g -Piloncillo - 100g -Agar – 16g -Ácido propiónico o Nipagin – 10ml -Grenetina - 10g	-NaCl - 8g -KCl – 0.2g -Na ₂ HPO ₄ – 1.44g -KH ₂ PO ₄ – 0.24g -pH 7.4 -Esterilizar en autoclave

SDS 1% final (*stock* 10%). Se centrifuga 10 min a 4000 rpm y se guarda la fracción insoluble (pastilla) a -20°C. Se centrifuga nuevamente 2 min a 10,000 rpm y se guarda la fracción soluble (sobrenadante) a -20°C. Todo el proceso debe hacerse por debajo de los 4°C, para evitar degradaciones proteicas.

b) Extracción de proteínas de glándulas salivales.

Se realiza una colecta de larvas de 3^{er} estadio. Posteriormente se colocan las larvas una por una en un vidrio de disección el cual contiene NaCl 0.7%. En un pozo del vidrio se enjuaga cada una de las larvas y en otro se realiza la disección de las glándulas salivales. Cada par de glándulas salivales se coloca en "*buffer*" de fraccionamiento celular frío hasta alcanzar 15-20 glándulas por 10 µl de "*buffer*".

c) Análisis tipo Western

Se toma la muestra o extracto de interés y se realiza un SDS-PAGE del porcentaje adecuado para observar las proteínas de interés. Se transfiere de 12-16 h a 80 mA en buffer de transferencia (R. A. Juárez-Uribe, Tesis de Licenciatura 2007). Transcurrido este tiempo, se aumenta a 200 mA por 1 h. Posteriormente, se seca la membrana a temperatura ambiente, se enjuaga con agua bidestilada, se tiñe con reactivo de Ponceau y se lava con agua bidestilada. Se verifica la transferencia de proteínas en la membrana teñida con Ponceau y si es necesario se tiñe el gel con azul de Coomassie para registrar la cantidad y la calidad de las proteínas que no se transfirieron.

La membrana de nitrocelulosa se bloquea 1 h con solución de bloqueo (R. A. Juárez-Uribe, Tesis de Licenciatura 2007). Se llevan a cabo seis lavados de 5 min con TBST (TBS, 0.05% Tween-20) o PBST (PBS, 0.05% Tween-20). La membrana se incuba de 1-2 h con

anticuerpo primario, el cual debe ser diluido en solución de bloqueo. Las diluciones de los anticuerpos que van a ser utilizadas deben establecerse durante la planeación del experimento. Posteriormente, la membrana se lava seis veces (5 min por lavado) con TBST

(o PBST). Se incuba de 1-2 h con anticuerpo secundario “AP-Ig anti-rata” (anti-rata inmunoglobulina acoplada a fosfatasa alcalina), el cual se diluye también en solución de bloqueo. Se realizan cinco lavados de 5 min con TBST (o PBST) y uno final con TBS (o PBS). Si se revela por reacción de fosfatasa alcalina se agrega la solución de revelado, cubriendo totalmente la membrana y protegiendo de la luz durante el proceso. La reacción de revelado se detiene añadiendo agua bidestilada. Si se revela por quimioluminiscencia, se utiliza el "kit" de detección por quimioluminiscencia (GE Healthcare) y las soluciones para autorradiografía (SIGMA).

Si se desea repetir el protocolo de Western en la membrana de nitrocelulosa previamente utilizada, se deben remover los anticuerpos de la misma, para lo cual primero se da un lavado de 10 min con TBS (o PBS) con agitación suave. Se incuba la membrana en solución de *stripping* por 30 min a 50°C con agitación leve. Se dan dos lavados de 5 min con TBS (o PBS) y se repite el protocolo de Western a partir del paso de bloqueo por 1 h.

Buffer de fraccionamiento celular	Solución de <i>stripping</i>
-Sacarosa – 250mM -Tris pH7.5 – 50mM -KCl – 25mM -MgCl ₂ – 5mM -EDTA – 5mM -Agregar inhibidor de proteasas * Siempre agregar al homogeneizado SDS 1% final	- Tris-HCL 62.5 mM (pH 6.8) - SDS 2% - Añadir 70 µl de 2-β-mercaptoetanol por cada 10ml (0.1 M) al momento de utilizarse.

RESULTADOS

1. Determinación de la capacidad de la proteína de fusión BD-TnaA para ser utilizada como "carnada" para un ensayo de dos híbridos.

Existen diferentes técnicas para identificar o comprobar potenciales interacciones físicas proteína-proteína, entre las cuales se encuentran el ensayo de dos híbridos y el ensayo de interacción ("Pull-down"). El principio del ensayo de dos híbridos se basa en la modularidad y flexibilidad de los activadores transcripcionales, es decir, que la función transcripcional de la proteína completa pueda ser restituida por la interacción de los dominios de unión a DNA (BD) y de activación (AD), previamente separados. En el sistema existen dos vectores que contienen proteínas híbridas. En uno de ellos, la secuencia que codifica para el BD de un factor transcripcional conocido (comúnmente GAL4 de levadura) es fusionado a la secuencia de una proteína de estudio conformando la "carnada". Un segundo vector expresa el AD del factor transcripcional fusionado a diversos cDNAs que pertenecen a una biblioteca donde posiblemente estén transcritos para proteínas ("pez") que probablemente interaccionen con la "carnada". Si las levaduras transformadas con los vectores expresan ambos híbridos, y si las porciones pez-carnada de las proteínas quimera interaccionan, se produce un activador transcripcional funcional. La selección y la detección de las proteínas de interacción se realizan utilizando genes reporteros y medios selectivos (Fig. 9).

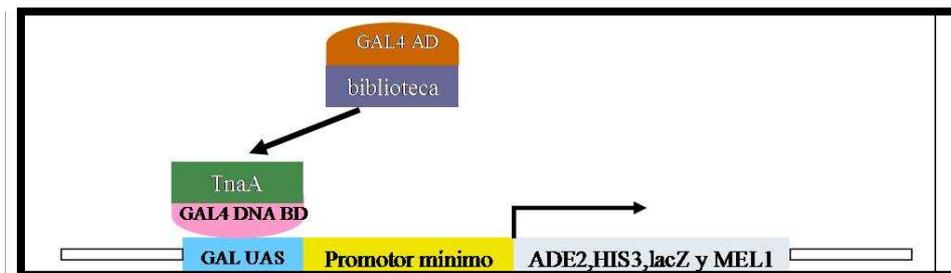


Figura 9. Principio teórico del ensayo de dos híbridos. La interacción entre la porción "carnada" (en este caso TnaA) y la porción "pez" (alguna(s) proteína(s) de la biblioteca) restituye la función del

activador transcripcional (GAL4) lo que permite la expresión de genes reporteros (modificado de BD Biosciences).

Uno de los objetivos del laboratorio es determinar si TnaA es una E3 ligasa de SUMO y para esto es necesario encontrar las proteínas que interaccionen físicamente con TnaA. Por esto nos interesa montar las condiciones para llevar a cabo el ensayo de dos híbridos utilizando como "peces" proteínas de diferentes etapas del desarrollo ó tejidos de *Drosophila*.

Para iniciar el ensayo de dos híbridos es importante realizar varios experimentos control previos para determinar la confiabilidad y viabilidad del ensayo. Parte de estos experimentos son la prueba de toxicidad de la proteína de fusión que se desea usar como "carnada", y otro experimento es el análisis de la capacidad que la "carnada" tiene de activar *per se* la transcripción de los genes reporteros de la interacción con el "pez". Si la "carnada" es tóxica o es capaz de activar la transcripción de los genes reporteros entonces no puede ser utilizada en el ensayo. Inicialmente se produjo la proteína de fusión Gal4DNABD-TnaA (BD=dominio de unión a DNA), ó BD-TnaA en el vector pGBK-T7, con el propósito de ser utilizada como "carnada" en un ensayo de dos híbridos (BD Biosciences).

a) Prueba de toxicidad para TnaA-BD.

El gen que codifica para la proteína de fusión BD-TnaA está contenida en el plásmido pGBKT7 (clonado por L. Gutiérrez-Aguiar, Tesis de Maestría 2010). Este plásmido debe complementar y eliminar la auxotrofia de triptofano de la cepa Y187 (*trp⁻*). La prueba de toxicidad se utiliza para analizar si la proteína "carnada" BD-TnaA, es tóxica para la levadura que la contiene, lo cual afectaría su viabilidad y crecimiento. Tal

experimento consiste en comparar el crecimiento de la cepa (Y187, *trp*⁻) que contiene la "carnada" BD-TnaA con una que sólo tiene el dominio BD de GAL4, en un medio selectivo (SD/-Trp). Encontramos que en medio sólido, la proteína de fusión BD-TnaA no es tóxica para la levadura, pues en ambas cepas se observó un diámetro y densidad similar.

b) Prueba de activación de la transcripción para BD-TnaA.

Para determinar una interacción física confiable en el ensayo de dos híbridos, se deben seleccionar las colonias diploides para los plásmidos que contienen a los "peces" (pGADT7) y los plásmidos que contienen la "carnada" (pGBKT7). Posteriormente la interacción entre "pez"- "carnada" se evalúa con un filtro de marcadores nutricionales y reacciones enzimáticas, conferidas por la expresión de genes reporteros determinados. Por lo tanto, antes de hacer el ensayo de dos híbridos, es necesario hacer un ensayo previo que consiste en una prueba de activación de la transcripción donde se analiza si la "carnada", en este caso, BD-TnaA es capaz, por sí sola, de activar la expresión de los genes reporteros contenidos en la cepa AH109. El primer reportero que se probó fue el gen *MEL1*, el cual codifica para la α -galactosidasa, que al reaccionar con el sustrato X- α -gal produce una coloración azul. Se sembraron por goteo en un medio sólido SD/-Trp/X- α -gal las transformantes AH109/pGBKT7 y AH109/pGBKT7-TnaA. Como control positivo se sembró la cepa diploide AH109/pGBKT7-p53 + pGADT7-RecT, pues se sabe que las proteínas p53 y el fragmento grande del virus SV40 (RecT) interaccionan físicamente. Como control negativo se sembró la cepa diploide AH109/pGBKT7-Lam + pGADT7-RecT, ya que Lam y el fragmento grande de SV40 (RecT) no interaccionan. Posteriormente se incubaron a 30°C por 4-6 días (Fig. 10)

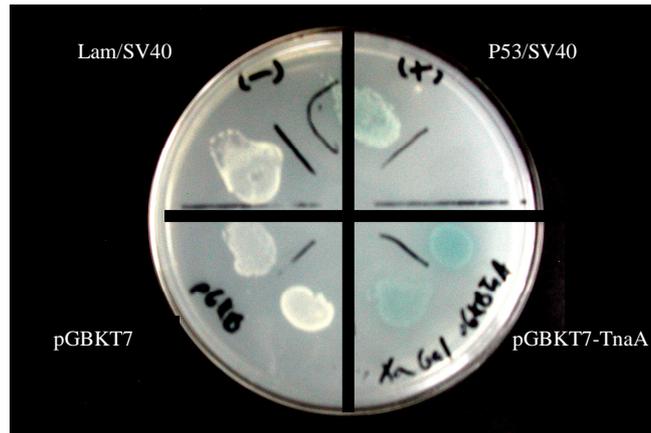


Figura 10. La proteína de fusión BD-TnaA activa la expresión del gen reportero *MEL1*. El control negativo AH109/pGBKT7-Lam + pGADT7-RecT (Lam/SV40) y el control positivo AH109/pGBKT7-p53 + pGADT7-RecT (P53/SV40) se muestran en la parte superior. Las cepas probadas AH109/pGBKT7 (pGBKT7) y AH109/pGBKT7-BD-TnaA se encuentran en la parte inferior.

Como se observa en la Figura 10, las colonias del control negativo (Lam/SV40) son blancas lo cual denota la ausencia de expresión del gen reportero *MEL1*, por el contrario, el control positivo (P53/SV40) tiene una coloración azulada debido a la actividad de la α -galactosidasa codificada por el gen *MEL1* indicando que P53 y SV40 interaccionan para activar su transcripción. La transformante AH109/pGBKT7 (pGBKT7) no presenta actividad del gen *MEL1* (coloración blanca) como se esperaba. La cepa AH109/pGBKT7-BD-TnaA presenta expresión de *MEL1* denotado por su coloración azul incluso más intensa que el control positivo, lo cual indica que la fusión BD-TnaA es capaz de activar la transcripción de *MEL1* en ausencia del dominio de activación (AD) de GAL4.

El siguiente gen reportero probado fue *lacZ*. *lacZ* codifica para la β -galactosidasa, cuya actividad es detectada al adicionar X-gal en el medio, produciendo un color azul. Se realizó el ensayo de actividad (ver Materiales y Métodos) en presencia y en ausencia de la proteína de fusión BD-TnaA. El ensayo consistió en tomar colonias de las transformantes AH109/pGBKT7 y AH109/pGBKT7-TnaA, permeabilizarlas y ponerlas en contacto con el reactivo X-gal y se monitorearon dentro de un rango de 96 h (Fig. 11).

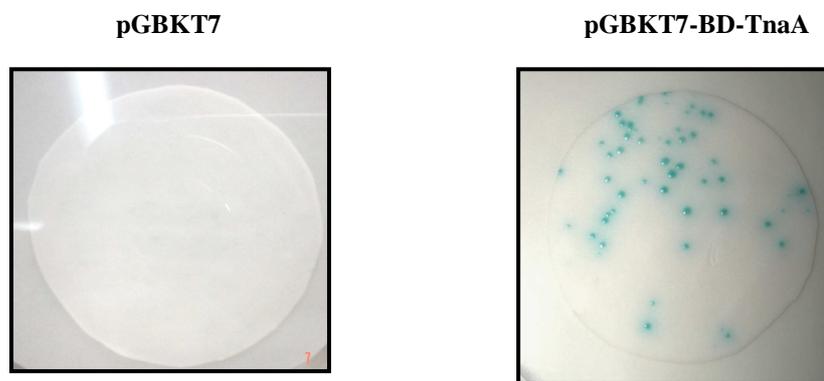


Figura 11. La proteína de fusión BD-TnaA activa la expresión del gen reportero *lacZ*. A la izquierda AH109/pGBKT7 y a la derecha AH109/pGBKT7-BD-TnaA.

En la Figura 11 se aprecia que después de 10 h, en la transformante AH109/pGBKT7 no hay actividad de la β -galactosidasa, observado por la coloración blanca de las colonias (se pierden en el fondo blanco del papel Whatman), en comparación con AH109/pGBKT7-BD-TnaA, en la cual sí hay actividad, denotada por la coloración azul de las colonias. Por tanto, la fusión BD-TnaA es capaz de activar la transcripción de *lacZ* en ausencia del dominio de activación de GAL4.

Para la realización del ensayo de dos híbridos se requiere hacer la selección de las proteínas interaccionantes utilizando los cuatro genes reporteros (*HIS3*, *ADE2*, *lacZ* y *MEL1*). Debido a que encontramos que la proteína de fusión BD-TnaA es capaz de activar la expresión de dos de estos cuatro genes reporteros (*lacZ* y *MEL1*) sin requerir

la presencia de un dominio de activación de GAL4 (AD), se concluyó que esta proteína no puede ser usada como “carnada” en el ensayo de dos híbridos. Por lo tanto, se decidió detener estos experimentos y cambiar la estrategia para abordar otros objetivos del proyecto. Para continuar con el desarrollo de la estrategia de detección de proteínas que interactúan con TnaA por el ensayo de dos híbridos, se deberán probar construcciones que fusionen el dominio BD de GAL4 con diferentes fragmentos de TnaA, los cuales sea incapaces de activar la transcripción, no resultar tóxicos, etc. Una vez seleccionado dicho(s) fragmento(s) es que se puede llevar a cabo el ensayo.

2.- Establecimiento de líneas de moscas transgénicas que expresen proteínas TnaA etiquetadas molecularmente con FLAG.

a) Expresión ectópica de TnaA-FLAG y FLAG-TnaA en moscas transgénicas.

El etiquetamiento molecular de una proteína facilita una variedad de experimentos relacionados al estudio de la interacción y la localización de proteínas de interés. Existen diversas etiquetas moleculares cuyo reconocimiento se puede hacer por medio de anticuerpos comerciales. Entre ellas, la etiqueta FLAG es una secuencia conocida de 8 a.a. (DYKDDDDK). L. Gutiérrez-Aguilar y M. Vázquez (datos no publicados) construyeron proteínas de fusión FLAG-TnaA y TnaA-FLAG y establecieron seis líneas de moscas transgénicas en el cromosoma 2, que contienen las versiones etiquetadas de TnaA: TnaA-FLAG (líneas 9.2a y 9.3a) y FLAG-TnaA (2.2, 4.2, 9.2 y 9.3). Estas construcciones están bajo el control de un promotor con la secuencia *UAS* (“Upstream Activator Sequences”) de levadura y por lo tanto el sistema de expresión de las versiones etiquetadas es responsivo al activador de levadura GAL4, que se encuentra como transgen en diversas líneas de moscas, conocidas como “drivers” y que producen GAL4 sólo en ciertas etapas del desarrollo ó en regiones u órganos específicos. Esto nos

permite dirigir la expresión de las versiones etiquetadas de TnaA a etapas del desarrollo y/o a tejidos particulares. Con este fin, en este trabajo, se probaron diversos “drivers”. Como primera prueba, se intentó obtener moscas adultas que expresaran ectópicamente a TnaA etiquetada. Para esto se realizaron cruza de líneas que contienen a UAS-TnaA-FLAG ($w^-;P\{w^+,UAS-tnaA-FLAG\}/CyO$) ó a UAS-FLAG-TnaA ($w^-;P\{w^+,UAS-FLAG-tnaA\}/CyO$) con la línea “driver” ($w^-;P\{w^+Act5C-Gal4\}/CyO$) que expresa a GAL4 ectópicamente, pues se encuentra bajo el promotor de actina 5C de la mosca. En las siguientes tablas se muestran los genotipos esperados de las cruza con los progenitores indicados:

Cruza $w^-;P\{w^+,UAS-tnaA-FLAG\}/CyO$ X $w^-;P\{w^+Act5C-Gal4\}/CyO$

	♀ <i>UAS-tnaA-FLAG</i>	♀ <i>CyO</i>
♂ <i>Act5C-Gal4</i>	<i>UAS-tnaA-FLAG/Act5C-Gal4</i>	<i>Act5C-Gal4/CyO</i>
♂ <i>CyO</i>	<i>UAS-tnaA-FLAG/CyO</i>	Letal

Cruza $w^-;P\{w^+,UAS-FLAG-tnaA\}/CyO$ X $w^-;P\{w^+Act5C-Gal4\}/CyO$

	♀ <i>UAS-FLAG-tnaA</i>	♀ <i>CyO</i>
♂ <i>Act5C-Gal4</i>	<i>UAS-FLAG-tnaA/Act5C-Gal4</i>	<i>Act5C-Gal4/CyO</i>
♂ <i>CyO</i>	<i>UAS-FLAG-tnaA /CyO</i>	Letal

Como resultado de estas cruza se obtendrían entre otras, moscas del genotipo *UAS-tnaA-FLAG/Act5C-Gal4* (negritas en la Tabla anterior) que podrían expresar ectópicamente las versiones etiquetadas con FLAG de TnaA. La forma en que se buscaron los individuos adultos que deberían expresar TnaA marcado con FLAG ectópicamente es por la presencia de características fenotípicas de alas silvestres, a diferencia de las heterocígas de alas rizadas (marcador *CyO* en los genotipos mostrados) (Fig. 12).

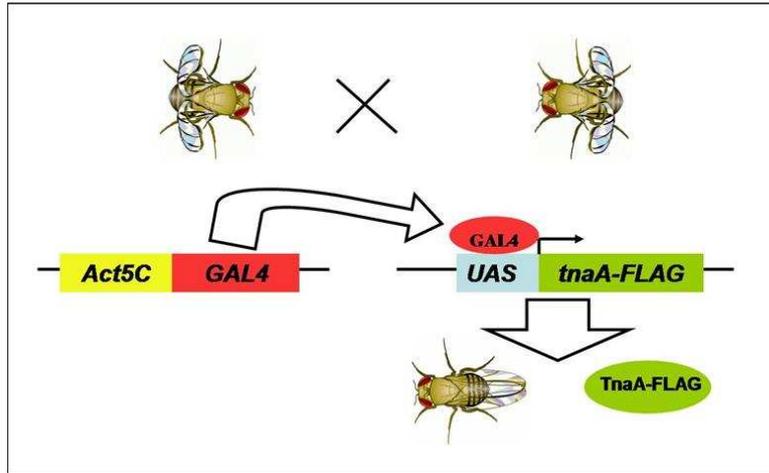


Figura 12. Esquema del funcionamiento del sistema UAS-GAL4 en *D. melanogaster* para TnaA-FLAG. Cruzando moscas en las que la expresión de GAL4 está dirigida por el promotor de expresión ectópica del gen *Act5C* con una línea que posee *tnaA-FLAG* río abajo de la secuencia UAS, se puede lograr en la progenie la expresión ectópica de TnaA-FLAG.

De las cruza entre las seis líneas transgénicas probadas y la línea “driver” de actina, no se obtuvieron individuos adultos del genotipo *UAS-tnaA-FLAG/Act5C-Gal4* que son los que podrían expresar las proteínas etiquetadas (un ejemplo de la progenie obtenida en las cruza anterior con las líneas 2.2 y 4.2 con la línea “driver” ectópica, se muestra en la Tabla a continuación):

Línea FLAG-TnaA	<i>UAS-FLAG-tnaA/ Act5C-Gal4</i>	<i>Act5C-Gal4/CyO</i> O <i>UAS-FLAG-tnaA /CyO</i>
2.2	0	240
4.2	0	220
2.2	0	153
4.2	0	184

Tabla 1. La expresión ectópica de las formas de TnaA etiquetadas molecularmente es letal. Los números enteros indican la cantidad de individuos adultos observados del genotipo correspondiente.

Se concluyó que la expresión ectópica y fuerte de TnaA-FLAG y FLAG-TnaA es letal. Por tanto se buscaron otras líneas “driver” tejido-específicas que nos permitieran la expresión de las proteínas etiquetadas.

b) Expresión de TnaA-FLAG y FLAG-TnaA en glándulas salivales de larvas de 3^{er} instar.

Con el objetivo de expresar a TnaA-FLAG ó FLAG-TnaA en algún tejido y estadio donde no resultara letal para *D. melanogaster*, se utilizó la línea “driver” que produce GAL4 bajo la expresión de un promotor del gen *Sgs3* que se expresa específicamente en la glándula salival durante el 3^{er} estadio larvario. En el caso de lograr la expresión de TnaA-FLAG ó FLAG-TnaA en este tejido se podría analizar la presencia de TnaA en cromosomas politénicos.

Para tal objetivo se cruzaron las moscas de las líneas transgénicas 2.1, 3.2, 6.2, 7.1, 8.3 y 9.1 que contienen a UAS-TnaA-FLAG ($w^-;P\{w^+,UAS-tnaA-FLAG\}/TM6B$) ó a moscas de las líneas 1.3, 3.1 y 6.2 que contienen a UAS-FLAG-TnaA ($w^-;P\{w^+,UAS-FLAG-tnaA\}/TM6B$) contra las moscas de la línea “driver” que expresa a GAL4 bajo el promotor *Sgs3* ($w^-;P\{w^+,Sgs3-Gal4\}/TM6B$). A continuación se muestran los cuadros de Punnet donde se muestran las clases de genotipo esperados de las cruzas realizadas para dirigir la expresión de las versiones etiquetadas de TnaA a las glándulas salivales de larvas de 3er instar. En azul se marca la clase donde se espera tener expresión.

Cruza $w^-;P\{w^+,UAS-tnaA-FLAG\}/TM6B$ X $w^-;P\{w^+,Sgs3-Gal4\}/TM6B$

	♀ <i>UAS-tnaA-FLAG</i>	♀ <i>TM6B</i>
♂ <i>Sgs3-Gal4</i>	<i>UAS-tnaA-FLAG/Sgs3-Gal4</i>	<i>Sgs3-Gal4/TM6B</i>
♂ <i>TM6B</i>	<i>UAS-tnaA-FLAG/TM6B</i>	Letal

Cruza $w^-;P\{w^+,UAS-FLAG-tnaA\}/TM6B$ X $w^-;P\{w^+,Sgs3-Gal4\}/TM6B$

	♀ <i>UAS-FLAG-tnaA</i>	♀ <i>TM6B</i>
♂ <i>Sgs3-Gal4</i>	<i>UAS-FLAG-tnaA/Sgs3-Gal4</i>	<i>Sgs3-Gal4/TM6B</i>
♂ <i>TM6B</i>	<i>UAS-FLAG-tnaA/TM6B</i>	Letal

Se obtuvieron del 30-88% de los individuos adultos esperados de las clases *UAS-TnaA-FLAG/Sgs3-GAL4* ó *UAS-FLAG-TnaA/Sgs3-GAL4* de todas las líneas probadas sin mostrar un fenotipo mutante evidente, lo cual muestra que si bien la expresión de TnaA-FLAG ó FLAG-TnaA en glándulas salivales de larvas de tercer estadio no es inocua, no es tan tóxica como para no permitir la aparición de individuos adultos. A continuación se muestra la Tabla de porcentaje de individuos de la clase esperada *UAS-TnaA-FLAG/Sgs3-GAL4* ó *UAS-FLAG-TnaA/Sgs3-GAL4* en cada una de las líneas evaluadas.

Líneas TnaA-FLAG

Línea	Genotipo	Sobrevivencia (observado/esperado)
2.1	$\frac{w^-;P\{w^+,UAS-tnaA-FLAG\}/TM6B}{w^-;P\{w^+,Sgs3-Gal4\}/TM6B}$	69% (44/64)
3.2	$\frac{w^-;P\{w^+,UAS-tnaA-FLAG\}/TM6B}{w^-;P\{w^+,Sgs3-Gal4\}/TM6B}$	60% (61/102)
6.2	$\frac{w^-;P\{w^+,UAS-tnaA-FLAG\}/TM6B}{w^-;P\{w^+,Sgs3-Gal4\}/TM6B}$	69% (41/59)
7.1	$\frac{w^-;P\{w^+,UAS-tnaA-FLAG\}/TM6B}{w^-;P\{w^+,Sgs3-Gal4\}/TM6B}$	68% (51/75)
8.3	$\frac{w^-;P\{w^+,UAS-tnaA-FLAG\}/TM6B}{w^-;P\{w^+,Sgs3-Gal4\}/TM6B}$	84% (57/68)
9.1	$\frac{w^-;P\{w^+,UAS-tnaA-FLAG\}/TM6B}{w^-;P\{w^+,Sgs3-Gal4\}/TM6B}$	70% (45/64)

Líneas FLAG-TnaA

Línea	Genotipo	Sobrevivencia (observado/esperado)
1.3	$\frac{w^-;P\{w^+,UAS-FLAG-tnaA\}/TM6B}{w^-;P\{w^+,Sgs3-Gal4\}/TM6B}$	88% (54/61)
3.1	$\frac{w^-;P\{w^+,UAS-FLAG-tnaA\}/TM6B}{w^-;P\{w^+,Sgs3-Gal4\}/TM6B}$	63% (49/78)
6.2	$\frac{w^-;P\{w^+,UAS-FLAG-tnaA\}/TM6B}{w^-;P\{w^+,Sgs3-Gal4\}/TM6B}$	32% (18/57)

Tabla 2. La expresión en glándulas salivales de las formas de TnaA etiquetadas molecularmente no es letal. La sobrevivencia de la clase mostrada se calculó refiriéndose al 100% de sobrevivencia de una de las dos clases con el cromosoma balanceador *TM6B* (ver clases esperadas en los cuadros de Punnett mostrados para estas cruza) obtenidas en la misma cruza. Este 100% se obtuvo a partir de la división entre dos, del número total de los individuos de las dos clases con el marcador *Sb^l* (conferido por el cromosoma balanceador *TM6B*).

Para evaluar la expresión de la proteína FLAG-TnaA ó TnaA-FLAG en los extractos proteicos de las glándulas salivales de los individuos de las clases esperadas *UAS-FLAG-tnaA/Sgs3-GAL4* ó *UAS-TnaA-FLAG/Sgs3-GAL4*, se hicieron análisis tipo Western con los anticuerpos anti-FLAG M2 (SIGMA), anti- β -tubulina (para control de carga, Santa Cruz) y anti-TnaA (diferentes dominios) (Figs. 13, 14 y 15).

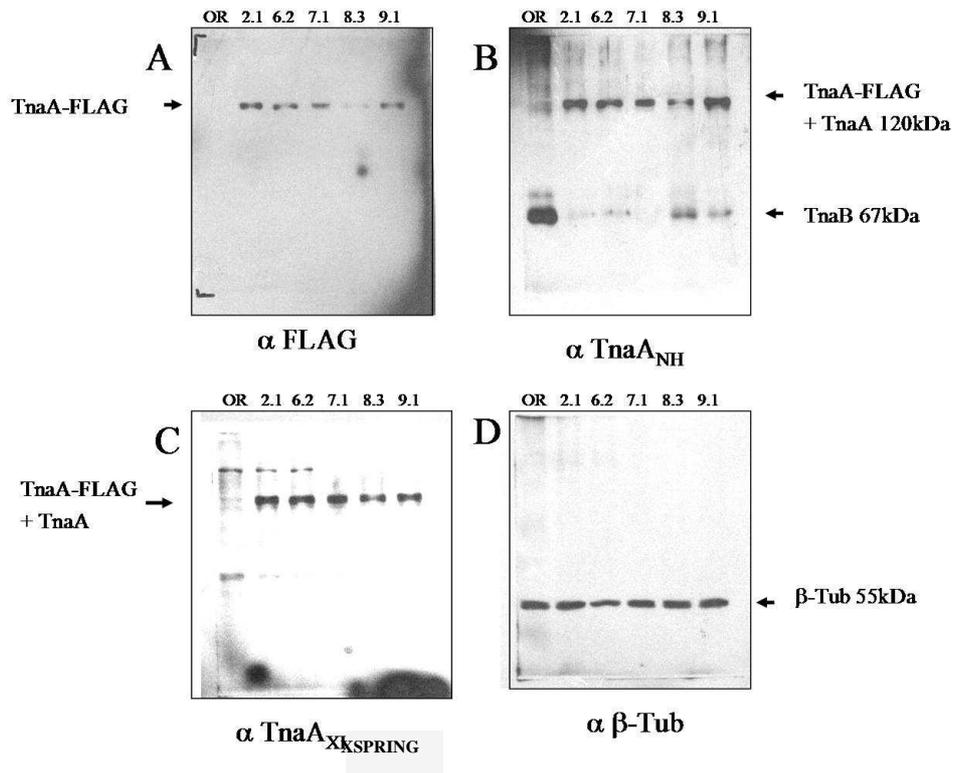


Figura 13. Expresión de TnaA-FLAG en glándulas salivales de líneas transgénicas de *D. melanogaster*. Análisis tipo Western de los extractos proteicos de glándulas salivales de la línea silvestre *OregonR* (OR), así como las distintas líneas transgénicas *FLAG-TnaA/Sgs3-GAL4* (2.1, 6.2, 7.1, 8.3 y 9.1). Revelado con quimioluminiscencia. Se utilizaron los anticuerpos primarios anti-FLAG (A), anti-TnaA_{NH3} (B), anti-TnaA_{XKSPRING} (C) y anti- β -tubulina (D). Las flechas (\rightarrow) indican las proteínas TnaA, TnaA-FLAG y TnaB.

Como se puede observar en la Figura 13, a diferencia de lo obtenido con glándulas salivales de larvas silvestres *OregonR* (OR), en los extractos de glándulas salivales de individuos de la clase *UAS-tnaA-FLAG/Sgs3-GAL4* de las líneas transgénicas (2.1, 6.2, 7.1, 8.3 y 9.1) se encuentra la proteína TnaA-FLAG, como lo confirma el sobrelape peso correspondiente a TnaA endógena (120 kDa) (comparar paneles A con B y C). También resulta interesante observar que pudimos identificar la presencia de TnaA

endógena en las glándulas salivales de larvas silvestres (OregonR) con los anticuerpos contra diferentes dominios de TnaA (paneles B y C).

Lograr la expresión en estas líneas transgénicas es particularmente valioso puesto que la etiqueta FLAG está después del extremo carboxilo de TnaA con lo que su detección asegura la síntesis completa de la proteína TnaA.

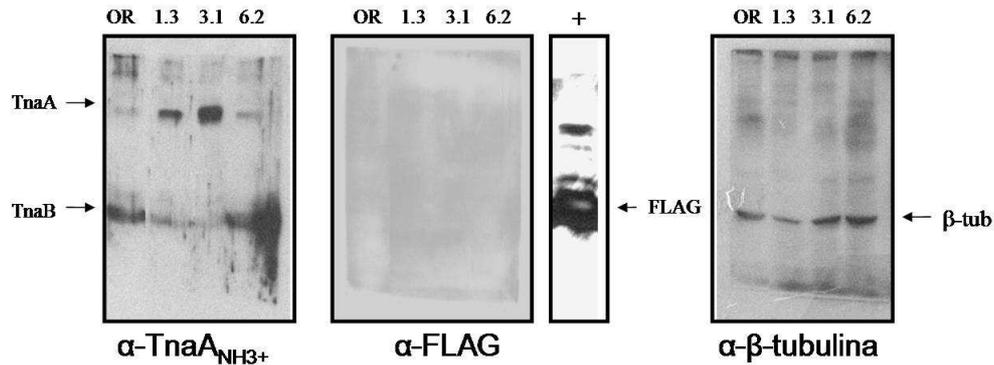


Figura 14. Expresión de FLAG-TnaA en glándulas salivales de líneas transgénicas de *D. melanogaster*. Los extractos protéicos de glándulas salivales de la línea silvestre *OregonR* (OR) y de las distintas líneas transgénicas FLAG-TnaA/*Sgs3*-GAL4 (1.3, 3.1 y 6.2) fueron analizados por la técnica de Western. Se utilizaron los anticuerpos anti-FLAG, anti-TnaA_{NH3} y anti- β -tubulina. Las flechas (\rightarrow) indican las proteínas Tna, TnaB y una proteína bacteriana con FLAG (FLAG) como control positivo (+).

En las Figuras 14 y 15 se muestran los análisis tipo Western de las líneas transgénicas *UAS-FLAG-TnaA*. En el experimento de la Figura 14, encontramos una sobreexpresión de TnaA en las glándulas salivales de las líneas transgénicas 1.3 y 3.1 al detectar la proteína con anticuerpo contra TnaA_{NH3+} (α -TnaA_{NH3+}). Muy probablemente este reconocimiento se deba a la suma de la proteína TnaA endógena más la proteína FLAG-TnaA sobreexpresada. Sin embargo, al analizar la presencia de la proteína FLAG-TnaA con el anticuerpo contra FLAG (α -FLAG), no se detectó ninguna señal. Dado que el anticuerpo sí funcionó en éste y otros experimentos (ver control positivo de Fig. 14 y experimentos de la sección anterior) creemos que la proteína FLAG-TnaA producida en estos animales presenta alguna conformación o plegamiento que impide el

reconocimiento por el anticuerpo y/o que los tratamientos particularmente aplicados a la membrana de nitrocelulosa, dañaron las proteínas y afectaron el reconocimiento.

Con la finalidad de determinar si la ausencia de reconocimiento por parte del anticuerpo contra FLAG en las líneas transgénicas *UAS-FLAG-TnaA* se debió al daño de la membrana y/o de las proteínas debido al tratamiento por “stripping”, se repitió el Western incubando inicialmente con α -FLAG (Fig. 15).

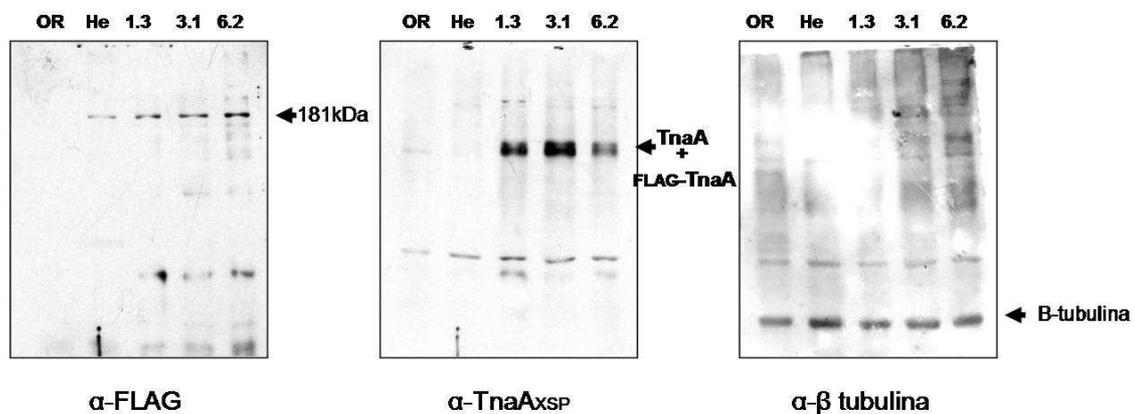


Figura 15. Expresión de FLAG-TnaA en glándulas salivales de líneas transgénicas de *D. melanogaster*. Por técnica de Western se observan los extractos protéicos de glándulas salivales de la línea silvestre *OregonR* (OR), de las líneas *FLAG-TnaA/TM6B* y *Sgs3-GAL4/TM6B* (He), así como de las distintas líneas transgénicas *FLAG-TnaA/Sgs3-GAL4* (1.3, 3.1 y 6.2). Se utilizaron los anticuerpos contra FLAG (α -FLAG), contra TnaA_{XSP} (α - TnaA_{XSP}) y anti- β -tubulina. Las flechas (\rightarrow) indican las proteínas TnaA, B-tubulina y una proteína de 181 kDa.

Como se aprecia (Fig. 15), con el anticuerpo α -TnaA_{XSP} se observa la banda

correspondiente a la suma de la proteína TnaA endógena más la expresión de FLAG-

TnaA

(TnaA + FLAG-TnaA). Nuevamente con el α -FLAG no se observa ninguna banda correspondiente a FLAG-TnaA, lo cual sugiere que el dominio FLAG no es accesible para los anticuerpos en ensayos de Western cuando se encuentra en el extremo NH₃ de TnaA. Aunque se observa una proteína de 181 kDa con α -FLAG, probablemente se deba a un reconocimiento inespecífico ya que también se observa en extractos de proteínas de individuos que son una mezcla de las clases (*FLAG-TnaA/TM6B* ó *GAL4-Sgs3/TM6B*) que en teoría no pueden expresar la versión etiquetada (carril He, Fig. 15, anti-FLAG).

En conclusión, los individuos *UAS-tnaA-FLAG/Sgs3-GAL4* y *UAS-FLAG-tnaA/Sgs3-GAL4* expresan las dos versiones de TnaA etiquetadas con FLAG. Como se mencionó, la detección de TnaA-FLAG con el anticuerpo anti-FLAG nos asegura la presencia de la proteína completa en los individuos *UAS-tnaA-FLAG/Sgs3-GAL4*. Por esta razón estos individuos se utilizaron para realizar experimentos de inmunolocalización en el tejido de glándula salival durante el 3^{er} estadio larvario.

3. Purificación de anticuerpos anti-TnaA_{NH3} y anti-TnaA_{XSPRING}.

Debido a que en la siguiente sección se mostrarán resultados que indicaban que los anticuerpos que obtuve durante mi Tesis de Licenciatura contra diferentes dominios de TnaA no estaban funcionando para hacer inmunotinciones, decidimos purificarlos.

En esta sección se presentan los resultados obtenidos en los intentos de purificación de los anticuerpos anti-TnaA_{NH3} y anti-TnaA_{XSPRING} (ver también ANEXO 2). Se probaron dos métodos de purificación por afinidad: el primero utilizando las resinas de Affigel

(BioRad) y el segundo por afinidad a proteínas de fusión con GST inmovilizadas en glutatión sefarosa con dos variantes, una utilizada para los anticuerpo anti-TnaA_{NH3} y la otra para los anticuerpos anti-TnaA_{XSPRING}. En el método de Affigel se logró tener una muy pequeña proporción de anticuerpos purificados funcionales (datos no mostrados). Se optó entonces por probar el otro método de purificación por parecer más sencillo y con menor manipulación.

a) Purificación de anticuerpos anti-TnaA_{NH3} por afinidad a la proteína de fusión GST-TnaA_{NH3}.

Este método consiste en inmovilizar la proteína de fusión GST-TnaA_{NH3} en una resina de glutatión-sefarosa y permitir la unión específica de los anticuerpos policlonales de un suero total que reconocen a la proteína de fusión. Finalmente los anticuerpos puros se eluyen en las condiciones apropiadas (Ver “Material y Métodos”, Método 1).

Se determinó la eficiencia de pegado de la proteína de fusión a la resina (comparando una alícuota de la resina con cantidades conocidas de albúmina). La identificación de las fracciones de la elusión que contenían los anticuerpos puros, se hizo por el método de Bradford midiendo la DO₂₈₀. La presencia de los anticuerpos en las fracciones eluidas que presentaron mayor densidad óptica se evaluó en ensayos tipo Western con extractos de bacterias donde se indujo la expresión de GST-TnaA_{NH3} y en extractos insolubles de macho adulto de *D. melanogaster*, donde ya sabíamos que TnaA se expresa (Fig. 16).

purificados (no se observó un incremento en la DO_{280} , y no se volvió a detectar la proteína de fusión en los ensayos tipo Western realizados, datos no mostrados).

b) Purificación de los anticuerpos anti-TnaA_{XSPRING} y elusión de la proteína GST-TnaA_{XSPRING} de la resina de glutatión sefarosa.

A diferencia de la purificación de los anticuerpos anti-TnaA_{NH3}, en la purificación de los anticuerpos anti-TnaA_{XSPRING} a partir del suero total se utilizaron concentraciones iniciales precisas, así como soluciones adicionales de lavado y de equilibrio (ver “Materiales y Métodos”, Método 2).

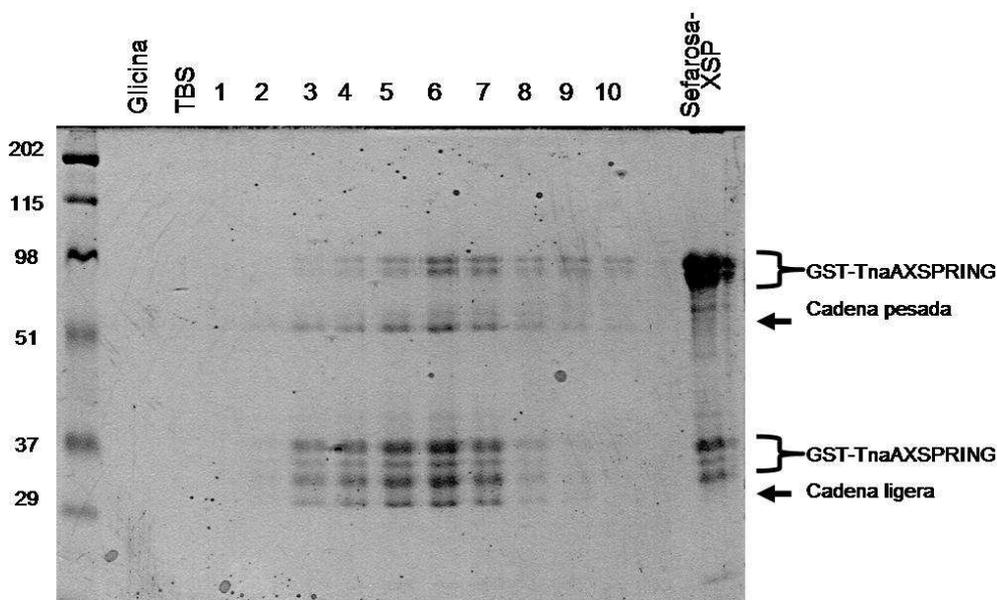


Figura 17. Purificación por afinidad del anticuerpo anti-TnaA_{XSPRING}. SDS-PAGE donde se muestran las diferentes fracciones colectadas de las eluciones con glicina-HCl (1-10), solución de glicina-HCl (Glicina), TBS y la resina glutatión-sefarosa con GST-TnaA_{XSPRING} unida (Sefarosa-XSP). Se señala la proteína GST-TnaA_{XSPRING} y sus derivados ($\}$), así como la cadena ligera (25 kDa) y pesada (50 kDa) de los anticuerpos (\leftarrow).

En la Figura 17, se observa que en las eluciones 3-10 con glicina-HCl están las cadenas ligera y pesada de los anticuerpos, pero inesperadamente también se eluye la proteína GST-TnaA_{XSPRING} y sus fragmentos de degradación o procesamiento. La presencia de la proteína GST-TnaA_{XSPRING} en la fracción de los anticuerpos purificados representa un

problema pues bloquea a los anticuerpos y no nos permite utilizarlos en ensayos de inmunocitoquímica.

Con el objetivo de analizar si alguna fracción de los anticuerpos purificados de esta manera, no quedó bloqueada por la presencia de la proteína GST-TnaA_{XSPRING} y servía para evaluar inmunorreconocimiento de TnaA, se realizó un ensayo tipo Western con extractos de proteína de mosca macho adulto y de bacterias inducidas para la expresión de GST-TnaA_{XSPRING}. Antes de realizar el Western, se mezclaron las fracciones colectadas en tres grupos (3-4, 5-7 y 8-9).

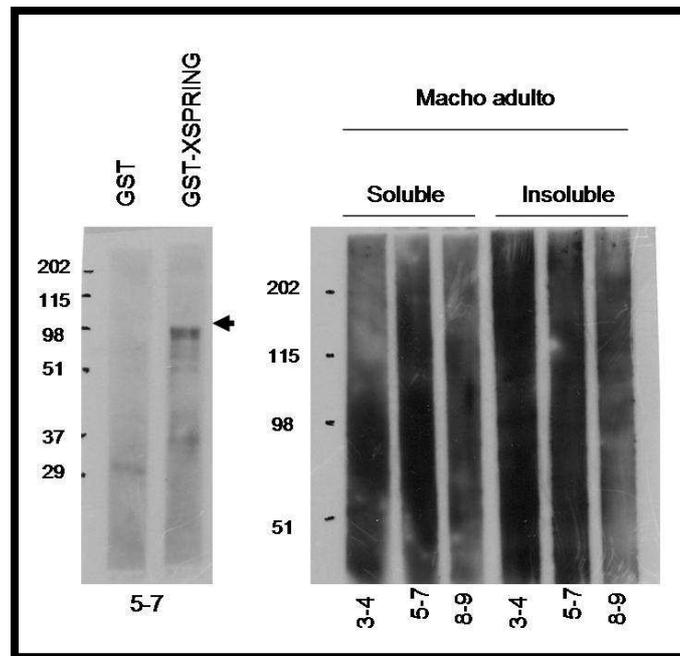


Figura 18. Prueba de anticuerpos anti-GST-TnaA_{XSPRING} purificados. Se probaron extractos totales de *E. coli* inducidas para la expresión de GST (GST) o de GST-TnaA_{XSPRING} (GST-XSPRING), así como extractos solubles e insolubles de macho adulto de *D. melanogaster*, los cuales se incubaron con los diferentes conjuntos de las fracciones de anti-GST-TnaA_{XSPRING} semipuro (3-4, 5-7 y 8-9). La flecha (←) indica la banda correspondiente a la proteína GST-TnaA_{XSPRING}. Los marcadores moleculares se muestran a la izquierda de los carriles. Las fracciones 5-7 semipuras se utilizaron en una dilución 1:10000 en extractos bacterianos, y las fracciones 3-4, 5-7 y 8-9 se utilizaron 1:500 en extractos de *D. melanogaster*.

En la Figura 18 se observa que en las fracciones 5-7 existen anticuerpos capaces de reconocer a GST-TnaA_{XSPRING} (←) en los extractos de bacteria. Sin embargo, los anticuerpos de éstas y otras fracciones no reconocieron a TnaA en los extractos de macho adulto de *D. melanogaster*. Este resultado muestra que en las fracciones eluidas existe una proporción mínima de anticuerpo libre capaz de reconocer a la proteína GST-TnaA_{XSPRING} cuando se encuentra en concentraciones muy altas, como en el caso del extracto bacteriano. Sin embargo esto no es suficiente para detectar a TnaA en extractos de mosca aún cuando se usen concentraciones mucho mayores (1:500) que las utilizadas para la detección en el extracto bacteriano (1:10000).

En trabajo previo (R. A. Juárez-Uribe, Tesis de Licenciatura 2007) fuimos incapaces de eluir la proteína de fusión GST-TnaA_{XSPRING} de la resina de glutatión-sefarosa con diversos tratamientos. A pesar de que el objetivo de tener anticuerpos anti-TnaA purificados por afinidad no se ha cumplido, un resultado importante fue encontrar que la glicina-HCl 0.1 M pH 2.5 es capaz de eluir a la proteína GST-TnaA_{XSPRING} de la resina de glutatión-sefarosa. Esto será útil para otros objetivos del laboratorio. Para afinar este resultado se repitió la elusión de GST-TnaA_{XSPRING} de glutatión sefarosa utilizando incubaciones a diferentes tiempos con glicina-HCl 0.1 M pH 2.5.

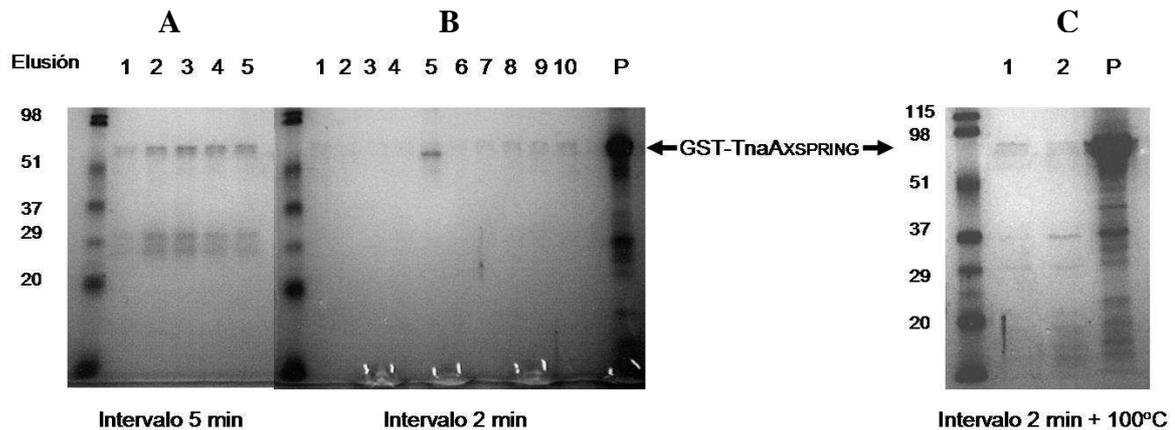


Figura 19. Elusión de GST-TnaA_{XSPRING} con glicina-HCl 0.1 M pH 2.5. Gel SDS-PAGE con diferentes eluciones (1, 2, 3, etc.) realizadas a diferentes intervalos de tiempo entre cada elusión (2 y 5 min), y la resina posterior a las eluciones (P). En la imagen de la derecha se indica el resultado del calentamiento a 100°C de la muestra durante las eluciones (+ 100°C). La proteína GST-TnaA_{XSPRING} se indica con flechas (←, →). En cada carril se cargaron 5 µl de muestra.

En la Figura 19, se muestra que la utilización de la glicina-HCl 0.1 M pH 2.5 es un buen método para la elusión de la proteína GST-TnaA_{XSPRING} de la resina de glutatión sefarosa. Los resultados de las eluciones de 5 min (panel A) y de 2 min (panel B) muestran que la proteína de fusión se eluye mejor a partir de 10 min de incubación a temperatura ambiente (A carril 2; B carril 5). La aplicación de alta temperatura no aumenta la elusión de la proteína de fusión (panel C). Aunque este tipo de elusión con glicina-HCl no es tan eficiente como la de glutatión reducido para otras proteínas de fusión, resulta un buen método alternativo para GST-TnaA_{XSPRING} y probablemente otras proteínas insolubles. Aunque la parte de elusión y neutralización del protocolo está planeada para obtener anticuerpos funcionales en una solución con pH 7.4, muy probablemente también proteínas o polipéptidos eluidos como GST-TnaA_{XSPRING} sean funcionales y mantengan su actividad nativa, para lo cual se deberán realizar pruebas. Aunque no se realizaron experimentos, probablemente la glutatión-sefarosa pueda reutilizarse pues no queda bloqueada por el glutatión libre, siempre y cuando se haga un lavado y se mantenga en un *buffer* adecuado cercano a pH 7.3. Por otro lado la proteína

eluida no necesita dializarse para eliminar el exceso de glutatión libre, aunque sí es importante neutralizar eficientemente para renaturalizar a la proteína.

4.- Inmunotinción de cromosomas politénicos y glandulas salivales de larvas de 3^{er} estadio.

Una de las preguntas importantes del laboratorio, es determinar dónde se encuentra TnaA durante el desarrollo de *Drosophila*, en qué tipos celulares y en qué compartimentos subcelulares. Como *tna* interacciona genéticamente con genes que codifican para proteínas implicadas en la remodelación de la cromatina interfásica y se requiere para la expresión de los genes homeóticos, un sitio obvio de interés para determinar la presencia de TnaA, son los cromosomas politénicos de *Drosophila* que es uno de los sitios donde actúan las proteínas antes mencionadas. Por lo tanto, un objetivo de esta tesis fue determinar si TnaA se encuentra en los cromosomas politénicos de *Drosophila*.

a) Presencia de TnaA-FLAG en cromosomas politénicos.

La técnica de inmunotinción de cromosomas politénicos se utiliza para analizar la localización, interacción y función de diferentes moléculas como proteínas involucradas en transcripción, represión, estabilidad genómica y segregación entre otras. Por lo tanto se llevaron a cabo inmunotinciones de cromosomas politénicos de larvas de 3er estadio *UAS-TnaA-FLAG/Sgs3-GAL4* de la línea 8.3, así como de la línea silvestre *OreR* para evaluar la funcionalidad de los anticuerpos, analizar la presencia, y de ser así, la localización de TnaA-FLAG en los cromosomas politénicos de larvas de 3^{er} estadio (ver Materiales y Métodos). Para evaluar la presencia de la proteína TnaA-FLAG en los cromosomas politénicos, se utilizó el anticuerpo contra FLAG a una concentración de

1:500. Para determinar si la técnica de inmunotinción se realizó adecuadamente, se utilizó el anticuerpo anti-Mat1 que reconoce a la proteína Mat1, la cual es un componente del complejo TFIID y presenta un patrón conocido en cromosomas politénicos (Aguilar-Fuentes *et al.*, 2006). Se utilizó también el anticuerpo anti-TnaA_{XSPRING}, para determinar si mostraba un patrón similar que el encontrado con el anticuerpo anti-FLAG.

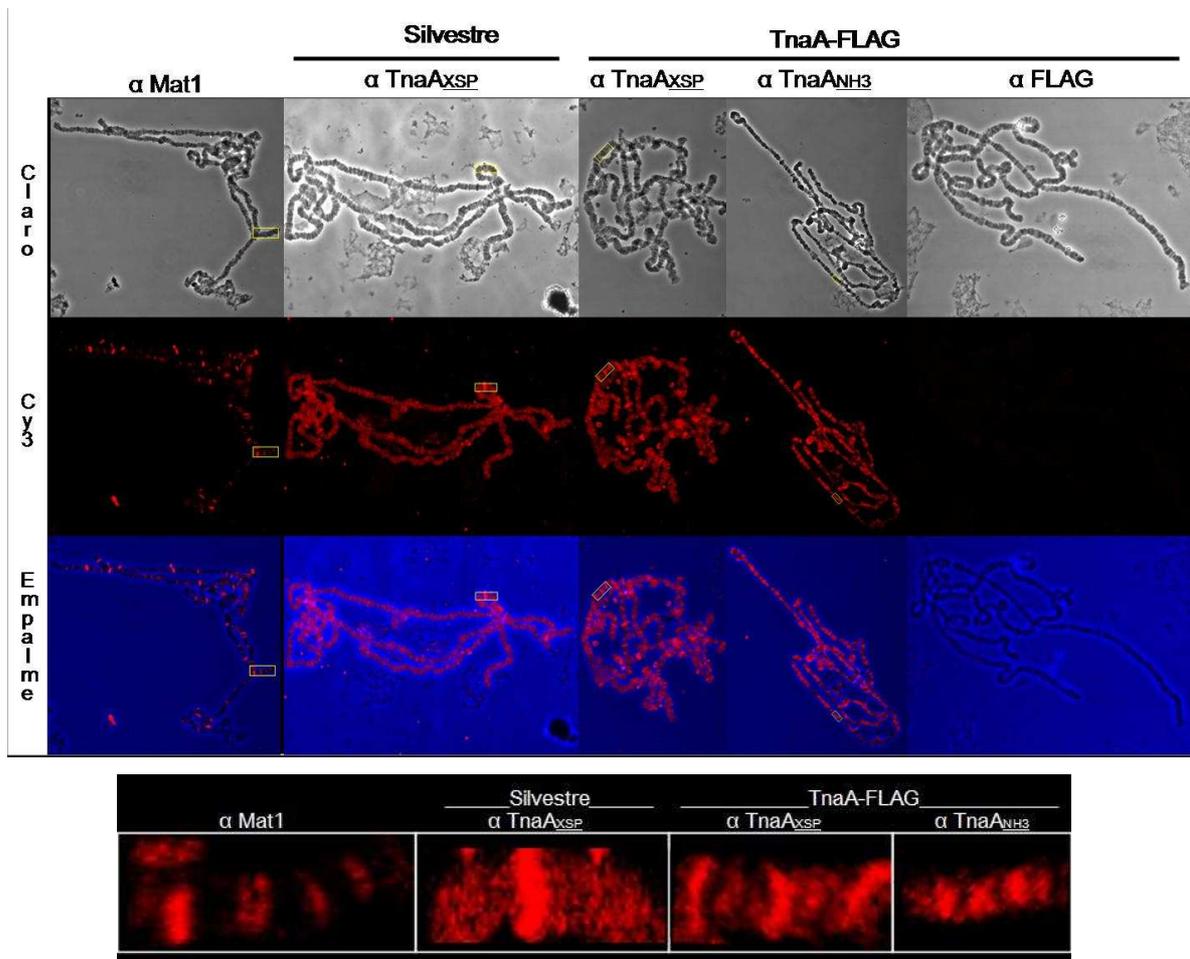


Figura 20. Presencia de TnaA-FLAG en cromosomas politénicos de la línea TnaA-FLAG 8.3. Los cromosomas politénicos de larvas de 3^{er} estadio de la clase *UAS-FLAG-TnaA/Sgs3-GAL4* de la línea TnaA-FLAG 8.3 de *D. melanogaster* fueron inmunoteñidos con los anticuerpos anti-FLAG, anti-TnaA_{NH3} y anti-TnaA_{XSPRING} (éstos últimos dos no purificados). Como control de la técnica se utilizó un anticuerpo contra Mat1. En la fila superior se observan los cromosomas vistos en campo claro, en la fila intermedia la señal emitida por el fluoróforo Cy3 acoplado al anticuerpo secundario anti-IgG-rata (rojo), y en la fila inferior se muestra el empalme. En el panel inferior se muestra el acercamiento de diferentes regiones de los cromosomas politénicos. Las imágenes fueron obtenidas por microscopía confocal con un objetivo de 40X.

Como se puede observar (Fig. 20), los cromosomas politénicos en campo claro presentan una buena morfología. Con el anticuerpo anti-Mat1 se observa un patrón de bandeo característico (Aguilar-Fuentes *et al.*, 2006), lo cual indica que la técnica de inmunotinción se realizó adecuadamente. Si bien con los anticuerpos anti-TnaA_{XSPRING} y anti-TnaA_{NH3} se observa una señal generalizada a todo lo largo del cromosoma, también se pueden notar bandas definidas dentro del mismo. Se observa un mayor número de bandas inmunoteñidas en los cromosomas de la línea TnaA-FLAG que en el cromosoma de la línea silvestre *OreR* debido probablemente a una mayor expresión de la proteína TnaA-FLAG. No se observa ninguna señal con el anticuerpo anti-FLAG, lo cual sugiere que posiblemente la etiqueta FLAG se encuentre inaccesible para el anticuerpo y/o el anticuerpo no sea útil o funcional para este tipo de técnica de inmunotinción. Se realizaron repeticiones de este experimento, utilizando diferentes concentraciones de los anticuerpos y analizando la fluorescencia con microscopía de epifluorescencia, y se obtuvieron resultados similares (datos no mostrados).

Al no estar los anticuerpos anti-TnaA_{XSPRING} y anti-TnaA_{NH3} purificados, en este punto concluimos que la señal generalizada obtenida a lo largo del cromosoma con los anticuerpos si bien era prometedora, no nos permitía concluir que representaba a TnaA en los cromosomas politénicos de la línea transgénica analizada.

b) Ensayo de competencia del anticuerpo anti-TnaA_{XSPRING} en cromosomas politénicos.

Las inmunotinciones de cromosomas politénicos con el anticuerpo anti-FLAG no mostraron señal de algún reconocimiento y a su vez los anticuerpos anti-TnaA_{XSPRING} y anti-TnaA_{NH3} no purificados mostraron una señal generalizada en todo el cromosoma.

Para determinar si la señal observada se podía atribuir a la presencia de TnaA en los cromosomas politénicos o se debía a un reconocimiento inespecífico, se realizó un ensayo de competencia. En este experimento, si algunas de las bandas detectadas en el experimento anterior son debidas a la presencia de TnaA en los cromosomas, deberían desaparecer si el anticuerpo anti-TnaA_{XSPRING} se bloquea con la proteína de fusión GST-TnaA_{XSPRING} antes de la inmunotinción. La comparación de inmunotinciones en donde en un caso se compete el anticuerpo y en otro no, nos permitiría determinar la señal exclusiva del reconocimiento por parte del anticuerpo.

Como paso previo al ensayo de competencia en cromosomas politénicos se probó la eficiencia de la competencia en un análisis tipo Western en extractos insolubles de macho adulto de *D. melanogaster* pues es un estadio y fracción donde encontramos a TnaA (R. A. Juárez-Uribe, Tesis de Licenciatura 2007).

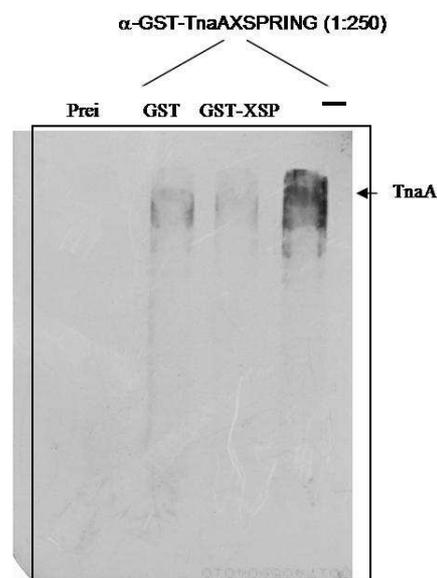


Figura 21. Ensayo de competencia del anticuerpo anti-GST-TnaA_{XSPRING}. Se identificó a TnaA de los extractos insolubles de macho adulto de *D. melanogaster* utilizando suero preinmune (Prei) ó los anticuerpos anti-GST-TnaA_{XSPRING} competidos con: GST (GST), con GST-TnaA_{XSPRING} (GST-XSP) (en una proporción de 187.5 μ g de proteína de fusión unida a glutatión sefarosa por 1 μ l de suero) ó no competidos (-). Cualquiera de ellos se utilizó en una concentración 1:250. La flecha (\leftarrow) indica la señal correspondiente a la proteína TnaA.

Como se puede observar (Fig. 21), el anticuerpo anti-TnaA_{XSPRING} sí es competido por la proteína de fusión GST-TnaA_{XSPRING} y en menor medida por GST. El siguiente paso

fue probar la inmunotinción de cromosomas politénicos en estas condiciones de competencia del anticuerpo (Fig. 22).

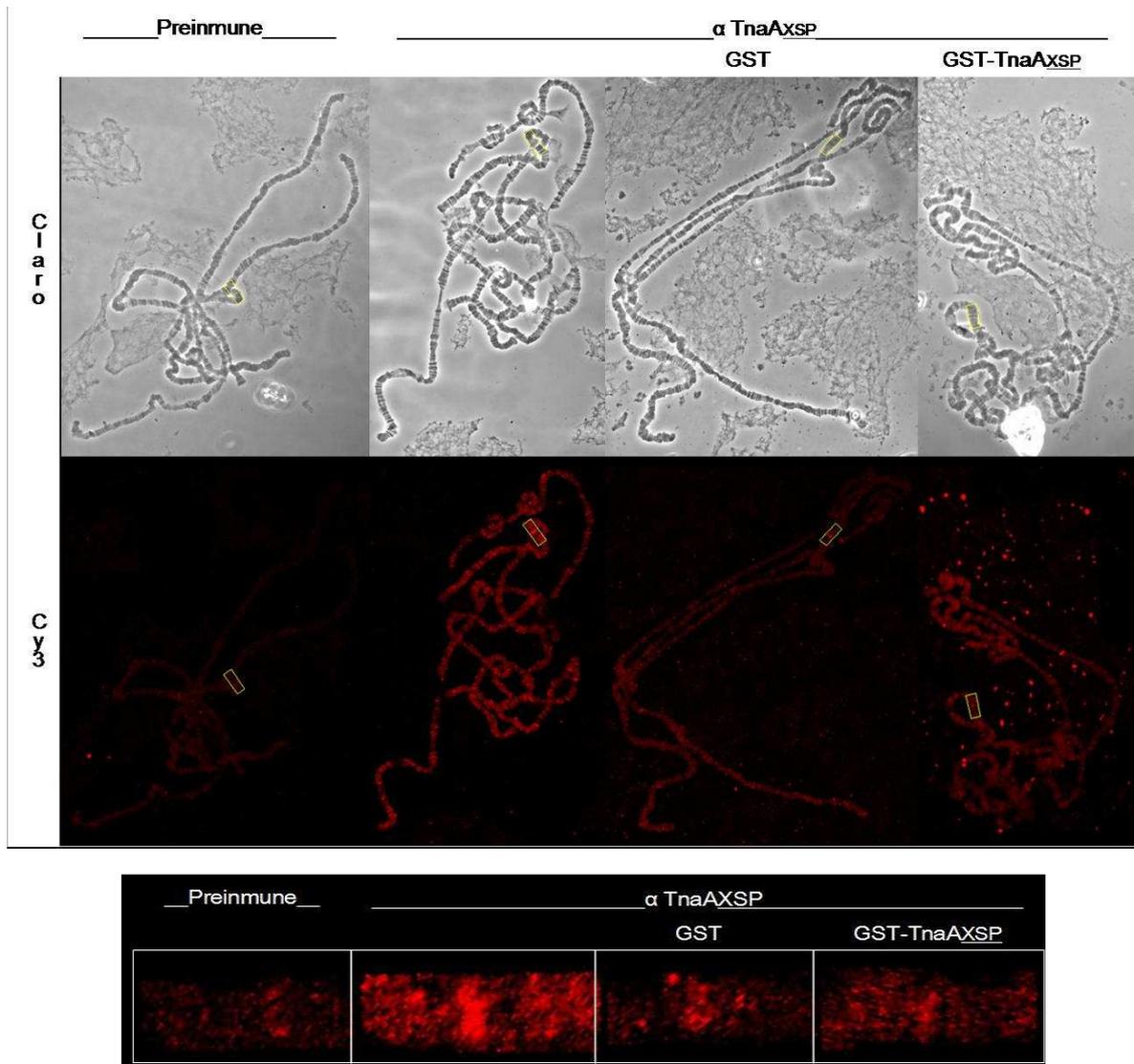


Figura 22. Inmunotinción de TnaA en cromosomas politénicos silvestres compitiendo el anticuerpo anti-TnaA_{XSPRING}. Los cromosomas politénicos de larvas de 3^{er} estadio de la línea *OreR* de *D. melanogaster* se inmunotiñeron con los anticuerpos anti-TnaA_{XSPRING} competidos o no con GST ó GST-TnaA_{XSPRING}. Como control negativo se utilizó suero preinmune. En la fila superior se observan los cromosomas vistos en campo claro, en la fila inferior la señal emitida por el fluoróforo Cy3 acoplado al anticuerpo secundario anti-IgG-rata (rojo). En el panel inferior se muestra el acercamiento de regiones donde se observa que la señal atribuida a TnaA disminuye cuando el anticuerpo se bloquea previamente con las proteínas GST ó GST-TnaA. Las imágenes fueron obtenidas por microscopía confocal con un objetivo de 40X.

Como se observa en la Figura 22, al igual que las inmunotinciones anteriores (Fig. 21), el anticuerpo anti-TnaA_{XSPRING} produce una señal generalizada sobre los cromosomas que es competida cuando el anticuerpo se preincuba con las proteínas GST ó GST-

TnaA_{XSPRING}. Al comparar la señal de la muestra competidas con la no competida, se aprecia que aunque la señal de fondo permanece en todas, la intensidad y forma de las bandas en las competidas disminuye notablemente (ver panel inferior) y de hecho empiezan a ser similares a la muestra que se trató con el suero preinmune. Con estos resultados se concluyó que el contenido del suero, ya sea el preinmune o el anti-suero, provocan una señal inespecífica, pero la disminución en la señal (bandas) de las muestras competidas sugiere que el suero sí contiene anticuerpos que permiten un reconocimiento específico de TnaA en los cromosomas politénicos. Por esta razón se decidió purificar los anticuerpos anti-TnaA por afinidad como se ha descrito en la sección anterior. Los anticuerpos purificados nos serían útiles para repetir las inmunotinciones y realizar otros experimentos.

c) Localización de TnaA en glándulas salivales.

Para determinar la localización de la proteína endógena silvestre y la de la proteína etiquetada con FLAG se realizaron inmunotinciones de glándulas salivales de larvas de 3er estadio de la línea silvestre (*OreR*) y de las líneas transgénicas (*UAS-FLAG-TnaA/Sgs3-GAL4* y *UAS-TnaA-FLAG/Sgs3-GAL4*). Debido a los problemas para purificar los anticuerpos contra TnaA por los métodos de afinidad y sabiendo que el suero total sí es capaz de detectar a TnaA en ensayos tipo Western, se utilizó el método de preadsorción de los anticuerpos que consiste en preincubar a los anticuerpos con algún tejido de la especie donde se van a utilizar (en este caso se utilizaron embriones de 0-21 h de *Drosophila*, ver Materiales y Métodos) para tratar de eliminar la señal de fondo producida por el anti-suero en las inmunotinciones de tejidos y cromosomas politénicos. A continuación se muestra la inmunotinción de glándulas silvestres (Fig. 23).

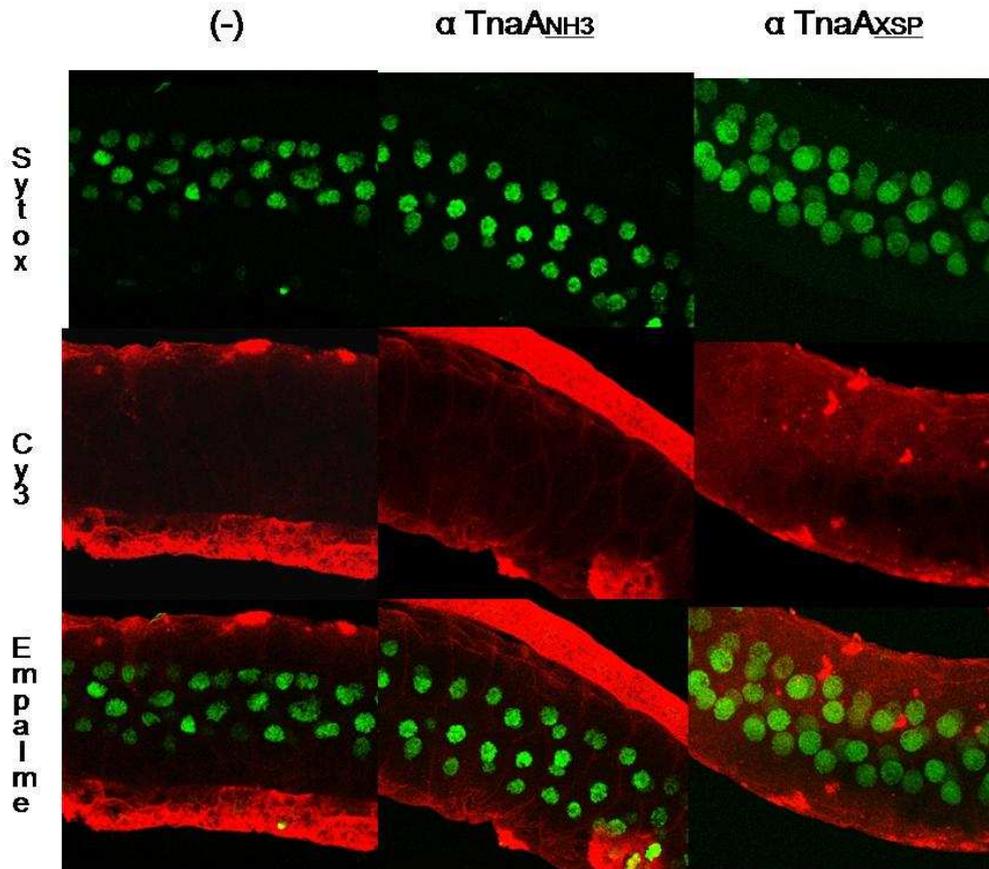


Figura 23. Localización de TnaA en glándulas salivales de larvas de 3er instar silvestres. Las glándulas salivales fueron teñidas indirectamente con los anticuerpos contra TnaA_{NH3} y contra TnaA_{XSPRING} preadsorbidos (señal en rojo). Como control una muestra carente de anticuerpo primario (-). En la fila superior se observa la señal emitida por el Sytox-green que tiñe DNA (verde), en la fila intermedia la señal emitida por el fluoróforo Cy3 acoplado al anticuerpo secundario anti-IgG-rata (rojo), y en la fila inferior se muestra el empalme de ambas señales. La imagen es una proyección obtenida por microscopía confocal con un objetivo 20X.

Como se puede observar en la Figura 23, la presencia y definición de los núcleos son claras (verde), pero ninguna señal es evidente o superior a la señal producida por el suero preinmune en las tinciones con el anti-suero contra TnaA_{XSP} y contra TnaA_{NH3} (rojo). Este resultado contrasta con los observados en los análisis tipo Western de glándulas salivales silvestres y en la inmunotinción de cromosomas politénicos donde, aunque en bajas cantidades (en los ensayos tipo Western, Figs. 14 y 15) ó con poca especificidad (en los

cromosomas politénicos, Fig. 20) sí se observa la presencia de TnaA con estos anticuerpos en la línea silvestre. Aunque se aplicaron diferentes tratamientos de permeabilización del tejido variando la concentración de detergente, no se detectó una señal específica para TnaA (datos no mostrados). Por tanto, se concluyó que probablemente la concentración de la proteína TnaA endógena es muy baja, ó que los anticuerpos no están funcionando para reconocer a la proteína con esta técnica.

Entonces se analizaron las glándulas salivales de individuos de las líneas transgénicas TnaA-FLAG 9.1 (*UAS-TnaA-FLAG/Sgs3-GAL4*) y FLAG-TnaA 1.3 (*UAS-FLAG-TnaA/Sgs3-GAL4*) que expresan las versiones etiquetadas TnaA-FLAG y FLAG-TnaA respectivamente, en dicho órgano (Figuras 13 y 15). Se utilizó el mismo protocolo de inmunotinción empleado para la línea silvestre .

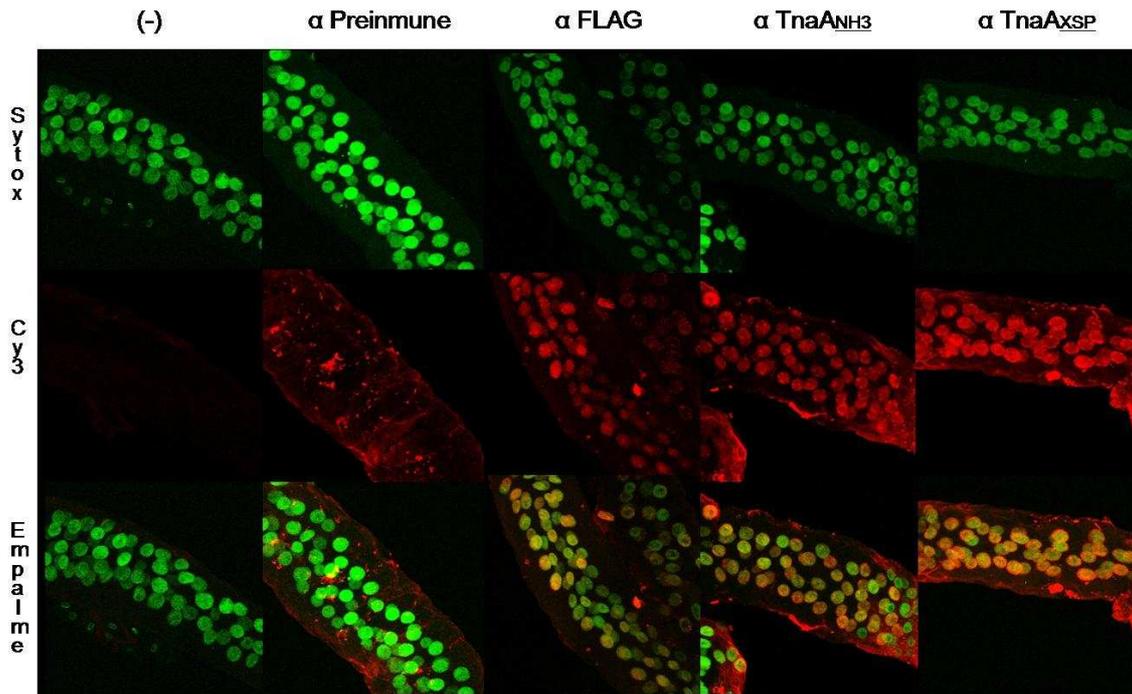


Figura 24. Localización de TnaA en glándulas salivales de la línea transgénica TnaA-FLAG. Las glándulas salivales disecadas de larvas de 3^{er} estadio de la clase *UAS-TnaA-FLAG/Sgs3-GAL4* de la línea TnaA-FLAG 9.1 de *D. melanogaster* fueron inmunoteñidas con los anticuerpos anti-FLAG, anti-TnaA_{NH3} y anti-TnaA_{XSPRING} preadsorbidos. Muestra sin anti-suero primario (-) y otra con suero preimmune (de rata TnaA_{XSPRING}). Como referencia el DNA se tiñó con Sytox-green. En la fila superior se observa la señal emitida por el Sytox-green (verde), en la fila intermedia la señal emitida por el fluoróforo Cy3 acoplado al anticuerpo secundario anti-IgG-rata (rojo), y en la fila inferior se muestra el empalme de ambas señales. La imagen es una proyección obtenida por microscopía confocal con un objetivo 20X.

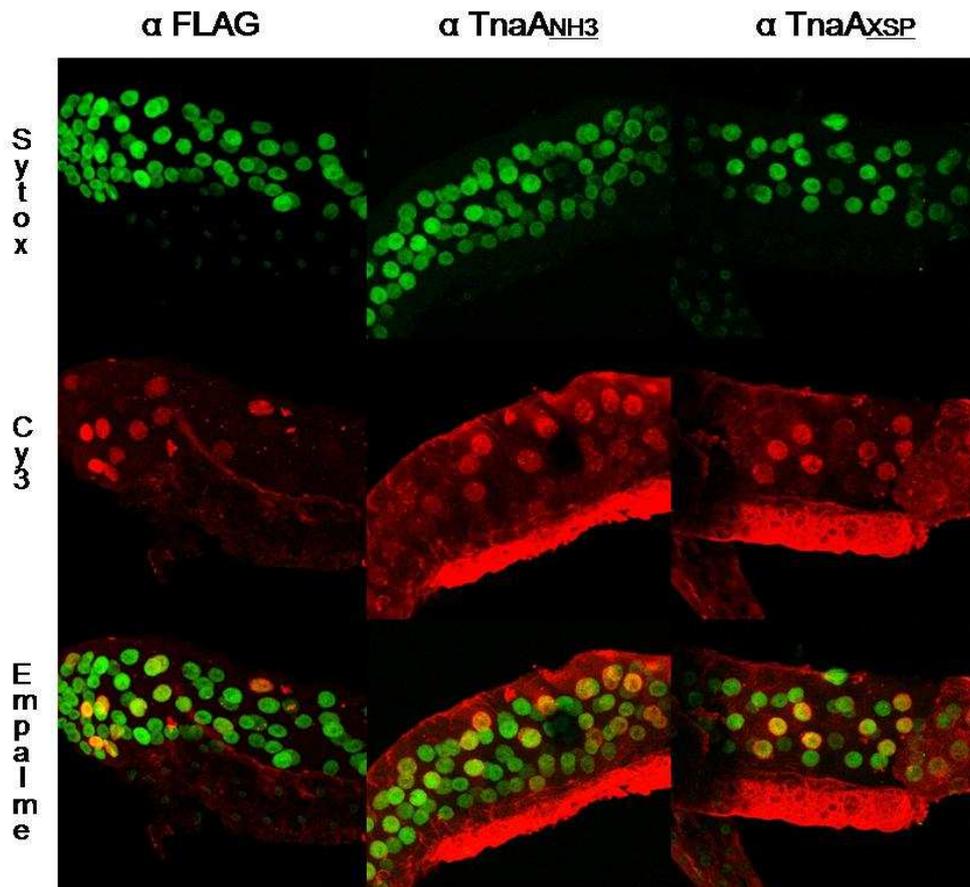


Figura 25. Localización de TnaA en glándulas salivales de la línea FLAG-TnaA. Las glándulas salivales disecadas de larvas de 3^{er} estadio de la clase *UAS-FLAG-TnaA/Sgs3-GAL4* de la línea TnaA-FLAG 3.1 fueron teñidas indirectamente con los anticuerpos anti-FLAG, anti-TnaA_{NH3} y anti-TnaA_{XSPRING} preadsorbidos. Como referencia el DNA fue teñido con Sytox-green. En la fila superior se observa la señal emitida por el Sytox-green (verde), en la fila intermedia la señal emitida por el fluoróforo Cy3 acoplado al anticuerpo secundario anti-IgG-rata (rojo), y en la fila inferior se muestra el empalme de ambas señales. La imagen es una proyección obtenida por microscopía confocal con un objetivo 20X.

En estas inmunotinciones (Figs. 24 y 25) sí fuimos capaces de detectar a TnaA-FLAG y FLAG-TnaA en los núcleos de las glándulas [las versiones etiquetadas de TnaA (rojo) colocalizan con los núcleos (verde)] con los tres anticuerpos (anti-FLAG, anti-TnaA_{NH3} y anti-TnaA_{XSPRING}).

En la Fig. 25, se observa que en la línea transgénica FLAG-TnaA, el número de núcleos teñidos con Sytox-green (verde) es mucho mayor a los inmunoteñidos con los anticuerpos contra TnaA y contra FLAG en contraste con lo observado con la línea TnaA-FLAG. Lo anterior sugiere que la versión FLAG-TnaA probablemente no se expresa abundantemente ó no puede ser detectada tan bien como la FLAG-TnaA como

sucedió con su detección con el anticuerpo anti-FLAG en los experimentos tipo Western de las Figs. 17 y 18.

Para tratar de determinar la localización de TnaA en glándulas silvestres se repitió la inmunotinción con el anticuerpo anti-TnaA_{XSPRING} incrementando la intensidad de imagen del rojo (Cy3) cuatro veces en un solo corte óptico (Fig 26).

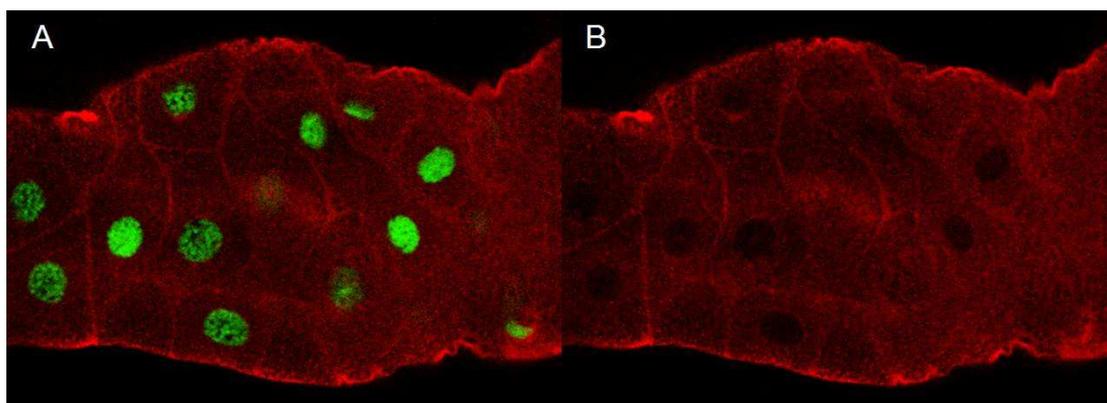


Figura 26. TnaA endógeno no se detecta con el anticuerpo anti-TnaA_{XSPRING} en glándulas salivales silvestres. El anticuerpo utilizado es anti-TnaA_{XSPRING} preadsorbido (rojo). En el panel (A) se observa la señal emitida por el Sytox-green (DNA, verde) y por el fluoróforo Cy3 acoplado al anticuerpo secundario anti-IgG-rata (rojo). En el panel (B) se observa únicamente la señal emitida por el fluoróforo Cy3. La intensidad de la señal emitida por Cy3 se aumento cuatro veces con respecto a la inicial estándar. La imagen es un corte óptico (longitudinal) obtenido por microscopía confocal con un objetivo 20X.

Como se observa, tampoco en estas condiciones fuimos capaces de detectar a TnaA endógeno. Debido a que en las figuras anteriores hemos mostrado que el anticuerpo anti-TnaA_{XSPRING} sí puede detectar a la versiones etiquetadas con FLAG, creemos que la proteína TnaA endógena nativa se encuentra en muy poca cantidad, se pierde en el procesamiento de las glándulas o no está accesible al anticuerpo en este tejido.

En contraste, con esta técnica, haciendo cortes ópticos de los núcleos a diferentes profundidades, encontramos que TnaA (detectada con el anticuerpo anti-TnaA_{XSPRING}) está en la región perinuclear formando agregados o cuerpos cercanos a la envoltura

nuclear en los núcleos de las glándulas salivales de larvas de 3er estadio de la línea transgénica 9.1 (FLAG-TnaA) (Fig. 27).

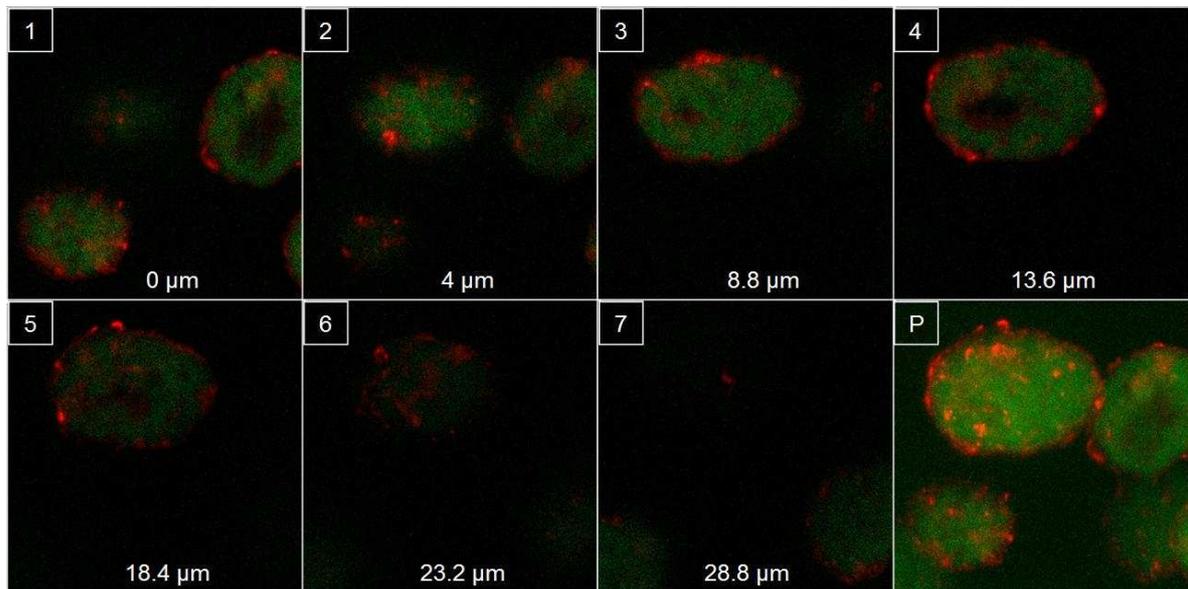


Figura 27. Localización de TnaA en núcleos de glándula salivales de la línea TnaA-FLAG. Las glándulas salivales de individuos *UAS-TnaA-FLAG/Sgs3-GAL4* de la línea TnaA-FLAG 9.1, fueron inmunoteñidas con los anticuerpos anti-TnaA_{XSPRING} preadsorbidos (rojo). Como referencia el DNA fue teñido con Sytox-green (verde). Se muestran siete imágenes correspondientes a diferentes cortes ópticos (1-7) y su respectiva distancia sobre el eje Z en micrómetros (0-28.8 μm). Se muestra una proyección (P) resultado de la suma de 37 cortes ópticos distribuidos en el eje Z en una distancia de 0-28.8 μm . Las imágenes fueron obtenidas por microscopía confocal con un objetivo de 63X.

En la proyección (P) (Fig. 27), se aprecia que TnaA (probablemente mayoritariamente TnaA-FLAG) forma una especie de malla que envuelve el núcleo. Debido a que hasta el momento los datos de la localización subcelular de TnaA silvestre en las glándulas silvestres no eran conclusivos, pensamos que la validez biológica del patrón de localización de TnaA-FLAG se debía tomar con cautela pues podría ser que no reflejara el patrón normal de localización de TnaA endógena, y fuera resultado del efecto de forzar la expresión de la versión etiquetada en este tejido.

Como no sabíamos si TnaA se perdía en la manipulación para hacer la inmunotinción de las glándulas salivales con el protocolo utilizado, se llevó a cabo una inmunotinción por la técnica de semi-squash (ver Materiales y Métodos), para así analizar con otro

método que permitiera disgregar el tejido de la glándula en condiciones más suaves (Fig. 28).

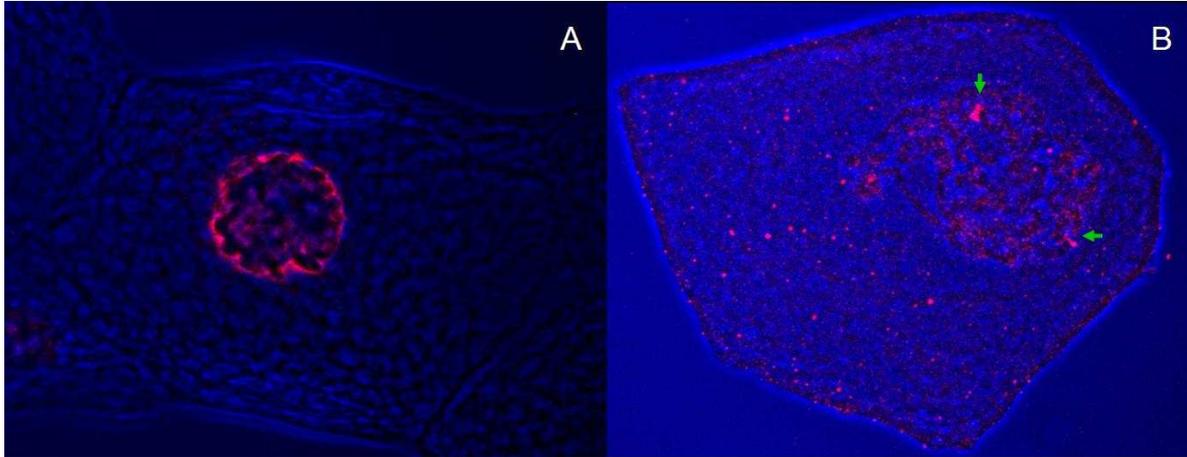


Figura 28. Distribución de TnaA en células aisladas de glándulas salivales silvestres y de las líneas TnaA-FLAG. Se muestra una célula de glándulas salivales de la línea TnaA-FLAG 9.1 (A) y de la línea silvestre *OreR* (B). Las muestras fueron inmunoteñidas con los anticuerpos anti-TnaA_{XSPRING} preadsorbidos (rojo). En el panel B se indica con flechas, bandas de los cromosomas politénicos inmunoteñidas. Las imágenes fueron obtenidas por microscopía confocal con un objetivo de 40X.

Aquí se observa que la localización de la TnaA-FLAG (rojo) (Fig. 28A) es muy similar a la observada en la Fig. 27, presentando mayoritariamente una distribución perinuclear, pero también se observa señal en la parte interna del núcleo que por la resolución de la técnica no se puede definir si está asociada a los cromosomas politénicos (sin embargo, ver más adelante Fig. 29). Por otro lado, de manera interesante en las células de glándulas silvestres (Fig. 28B) se observa a TnaA en notables bandas discretas en los cromosomas (← verde), lo cual claramente sugiere que TnaA nativa se encuentra asociada a la cromatina en células de glándulas salivales. Por tanto, el método de inmunolocalización por semi-squash resulta útil para observar la localización de TnaA endógeno en la glándula salival silvestre, pues

seguramente el nivel de densidad nuclear o alguna otra propiedad de los sitios de localización de TnaA, como la cromatina, permanecen intactos permitiendo el reconocimiento por los anticuerpos.

d) Presencia de TnaA en eucromatina de cromosomas politénicos silvestres.

Con estos resultados se repitió la inmunotinción de los cromosomas politénicos silvestres utilizando los anticuerpos preadsorbidos (Figura 29).

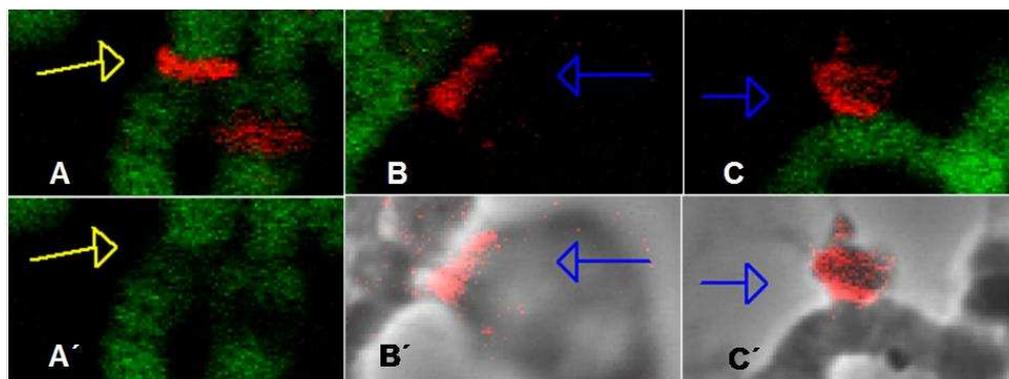
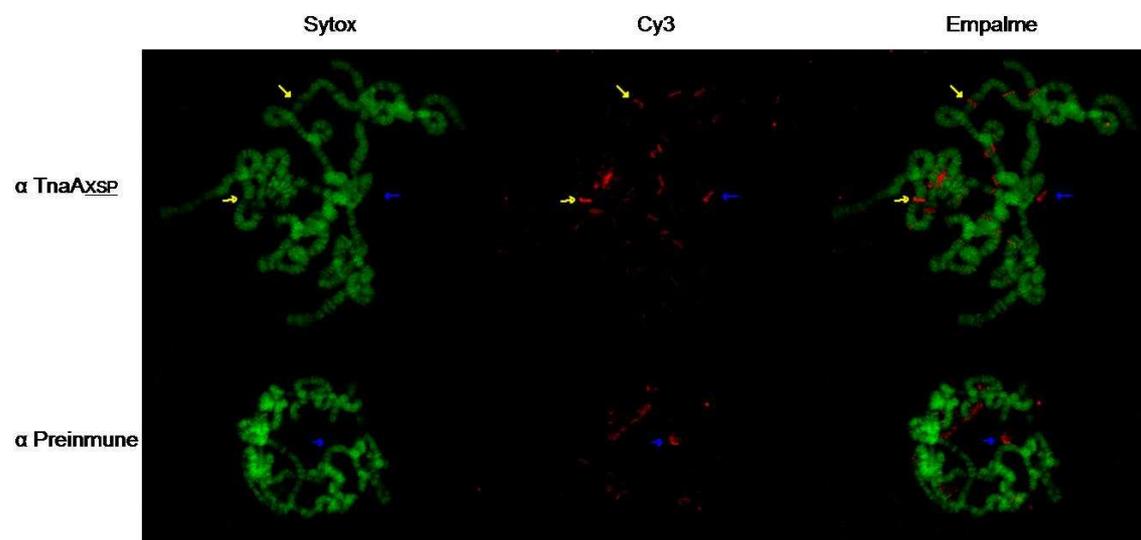


Figura 29. Localización de TnaA endógeno en los cromosomas politénicos de la línea silvestre. Los cromosomas politénicos de larvas de 3^{er} estadio de la línea silvestre *OreR* fueron inmunoteñidos con los anticuerpos anti-TnaA_{XSPRING}, como control una muestra con suero preimmune (de rata TnaA_{XSPRING}). Como referencia el DNA fue teñido con Sytox-green. En la columna izquierda se observa la señal emitida por el Sytox-green (verde), en la columna intermedia la señal emitida por el fluoróforo Cy5 acoplado al anticuerpo secundario anti-igG-rata (rojo), y en la columna derecha se muestra el empalme de ambas señales. En el panel inferior se muestra el acercamiento de diferentes regiones de los cromosomas politénicos indicados en el panel superior con flechas azules y amarillas (A, A', B, B', C y C'). Las imágenes fueron obtenidas por microscopía confocal con un objetivo de 40X.

En este experimento observamos que existe un poco de señal de fondo con el suero preinmune (C y C') y con el anticuerpo anti-TnaA_{XSPRING} (B y B'), y que ésta se localiza en el tejido adyacente o adherido al cromosoma como lo muestran las imágenes en campo claro (B y C').

Notoriamente, el anticuerpo anti-TnaA_{XSPRING} fue capaz de reconocer bandas discretas y específicas correspondientes a TnaA (rojo) (→ amarilla, A) distribuidas en el cromosoma politénico. Todas las bandas parecen encontrarse en sitios de cromatina laxa (eucromatina) pues no se aprecia colocación con el DNA (verde) y en algunos casos en probables sitios de alta transcripción ("puff") (→ amarilla, A y A'). Estas observaciones son coherentes con el hecho de que *tna* es un gen requerido para el mantenimiento de la transcripción de genes homeóticos (grupo trithorax), lo cual explicaría su localización. Con este experimento se mostró que TnaA endógena se encuentra asociada a cromosomas politénicos y que la adsorción del anti-suero es un método que funciona para obtener una tinción específica y que mejora la inmunotinción de los cromosomas politénicos a partir de suero no purificado.

El siguiente paso fue utilizar este método de inmunotinción con cromosomas politénicos de glándulas de la línea transgénica TnaA-FLAG (Fig. 30).

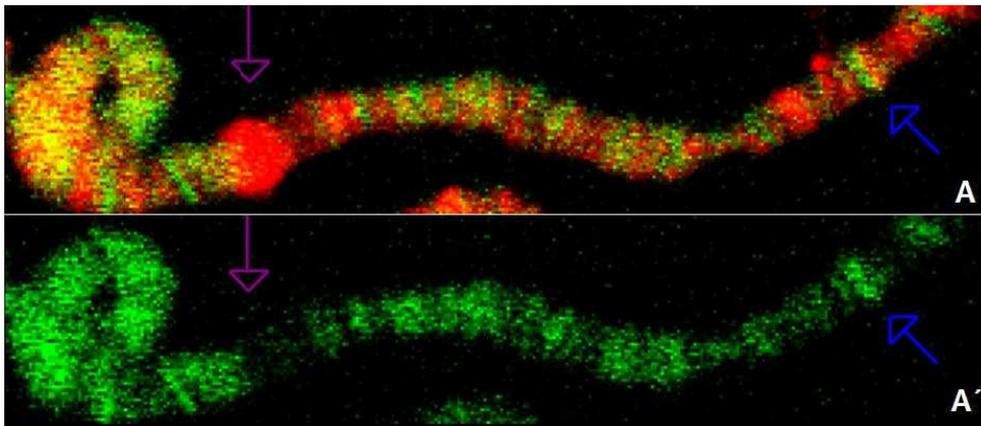
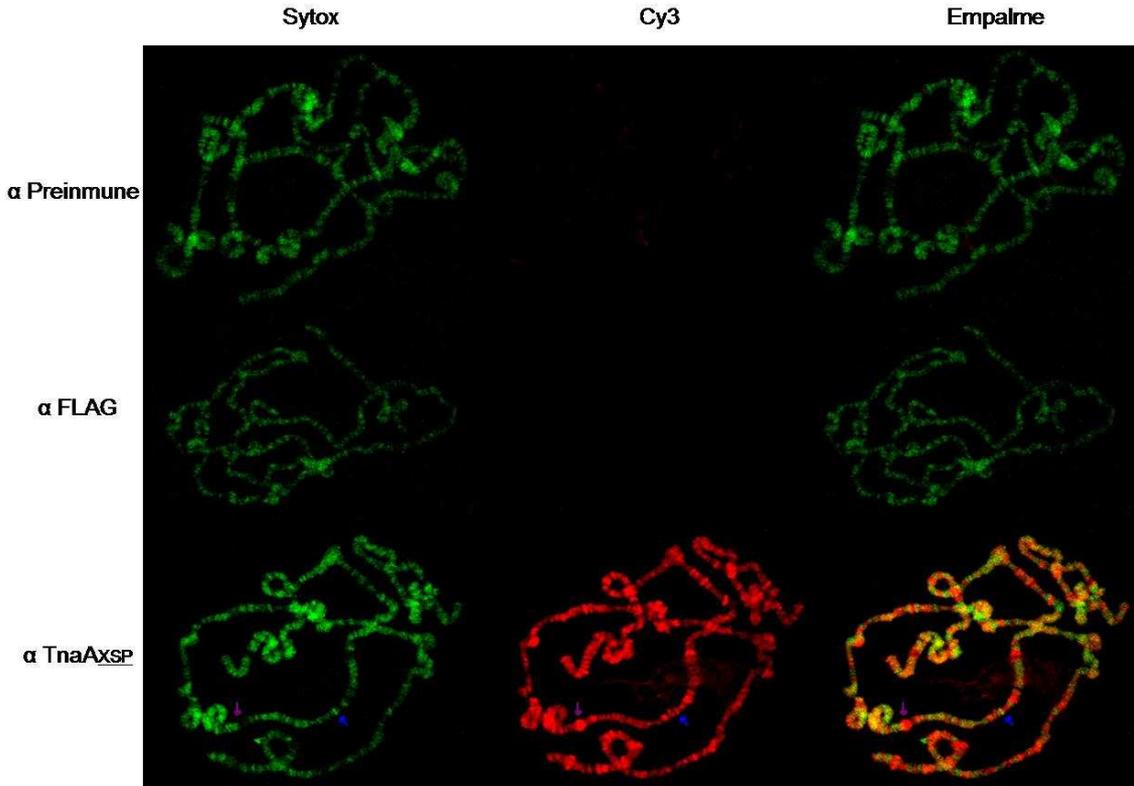


Figura 30. Localización de TnaA en cromosomas politénicos de la línea TnaA-FLAG. Los cromosomas politénicos de larvas de 3^{er} estadio de la clase *UAS-TnaA-FLAG-Sgs3-GAL4* de la línea TnaA-FLAG 3.1 fueron inmunoteñidos con los anticuerpos anti-FLAG y anti-TnaA_{XSPRING}. Como control una muestra se trató con suero preimmune (de rata TnaA_{XSPRING}). Como referencia el DNA fue teñido con Sytox-green. En la columna izquierda se observa la señal emitida por el Sytox-green (verde), en la columna intermedia la señal emitida por el fluoróforo Cy5 acoplado al anticuerpo secundario anti-IgG-rata (rojo), y en la columna derecha se muestra el empalme de ambas señales. En el panel inferior se muestra el acercamiento de diferentes regiones de los cromosomas politénicos (A y A') indicadas en la figura superior con flechas moradas y azules. Las imágenes fueron obtenidas por microscopía confocal con un objetivo de 40X.

Como se puede apreciar (Fig. 30), el anticuerpo anti-TnaA_{XSPRING} muestra una señal generalizada a todo lo largo de los cromosomas de la línea transgénica TnaA-FLAG (rojo) que es muy diferente a la obtenida en los cromosomas politénicos de moscas

silvestres con el mismo anticuerpo que muestra bandas discretas (Fig. 29). Además se observa una señal de mucho mayor intensidad en muchos sitios de eucromatina (← morada), así como la presencia de colocación con dominios de cromatina compacta (heterocromatina)(← azul), lo cual muestra que si bien TnaA-FLAG mantiene la capacidad, de localizarse en cromosomas politénicos al igual que TnaA silvestre, lo hace en un patrón mucho más abundante y de mayor intensidad. Esto nos permite validar a esta línea transgénica para llevar a cabo experimentos bioquímicos que en la línea silvestre pueden ser más difíciles, debido a la menor abundancia de la proteína endógena.

Nuevamente no se observó ninguna señal con el anticuerpo anti-FLAG, lo cual sugiere que el plegamiento o la interacción de TnaA-FLAG cuando está asociada al cromosoma, deja inaccesible el dominio FLAG para los anticuerpos, pues en glándulas salivales completas la proteína TnaA-FLAG se observa enriquecida en la zona perinuclear (Figuras 27 y 28), donde probablemente mantenga accesible o expuesto el dominio FLAG.

e) TnaA colocaliza con Osa en cromosomas politénicos silvestres.

Un gen que interacciona de manera muy notoria con *tna*, es *osa* (Gutiérrez *et al.*, 2003). *osa* codifica para una subunidad de uno de los complejos Brahma, el complejo BAP. Esta subunidad al igual que otras del complejo se han encontrado en cromosomas politénicos (Mohrmann *et al.*, 2004), por lo tanto es posible que alguna de las proteínas codificadas por *tna* (TnaA y/o TnaB) interaccione físicamente con Osa en algún compartimento celular, en particular en los cromosomas politénicos. Por lo tanto se realizó una inmunotinción doble con anticuerpos anti-Osa y anti-TnaA_{XSPRING} (que

reconoce exclusivamente a TnaA y no a TnaB) para determinar si Osa y TnaA colocalizan en algunas de las bandas de los cromosomas politénicos (Fig. 31).

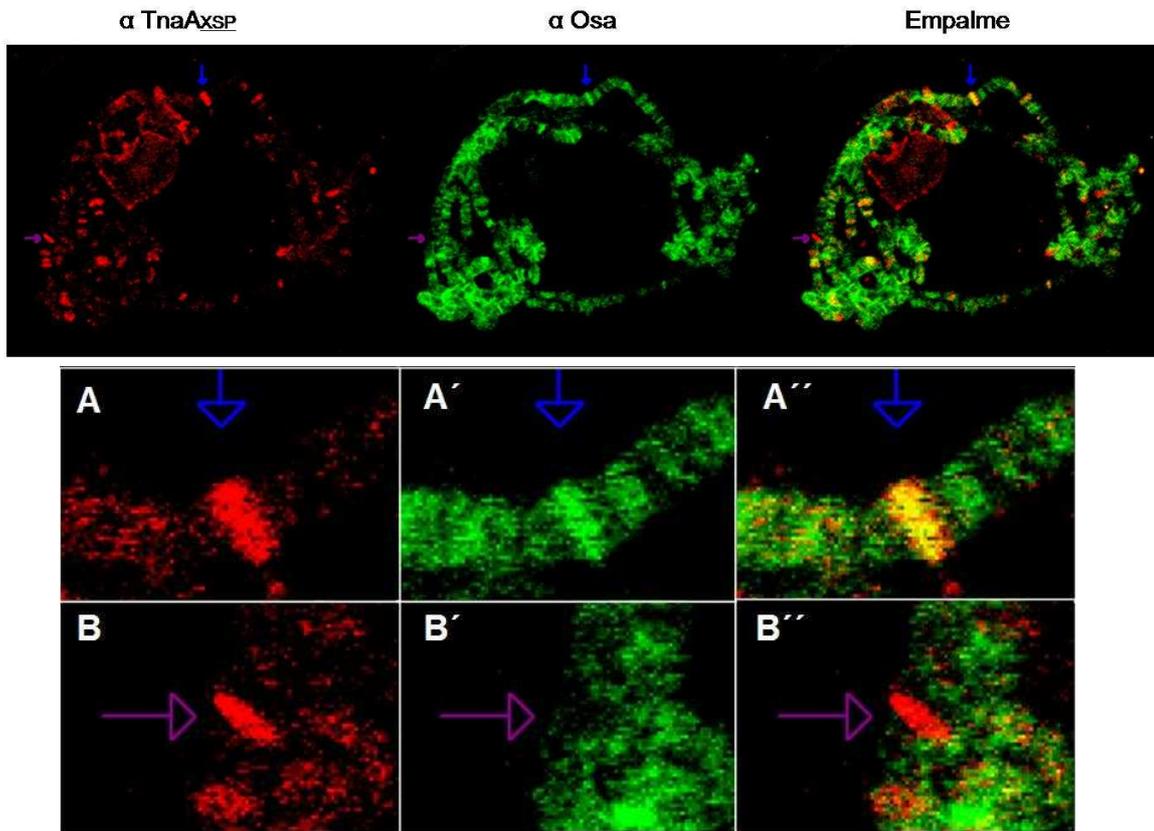


Figura 31. Colocalización de TnaA y Osa en cromosomas politénicos de la línea silvestre. Los cromosomas politénicos de larvas de 3^{er} estadio de la línea silvestre *OreR* fueron inmunoteñidos con los anticuerpos anti-TnaA_{XSPRING} preadsorbidos (rojo, columna izquierda) y anti-Osa (verde, columna intermedia). La señal roja es emitida por el fluoróforo Cy5 acoplado al anticuerpo secundario anti-IgG-rata, y la verde es emitida por el fluoróforo Cy3 acoplado al anticuerpo secundario anti-IgG-ratón. En la columna derecha se muestra el empalme de ambas señales. En el panel inferior se muestra el acercamiento de diferentes regiones de los cromosomas politénicos donde se muestra un ejemplo de colocalización de las proteínas (A–A'', flecha azul en el panel superior) y otro en el que no la hay (B–B'', flecha morada panel superior). Las imágenes fueron obtenidas por microscopía confocal con un objetivo de 40X.

En la Figura 31 se observa nuevamente que la proteína TnaA se localiza en algunas bandas en el cromosoma, y por otra parte la proteína Osa tiene una distribución de bandeado más generalizado. De forma interesante, las proteínas TnaA y Osa colocalizan en varios sitios de bandas claramente definidas (← azul) (A – A''), aunque también hay sitios donde TnaA no colocaliza con Osa (← morada) (B – B''). Esta colocalización sugiere que probablemente TnaA y Osa interaccionen física y/o funcionalmente. Puede ser que esta interacción esté relacionada al reclutamiento ó a la funcionalidad del

complejo Brahma o de alguna(s) subunidad(es), específicamente del complejo BAP. *tna* también interacciona con *brm* (Gutiérrez *et al.*, 2003) que codifica para la ATPasa de los complejos BAP y PBAP. La presencia de TnaA en bandas donde no se encuentra Osa, podría explicarse si TnaA está asociada también al complejo PBAP el cual contiene a Brahma pero carece de Osa.

5.- Búsqueda de secuencias consenso de unión a SUMO en TnaA y en proteínas con las que posiblemente interaccione físicamente.

Como se mencionó previamente (ver Introducción), SUMO puede interaccionar con proteínas de manera covalente y no covalente. Dado que en trabajos previos del grupo se ha encontrado la interacción genética de *tna* con genes que codifican para proteínas involucradas con la transcripción de los genes homeóticos, nos pareció importante buscar la presencia de secuencias consenso de unión covalente y de unión no-covalente (SIM) que pudieran funcionar para que estas proteínas interaccionen con SUMO. En la Tabla 3 se presentan los resultados de este análisis.

Proteína	Secuencias consenso probables	
	Covalente	No-covalente (SIM)

	#	Posición(es) (de a.a.)	Secuencia(s)	#	Posición(es) (de a.a.)	Secuencia(s)
TnaA	2	17; 918	EKVKEEI;PVIKQEL	1	868	EVIID
Brahma	7	496;499;557 631;705;737 1000	ATEKLEK;KLEKQQK; REQKKEQ;IQFKKEL; HKPKVEE;TKAKVED; RRLKKEV	4	656;828;983 ;1190	VHVVE;LII VP;ILIIR; TVVIF
Osa	7	134;1771;20 28; 2062;2111;2 156; 2544	PGVKEEY;QLVKKEL; DVFKESEI;PEIKTEE; AEVKKEP;TTAKDEA; ATVKAET	2	2025;2033	GIIDV;EIV NI
Moirá	4	436;610; 758;906	SSAKEDM;TGIKTEA AAIKDEV;VDIKTED	3	174;187;466	VEIVS;IVY PVV; IHVIE
Skuld	6	762; 830; 919;1125; 2026; 2044	MAIKQEP;KRPKMEK; LNIKTEP;KMKQEY; DNIKLEP; NEIKQEP	5	1114;1852;1 887;2131; 334	VTVVAI;SV VVG; VVYVVV; IQIIS;VVEV V
Kismet	16	1553;1696;1 758; 1767;1857;2 262; 2517;2701;3 158; 3275;3623;3 631; 3662;3680;3 689; 3693	SPVKKDK;EKFKTEG; KESKPEE;ETVKTEE; ESVKKEN;LAPKEET; QLSKKEI;ECFKVEK; VEAKKDS;EELKLQQ; RTIKLEA;NAEKAEK; ASVKNEV;SVIKKES; TPIKEEI;EEIKSEE	6	1062; 2105;2268;2 442; 4030;4576	PIIPV; NVVVY; TIEV;TVII Y;DVITI;VP VIN

Tabla 3. Secuencias de unión covalente y no covalente de TnaA y de algunas de las proteínas cuyos genes interactúan con tna. Las secuencias de cada proteína se tomaron de “<http://flybase.org>”. La búsqueda de secuencias consenso de sumoilación de tipo covalente (**ΨKXE**) se hizo con el programa “Group-based Prediction System – SUMOsp 2.0 (Ren *et al.*, 2009), donde se utilizó el nivel de umbral alto (*threshold high*). La búsqueda de la secuencia consenso de sumoilación no-covalente (V/I-X-V/I-V/I) se hizo manualmente (basado en Kerscher, 2007).

Como se puede observar, las secuencias de todas las proteínas analizadas contienen más de una secuencia consenso para la unión covalente y no covalente de SUMO. En particular, TnaA tiene los dos tipos de secuencias consenso, dos de unión covalentes y una de unión no-covalente. Las tres secuencias se encuentran fuera del dominio XSPRING, una en el extremo amino (covalente), y los dos restantes en el extremo carboxilo (covalente y no-covalente). Una característica de las E3 ligasas de SUMO del

tipo SP-RING es que se unen a SUMO vía un dominio SIM (ver Introducción), lo cual es coherente con la idea de que TnaA sea una E3 ligasa de SUMO. Debido a que ambas secuencias consenso son muy cortas, es frecuente encontrarlas y es posible que varias de ellas no sean funcionales. Para encontrar cuáles de ellas son funcionales *in vivo* es necesario probar experimentalmente cada una de ellas. La información de la Tabla será útil para construir versiones mutantes de estos sitios en cada proteína. Tomando en cuenta la idea de que SUMO es una molécula de unión de complejos multiproteicos (Matunis *et al.*, 2006), podría ser factible que TnaA como probable E3 ligasa de SUMO, sumoile diferentes subunidades o componentes de complejos relacionados y/o necesarios para la transcripción de determinados genes, en este caso, de los genes homeóticos (ver Introducción).

DISCUSION

Todas las proteínas con dedo de zinc tipo SP-RING estudiadas hasta la fecha poseen actividad de E3 ligasa de SUMO. Dado que TnaA contiene un dedo de zinc de este tipo, uno de los modelos que manejamos en el laboratorio es que TnaA puede ser una E3 ligasa de SUMO. Para poder probar esta hipótesis se requieren diversas herramientas que permitan determinar su localización subcelular, las proteínas con las que se asocie, su dinámica en el desarrollo de *Drosophila*, etc. Por tanto, los objetivos principales de este trabajo fueron generar y mejorar algunas herramientas para el estudio bioquímico de TnaA en los aspectos de inmunorreconocimiento e interacción física, y el establecimiento de líneas transgénicas de *Drosophila* que expresen TnaA etiquetada molecularmente en tejidos

extremo amino (covalente), y los dos restantes en el extremo carboxilo (covalente y no-covalente). Una característica de las E3 ligasas de SUMO del tipo SP-RING es que se unen a SUMO vía un dominio SIM (ver Introducción), lo cual es coherente con la idea de que TnaA sea una E3 ligasa de SUMO. Debido a que ambas secuencias consenso son muy cortas, es frecuente encontrarlas y es posible que varias de ellas no sean funcionales. Para encontrar cuáles de ellas son funcionales *in vivo* es necesario probar experimentalmente cada una de ellas. La información de la Tabla será útil para construir versiones mutantes de estos sitios en cada proteína. Tomando en cuenta la idea de que SUMO es una molécula de unión de complejos multiproteicos (Matunis *et al.*, 2006), podría ser factible que TnaA como probable E3 ligasa de SUMO, sumoile diferentes subunidades o componentes de complejos relacionados y/o necesarios para la transcripción de determinados genes, en este caso, de los genes homeóticos (ver Introducción).

DISCUSION

Todas las proteínas con dedo de zinc tipo SP-RING estudiadas hasta la fecha poseen actividad de E3 ligasa de SUMO. Dado que TnaA contiene un dedo de zinc de este tipo, uno de los modelos que manejamos en el laboratorio es que TnaA puede ser una E3 ligasa de SUMO. Para poder probar esta hipótesis se requieren diversas herramientas que permitan determinar su localización subcelular, las proteínas con las que se asocia, su dinámica en el desarrollo de *Drosophila*, etc. Por tanto, los objetivos principales de este trabajo fueron generar y mejorar algunas herramientas para el estudio bioquímico de TnaA en los aspectos de inmunorreconocimiento e interacción física, y el establecimiento de líneas transgénicas de *Drosophila* que expresen TnaA etiquetada

molecularmente en tejidos y/o etapas del desarrollo específicas. Utilizando estas herramientas fuimos capaces de demostrar que TnaA está en los cromosomas politénicos de larvas de 3^{er} estadio de líneas silvestres y de líneas transgénicas con TnaA etiquetada con FLAG. Un logro lateral que se desprende del trabajo de esta tesis, fue encontrar la forma de solubilizar la proteína de fusión GST-TnaA_{XSPRING} hecho que se discute brevemente en el inicio de esta sección.

Solubilización del dominio XSPRING

En el pasado habíamos probado sin éxito muchas metodologías para solubilizar la proteína de fusión GST-TnaA_{XSPRING}. En una de las estrategias para la purificación de los anticuerpos anti-TnaA utilizadas en esta tesis, se logró inesperadamente la elusión de la proteína de fusión GST-TnaA_{XSPRING} (Fig. 19). El problema para eluir esta proteína en otros protocolos, podría involucrar al dedo de zinc SP-RING. A través de este dedo, la proteína podría estar formando un dímero ó unirse fuertemente a la resina de glutatión-sefarosa. En algunos ejemplos se ha utilizado guanidina-HCl 3 M para disgregar dímeros de glutatión-S-transferasa (GST) ó de proteínas de fusión con GST (Hengen, 1997). Algunas proteínas pueden sufrir cambios conformacionales cuando se encuentran en pH bajos, como la β -lactoglobulina, que se encuentra como dímero a pH 6.5 y como monómero a pH 2 (Mills y Creamer, 1975). Cuando proteínas que contienen dedos de zinc u otros iones metálicos asociados a estos, son sometidas a cambios de pH más bajo (por ejemplo de 6.1 a 3.6), liberan reversiblemente el ión Zn^{2+} (Vedejs y Martinez, 1979), lo cual haría factible el rompimiento de alguna interacción física del dedo de zinc con algún otro dominio. Creemos que la explicación más probable del desprendimiento de GST-TnaA_{XSPRING} de las perlas de glutatión-sefarosa fue el bajo pH

(2.5) de la solución de glicina-HCl 0.1M utilizada en teoría, para eluir únicamente a los anticuerpos unidos a la proteína de fusión acoplada a la resina de glutatión-sefarosa. Esto nos permitirá trabajar con el dominio XSPRING ya sea en ensayos de actividad, interacción y/o una nueva purificación de anticuerpos.

TnaA como activador transcripcional. Dominios ricos en glutamina.

Para identificar proteínas que interaccionan físicamente con TnaA en el laboratorio hemos empezado a utilizar el ensayo de dos híbridos en levadura. Se consideró que la “carnada” ideal sería TnaA completa contra una biblioteca de proteínas “presas” de una etapa del desarrollo de *Drosophila* donde se encuentre TnaA y sus posibles interactores identificados genéticamente.

Una de las pruebas de confiabilidad para la selección de la “carnada” es que ésta, unida al BD, no debe activar la transcripción de los genes reporteros. En esta tesis mostramos que la proteína de fusión BD-TnaA activa la transcripción de por lo menos dos de los cuatro genes reporteros del sistema de dos híbridos utilizado (Clontech) (Figs. 10 y 11). Más adelante J. L. Monribot (Tesis Doctoral en curso) mostró que BD-TnaA activa a los cuatro genes reporteros de este sistema. Con estos resultados se determinó que BD-TnaA no puede ser utilizada en este ensayo como carnada. El hecho de que TnaA sea capaz de activar la transcripción en *S. cerevisiae* cuando está unida al DNA a través del dominio de unión a DNA de GAL4, se puede deber a los dominios ricos en glutamina (Q) que contiene TnaA y que están presentes en muchos factores de transcripción (Xiao y Jeang, 1998).

Será interesante determinar si TnaA también puede activar ó promover la activación de la transcripción en *D. melanogaster*, así como determinar quién puede ser el interactivo

físico de TnaA que provea del dominio de unión al DNA en este organismo. Un candidato interesante para esta función es Osa que es una subunidad de uno de los complejos BRM (BAP). Osa contiene un dominio ARID (Vázquez *et al.*, 1999) que le permite unirse a secuencias ricas en AT y con la que *tna* interacciona genéticamente de una manera notoria (Gutiérrez *et al.*, 2003).

TnaA como activador transcripcional. La sumoilación.

Otro mecanismo que podría contribuir al hecho de que TnaA puede activar la transcripción de genes en levadura y posiblemente en *Drosophila* tiene que ver con su posible función como E3 ligasa de SUMO. Entre otras funciones, se cree que las moléculas de SUMO promueven y facilitan la unión de proteínas para formar diferentes tipos de complejos (Matunis *et al.*, 2006). Las proteínas cuyos genes interaccionan con *tna* poseen más de un sitio candidato de sumoilación (Tabla 3). La misma proteína TnaA contiene dos sitios de unión a SUMO muy probables dentro del dominio XSPRING, uno de tipo covalente y uno no covalente (SIM), así como un tercero de menor probabilidad en el extremo amino de tipo covalente (ver Tabla 3). En este contexto, podría ser que TnaA esté involucrado en un mecanismo de reclutamiento o formación, dependiente(s) de SUMO, de complejos entre proteínas involucradas en sumoilación y transcripción, como por ejemplo componentes del complejo SWI/SNF (levadura) ó BRM (*Drosophila*).

La sumoilación y sus efectos en transcripción.

La mayoría de los ejemplos de la sumoilación de las proteínas relacionadas con regulación transcripcional conlleva a la represión de la misma (entre otros, Shiio y

Eisenman, 2003; Savare *et al.*, 2005). En *Drosophila*, la regulación del transporte y la localización subcelular de los factores de transcripción Dorsal, Bicoid, p73 α y Pdx1 se han relacionado con la sumoilación de los mismos, y en algunos casos, la modificación más bien favorece la actividad transcripcional de la proteína en cuestión (revisado en Hilgarth *et al.*, 2004). Sin embargo, en algunos casos, la relocalización de las proteínas por E3 ligasas de SUMO, no requiere de la sumoilación de las proteínas transportadas (Sachdev *et al.*, 2001 y revisado en Sharrocks, 2006).

Yang y Sharrocks (2005) muestran que el factor de transcripción Elk-1 es coactivado por PIASx alfa (independientemente de su actividad de E3 ligasa de SUMO). En un estado basal, la actividad transcripcional de Elk-1 está reprimida por el reclutamiento de HDAC-2 (desacetilasa de histona-2) a través del motivo-R de una forma SUMO-dependiente. La unión de PIASx alfa a Elk-1 provoca varios efectos: 1) promueve la remoción de HDAC-2 y de SUMO, 2) facilita la fosforilación de Elk-1 y 3) promueve la asociación de Elk-1 con HATs (acetil-transferasas de histona). Todo esto resulta en un aumento de la actividad transcripcional de Elk-1. Este proceso de activación requiere que Elk-1 esté sumoilado y de la integridad del dominio SIM de PIASx alfa.

En el ejemplo mencionado en el párrafo anterior, resulta interesante que una E3 ligasa de SUMO (PIASx alfa) promueva la des-sumoilación de su proteína de interacción (Elk-1), cuando normalmente las E3 ligasas se definen como proteínas que promueven la sumoilación y el reconocimiento de los blancos de SUMO. En *Drosophila*, la subunidad del complejo BRM, Snr1, es requerida para reprimir y restringir la actividad del complejo durante el desarrollo y de forma célula-específica. Snr1, muy probablemente en asociación con HDAC, inhibe la actividad de ATPasa de la subunidad catalítica Brahma (Marenda *et al.*, 2004). De forma similar, las subunidades del

complejo BRM, Osa y Moira son requeridas para la represión de genes blanco de Wingless (Wg), probablemente en cooperación con Groucho y la HDAC Rpd3 (Collins y Treisman, 2000). Posiblemente alguna(s) subunidad del complejo BRM se encuentre en una forma inactiva en un determinado contexto, y requiera de la presencia de TnaA para coactivar la transcripción mediante la remoción de SUMO (en un proceso similar a PIASx alfa) y/ó de HDACs.

TnaA en la cromatina interfásica.

El gen *tna* se requiere para la expresión de los genes homeóticos en *Drosophila*. Es posible que TnaA esté directamente asociado a la cromatina ya que interacciona genéticamente con genes que codifican para diversas proteínas que modifican a la cromatina (Gutiérrez *et al.*, 2003). Durante mi tesis de Licenciatura (2007) generé anticuerpos policlonales contra diferentes regiones de TnaA. Después de ensayar diversas metodologías para purificar los anticuerpos preparados previamente (Figs. 16-21), en este trabajo logramos demostrar que los anticuerpos policlonales contra TnaA sí funcionan para ensayos de inmunotinción y reconocen a la proteína TnaA nativa (Figs. 24 Y 25 y 27-31).

Uno de los objetivos de esta tesis fue determinar si TnaA se une a la cromatina interfásica. En este trabajo muestro, por la técnica de inmunotinción, que TnaA se encuentra en los cromosomas politénicos de larvas de 3er instar de *Drosophila silvestres* y de líneas transgénicas con TnaA etiquetado con el epítoto FLAG (Figs. 29 y 30) . Los núcleos donde se encuentran estos cromosomas hiperamplificados están en interfase y por lo tanto, algunas regiones de esta cromatina están disponibles para la transcripción. Las proteínas como Brahma, la RNA polimerasa II (Armstrong *et al.*, 2002) ó SUMO (Capelson y Corces, 2006) se encuentran en la mayoría de las bandas de los

cromosomas politénicos. Es notorio que a diferencia de las proteínas mencionadas, en este trabajo mostramos que TnaA se encuentra en un mucho menor número de bandas, en un patrón discreto y específico, preferencialmente en la cromatina laxa (eucromatina, Fig. 29) lo que sugiere que TnaA lleva a cabo alguna función relacionada probablemente a la sumoilación y/o a la transcripción en zonas específicas del genoma. TnaA pudiera ser entonces responsable de la sumoilación u otra modificación (si es que no es una E3 ligasa de SUMO) de alguna proteína asociada a la cromatina sólo en determinados *loci*.

Encontramos que la expresión ectópica de las versiones etiquetadas FLAG-TnaA y TnaA-FLAG causa letalidad en *Drosophila*. No determinamos en qué etapa del desarrollo mueren estos animales pero no encontramos adultos en condiciones de expresar las proteínas etiquetadas (Tablas 1 y 2) en ninguna de las líneas transgénicas probadas. Esto nos indica que la regulación de los sitios y ó etapas donde *tna* se expresa debe estar modulada finamente. Sin embargo, sí logramos la expresión de las versiones etiquetadas FLAG-TnaA y TnaA-FLAG en las glándulas salivales de larvas de 3er instar (Figs. 13 y 15) sin detectar ningún efecto deletéreo de esta expresión ni en larvas ni en adultos.

La versión etiquetada sobreexpresada de TnaA, TnaA-FLAG, también se localiza en los cromosomas politénicos (Figura 30) de las líneas transgénicas (*UAS-TnaA-FLAG/Sgs-GAL4*) y puede ser detectada con el anticuerpo que generé contra la proteína de fusión GST-TnaA_{XSPRING} (no con el anti-FLAG). En este caso, el número de bandas eucromáticas en donde se detecta TnaA es mucho mayor que el observado en los cromosomas silvestres (Fig. 29 y 30) sin tener un efecto tóxico. Ya que TnaA-FLAG

retiene su capacidad de unirse a la cromatina, específicamente a la eucromatina, creemos que esta forma etiquetada puede ser utilizada en otros experimentos bioquímicos como coimmunoprecipitaciones con diversas proteínas. Es notorio que con el anticuerpo comercial anti-FLAG podemos detectar esta versión etiquetada en análisis tipo Western de extractos solubles de las glándulas salivales de las líneas transgénicas (Figs. 13 y 15) pero no en los cromosomas politénicos (Fig. 30).

¿A qué podría estar unida TnaA en los cromosomas politénicos? Algunas de las proteínas del grupo trithorax que interaccionan genéticamente con *tna*, como Brahma (Armstrong *et al.*, 2002), Kismet (Srinivasan *et al.*, 2008) y Osa (Mohrmann *et al.*, 2004) se encuentran altamente asociadas a cromosomas politénicos. En este trabajo mostramos que TnaA colocaliza en algunas bandas eucromáticas con Osa (Fig. 31 A'') y en otras no (Fig. 31 B''). A pesar de que esta metodología sólo nos sirve para visualizar esta colocalización, esta información nos permitirá afinar más nuestros modelos de trabajo para demostrar si Osa y TnaA puedan interaccionar físicamente o si están en el mismo complejo proteico. Por ejemplo el hecho de no encontrar siempre a Osa y a TnaA juntos nos obliga a predecir que existe(n) alguna(s) característica(s) de Osa, TnaA ó la cromatina donde se encuentran, que podrían influir en este patrón de colocalización.

Por ejemplo, en la literatura encontramos que, a pesar de que Osa es una proteína del grupo trithorax que se requiere para el mantenimiento de la expresión de los genes homeóticos (Vázquez *et al.*, 1999), Osa también puede reprimir directamente a otros genes. Este es el caso del gen blanco de Wg, *Distal-less (Dll)*, en la región de la bolsa "pouch" del disco imagal de ala (Collins y Treisman , 2000). Para que *Dll* pueda ser activado, requiere de la presencia de dos proteínas que son subunidades del complejo

transcripcional Mediador, Kto y Skd (Carrera *et al.*, 2008). *tna* interacciona genéticamente tanto con *skd* como con *osa*. Por lo tanto, una hipótesis sería que TnaA se uniera a Osa sumoilada (Nie *et al.*, 2009) a través de su dominio SIM (ver Tabla 3) y facilitara el reclutamiento del complejo Mediador a través de algún tipo de interacción con Kto y Skd, como lo sugieren las interacciones genéticas (Gutiérrez *et al.*, 2003). Esto promovería un cambio o “switch” en la función de las subunidades BRM, que involucraría la modificación del equilibrio entre proteínas de Represión/Activación en genes, como los homeóticos, que requieran del complejo BRM y de *tna* para su expresión.

Por otro lado, se sabe que diversas proteínas como las histonas H2A y H2B, las topoisomerasas, y las HDACs se sumoilan, y que la E3 ligasa de SUMO Mms21 se encuentra unida a los cromosomas (Zhao y Blobel, 2005; Nie *et al.*, 2009). Además, SU(VAR)2-10, la única otra proteína codificada por el genoma de *Drosophila* que contiene un SP-RING también se encuentra asociada a cromosomas politénicos (Hari *et al.*, 2001). Hay cada vez más ejemplos de proteínas que forman parte ó que están asociadas a la cromatina. Es posible que TnaA pudiera interaccionar físicamente con alguna(s) de éstas u otras proteínas de la cromatina para ejercer su función.

La sumoilación y la expresión de los genes homeóticos.

tna es requerido para la expresión de genes homeóticos (Gutiérrez *et al.*, 2003) y un modelo es que TnaA pudiera ser una E3 ligasa de SUMO. Hasta la fecha existen pocos ejemplos que vinculen directamente la sumoilación con el mantenimiento de los patrones de expresión de los genes homeóticos. Uno de ellos se encontró en

Caenorhabditis elegans (*C. elegans*), donde se observó que la proteína del PcG, SOP-2 (Polyhomeotic, PH y Sex Combs on Midleg, SCM en *Drosophila*) se une a la E2 Ubc9 a través del dominio SAM, lo que permite la sumoilación de SOP-2 *in vivo*. Esta modificación promueve la localización de SOP-2 a dominios o cuerpos nucleares lo que permite su función para el mantenimiento de la represión de los genes homeóticos (Zhang *et al.*, 2004b). La disrupción generalizada de la sumoilación imita ó fenocopia la falta de SOP-2 y por lo tanto, con este tratamiento, se observan fenotipos de expresión ectópica de los genes HOX y consecuentemente transformaciones homeóticas. Aunado a esto, se encontró que la proteína SOP-2 se une directamente a fragmentos de RNA a través del dominio FCS (“Four Conserved Cysteines”) lo cual contribuye a la localización de SOP-2 en los *loci* o secuencias blanco (Zhang *et al.*, 2004a). SOP-2 también interacciona físicamente con la proteína del PcG llamada SOR-1 y ambas actúan sinérgicamente en el mantenimiento de la represión de los genes homeóticos en *C. elegans* (Zhang *et al.*, 2006).

El otro ejemplo involucra a una proteína PIAS, pero éste no necesariamente involucra a la sumoilación. Las proteínas PIAS, tienen un dedo de zinc tipo SP-RING. Todas ellas poseen actividad de E3 ligasa de SUMO. Se ha encontrado que las proteínas Miz1 y PIAS1 de ratón confieren la especificidad de unión a DNA de las homeoproteínas Msx2 y Msx1 respectivamente (Kotaja *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2006). PIAS1 se requiere para que Msx1 se mantenga en la periferia nuclear de los mioblastos (Lee *et al.*, 2006). El punto interesante aquí, es que estas funciones descritas para la proteína PIAS1, son aparentemente independientes de su actividad de E3 ligasa de SUMO (revisado en Sharrocks, 2006). Lee y col. (2006) proponen que la localización en compartimentos subnucleares de las homeoproteínas, es un requisito clave para su unión específica a

ciertas secuencias de DNA y que este proceso puede ser ayudado por cofactores como PIAS1.

Con los resultados de esta Tesis podemos concluir que TnaA se asocia con proteínas de la cromatina muy probablemente en eventos de regulación positiva de la transcripción en *D. melanogaster*. TnaA probablemente dirija, regule ó favorezca alguna modificación (probablemente sumoilación) y/ó la localización de proteínas del trxG como por ejemplo: 1) alguna(s) subunidades del complejo Brahma, 2) de alguno de los blancos del complejo e. g. histonas ó 3) de proteínas que formen parte de la maquinaria basal de transcripción de la RNA polimerasa II. La sumoilación u otra función de TnaA, ayudarían a la localización correcta de alguna(s) de estas proteínas en alguna región específica de los cromosomas, de tal forma que se favorezca el mantenimiento de la expresión de los genes homeóticos.

CONCLUSIONES

-La fusión BD-TnaA activa la transcripción de genes reporteros en el sistema de dos híbridos de levadura y por lo tanto no puede utilizarse como "carnada" en este ensayo.

- TnaA nativa (anti-TnaA_{XSPRING}) se localiza en bandas específicas y discretas asociadas a cromatina laxa (eucromatina) en cromosomas politénicos silvestres.

- TnaA (anti-TnaA_{XSPRING}) colocaliza con Osa en algunos sitios en cromosomas politénicos.

-La expresión ectópica de TnaA-FLAG (Act-5C) en D. melanogaster causa una letalidad del 100%.

-La forma etiquetada de TnaA, TnaA-FLAG se expresa en glándulas salivales de larvas de 3er instar y ocasiona mortalidad parcial entre las etapas de pupa y adulto.

-La forma etiquetada de TnaA, TnaA-FLAG mantiene la capacidad de unirse a eucromatina en cromosomas politénicos de glándulas salivales de larvas de 3er instar.

-TnaA-FLAG se encuentra en la región perinuclear de células de glándulas salivales (anticuerpos anti-TnaA_{XSPRING} y anti-FLAG) y presenta una distribución generalizada en los cromosomas politénicos de larvas de 3er instar de líneas transgénicas *UAS-tnaA-FLAG/Sgs3-GAL4* (anticuerpo contra TnaA_{XSPRING}).

- La glicina-HCl 0.1 M pH 2.5 eluye a la proteína GST-TnaA_{XSPRING} de la resina glutatión sefarosa.

PERSPECTIVAS.

- Determinar los dominios de TnaA que activan y que no activan la transcripción de genes reporteros en el sistema de dos híbridos.
- Buscar proteínas que interaccionen físicamente con TnaA por ensayo de dos híbridos.
- Realizar ensayos de inmunoprecipitación con los anticuerpos anti-TnaA y anti-Osa o con proteínas relacionadas a TnaA.
- Realizar inmunotinción de cromosomas politénicos utilizando anticuerpos de proteínas relacionadas a TnaA.
- Realizar inmunotinción de cromosomas politénicos de líneas mutantes para *tna*.

ANEXO

1.- Presencia de TnaA durante el desarrollo de *D. melanogaster*.

Existen proteínas que se expresan durante todo el desarrollo de *D. melanogaster*, desde la etapa embrionaria hasta el estadio adulto. TnaA probablemente esté a lo largo de todo el desarrollo, pues el transcrito *tnaA* está presente en todos los estadios (Gutiérrez *et al.*, 2003). Por otra parte, la proteína TnaA se ha detectado en embriones de 3-21 h y en adulto (R. A. Juárez-Uribe, Tesis de Licenciatura 2007). Con el objetivo de determinar en qué estadios del desarrollo está presente TnaA, se realizó un ensayo tipo Western utilizando el anticuerpo contra TnaA_{NH3} en extractos de proteína que abarcaran estadios de todo el desarrollo de *D. melanogaster*. La razón por la cual se utilizó el anticuerpo TnaA_{NH3} es debido a su capacidad de reconocer a TnaA y TnaB, y así poder comparar la presencia de transcritos con proteínas (Fig. 32).

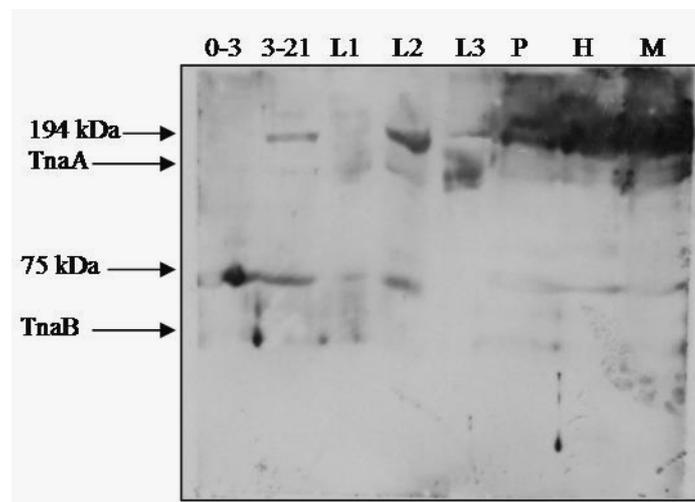


Figura 32. Las proteínas Tna en diferentes estadios del desarrollo de *D. melanogaster*. Análisis tipo Western de extractos proteicos insolubles de los estadios de embriones de 0-3 y 3-21 hr, larva de 1^{er} estadio (L1), larva de 2^{do} estadio (L2), larva de 3^{er} estadio (L3), pupa (P), adulto hembra (H) y adulto macho (M). La membrana se incubó con el anticuerpo (anti-suero) contra TnaA_{NH3} en una dilución 1:1000. La flecha (→) indica la presencia de las proteínas TnaA de 120 kDa y TnaB de 64 kDa, así como proteínas adicionales de 194 y 75 kDa.

Como se puede observar (Fig. 32), la señal que corresponde a la proteína TnaA es muy tenue y se encuentra a partir del estadio de embrión de 3-21 h hasta adultos, lo cual sería consistente con la presencia del transcrito *tnaA* en el desarrollo (ver Fig. 7). También aparece una proteína de 194 kDa en los mismos estadios de TnaA, y con una mayor intensidad en los estadios de pupa (P), adulto hembra (H) y adulto macho (M). Dicha proteína de mayor peso aparece en los análisis tipo Western anteriores (R. A. Juárez-Uribe, Tesis de Licenciatura 2007), aunque no se descarta la posibilidad de que sea otra versión de Tna, también podría ser TnaA modificada covalentemente. En el caso de la banda correspondiente a la proteína TnaB, esta se encuentra en todos los estadios aunque muy tenue, lo cual no corresponde con la presencia del transcrito *tnaB*, el cual solo se encuentra a partir de larva de 3^{er} estadio (L3) (ver Fig. 7). Probablemente la explicación de la presencia de TnaB en estadios tempranos se explique por depositación materna de la proteína, la cual posiblemente permanezca por lo menos hasta larva de 2^{do} estadio (L2).

2.- Prueba de proteólisis de la proteína GST-TnaA_{XSPRING} con trombina.

Para hacer experimentos de competencia con los anticuerpos dirigidos contra la proteína de fusión GST-TnaA_{XSPRING} en algunos casos sería preferible tener la proteína soluble. Esto no ha sido posible debido a que no habíamos podido despegarla de las perlas de glutatión-sefarosa con diversos protocolos probados (Juárez-Uribe RA, Tesis de Licenciatura 2007).

La proteína de fusión GST-TnaA_{XSPRING} se construyó en el plásmido pGEX-2T que contiene un sitio de corte para la enzima trombina (Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser) entre la secuencia de la proteína GST y la secuencia que se fusiona a ella. Por tanto, decidimos

establecer las condiciones para aprovechar el sitio de corte por trombina y eluir el segmento $TnaA_{XSPRING}$ de la proteína de fusión $GST-TnaA_{XSPRING}$.

Como primer paso para determinar las condiciones de proteólisis más eficientes, se partió de una muestra de la proteína de fusión unida a la resina de glutatión-sefarosa y se incubó durante diferentes tiempos (2, 4, 8 y 16 h) en presencia de diferentes concentraciones de trombina (0.0002, 0.0005 y 0.001 U/ μ l) a 22°C.

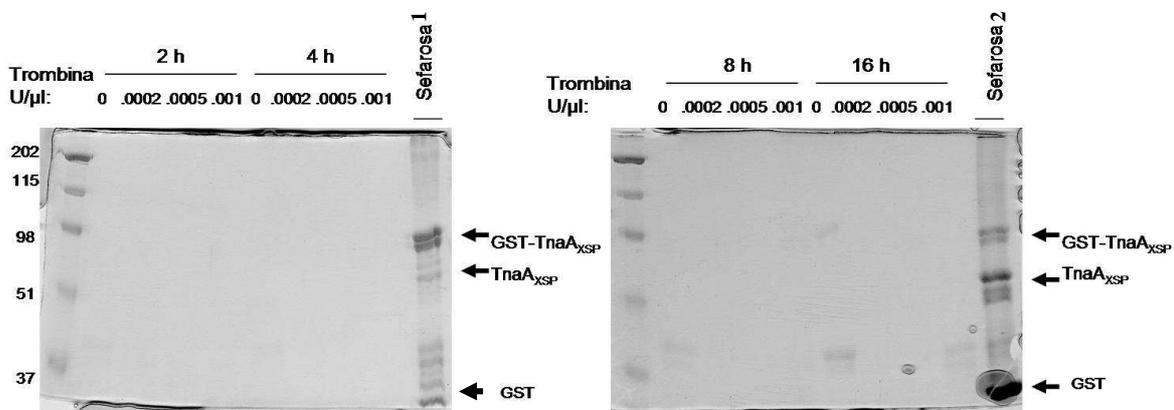


Figura 33. Obtención de $TnaA_{XSPRING}$ por procesamiento con trombina de la proteína de fusión $GST-TnaA_{XSPRING}$. La reacción se llevó a cabo con 20 μ l de resina glutatión sefarosa que contenía \sim 40 μ g de $GST-TnaA_{XSPRING}$ con 40 μ l de buffer de corte con trombina que contenía diferentes concentraciones de la enzima (0, 0.0002, 0.0005 y 0.001 U/ μ l) incubando durante diferentes tiempos (2, 4, 8 y 16 h) a 22°C. En cada carril se cargaron 20 μ l del sobrenadante de cada reacción. Se cargaron 5 μ l de las resinas unidas a la proteína de las muestras tratadas con 0.0002 y 0.001 U/ μ l de trombina, 2 y 16 h de incubación (Sefarosa 1 y Sefarosa 2 respectivamente). La fusión $GST-TnaA_{XSPRING}$ ($GST-TnaAXSP$), y los fragmentos $TnaA_{XSPRING}$ ($TnaAXSP$) y GST son señalados con flechas (\leftarrow).

De estas condiciones encontramos que $GST-TnaA_{XSPRING}$ se corta eficientemente con 0.001 U/ μ l de trombina incubando durante 16 h (comparar Sefarosa 1 y Sefarosa 2, Fig. 33) pero el fragmento $TnaA_{XSPRING}$ no se libera en la fracción soluble. En la muestra "Sefarosa 2" se puede observar que la mayor concentración de proteína ahora se encuentra distribuida entre los fragmentos procesados $TnaA_{XSPRING}$ y GST , y que aún queda un remanente de la proteína de fusión intacta. Probablemente se requiera de un mayor tiempo de incubación ó mayor concentración de trombina para procesarla toda.

Por lo tanto en el siguiente experimento se emplearon concentraciones crecientes de trombina (0, 0.001, 0.0025 y 0.012 U/ μ l), mayores a las probadas en el experimento anterior y las reacciones se llevaron a cabo en un buffer de bicarbonato de amonio 50 mM, pH 8.0 incubadas por 16 h, para probar si en estas condiciones era posible solubilizar el dominio procesado TnaA_{XSPRING}. Para mayor sensibilidad durante el análisis, se utilizó una solución de AgOH para el teñido del gel. Los resultados de la reacción con 0.012 U/ μ l de trombina se muestran en la Figura 34.

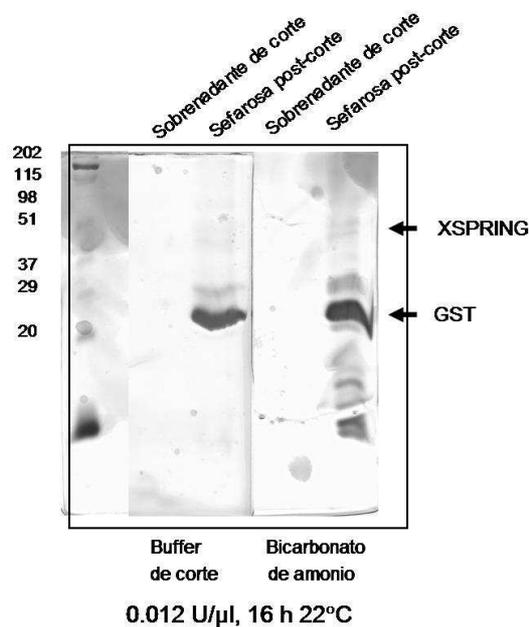


Figura 34. Ensayo de obtención de GST-TnaA_{XSPRING} con trombina por corte de la proteína GST_TnaA_{XSPRING} en diferentes buffers. SDS-PAGE teñido con AgOH que muestra la fracción de sobrenadante (40 μ l) de la reacción con la resina unida a la proteína de fusión y 20 μ g de sefarosa (10 μ l) después de la incubación con trombina (0.012 U/ μ l, 16 h 22°C) en dos buffers disintos: en buffer de corte y en buffer de bicarbonato de amonio. Las proteínas producto del procesamiento entre GST y TnaA_{XSPRING} SON señaladas (←).

Como se puede observar no hay solubilización de la proteína procesada en ninguno de los dos "buffers" probados. En la sefarosa, se observa una banda de gran intensidad correspondiente a GST en las muestras procesadas con ambos "buffers", y las tratadas con "buffer" de bicarbonato de amonio se observa un ligero aumento en la concentración del dominio TnaA_{XSPRING}, así como productos proteícos de bajo peso

molecular. En conclusión, el "buffer" de bicarbonato de amonio no mejora la solubilización del TnaA_{XSPRING}.

Como es notorio, en la sefarosa post-corte, siempre resulta más intensa la banda de GST que la de TnaA_{XSPRING}, aún cuando deberían estar en proporción 1:1, pues son producto de una misma proteína de fusión. Con la intención de determinar dónde se encuentra el TnaA_{XSPRING} después del corte con trombina, se realizó un nuevo experimento, cargando las diferentes fracciones y los lavados. Por otro lado, para verificar si la banda que se observa en las resinas del peso molecular correspondiente a GST lo es, se agregó glutatión reducido para eluirlo de la sefarosa.

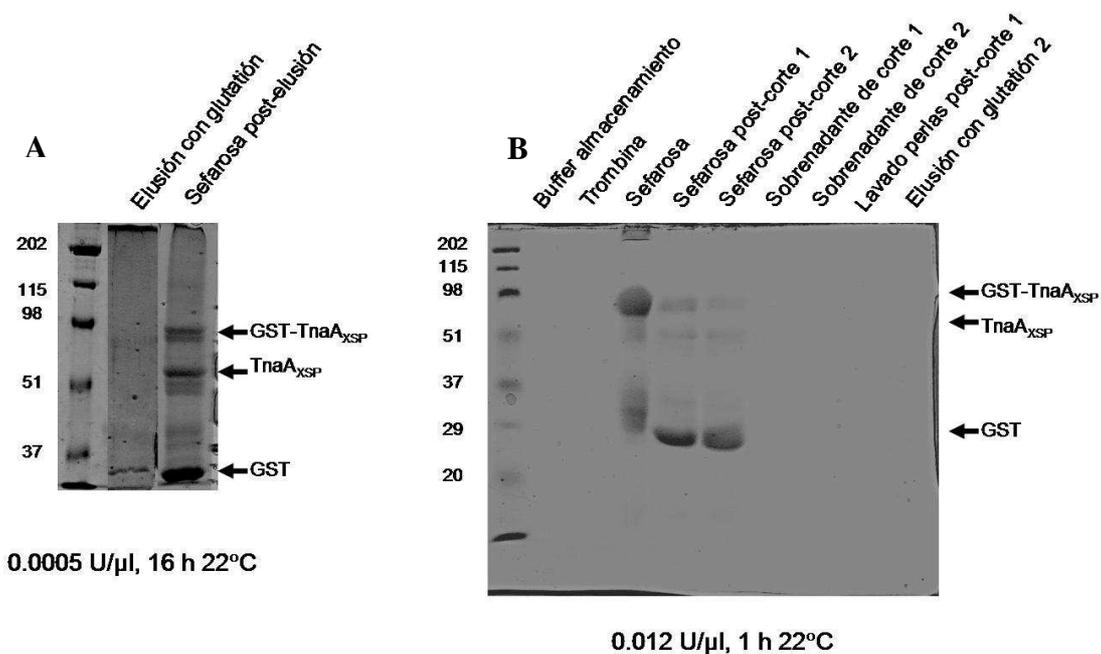


Figura 35. Análisis de procesamiento de GST-TnaA_{XSPRING} con trombina. Se muestra la elución de GST post-corte al añadir glutatión reducido (A) y las diferentes fracciones y lavados durante el procesamiento de GST-TnaA_{XSPRING} (B). De reacciones de proteólisis de volumen total de 30 μl, se cargaron sobrenadantes, lavados (PBST) y eluciones (20 μl), así como la sefarosa pre- (Sefarosa) y post-corte (1 y 2) (10 μl). La fusión GST-TnaA_{XSPRING} (GST-TnaAXSP), y los fragmentos TnaA_{XSPRING} (TnaA_{XSP}) y GST son señalados con flechas (←). La concentración de trombina, tiempo y temperatura de incubación se muestran debajo de cada panel.

En la figura 35A se muestra que la proteína de 27 kDa es GST puesto que una fracción se eluye con el buffer de glutatión reducido. Con el propósito de visualizar el destino o la presencia del dominio TnaA_{XSPRING} posterior a la incubación con trombina, se

cargaron diferentes fracciones y lavados del proceso. En la figura 35B se observa que GST-TnaA_{XSPRING} está en la sefarosa previa al corte, y en la sefarosa post-corte se mayoritariamente GST y TnaA_{XSPRING} minoritariamente. TnaA_{XSPRING} no se encuentra en ninguna de las fracciones solubles. Dicho resultado sugiere que probablemente el dominio TnaA_{XSPRING} es insoluble y se precipita, y como el ensayo se hace en "batch" queda mezclado de manera no uniforme con la sefarosa. Por ende, al cargar una muestra de sefarosa, se toma una cantidad nula o no representativa de la concentración de TnaA_{XSPRING}. Finalmente se concluyó que este ensayo en las condiciones que se hizo, no resulta práctico para purificar al dominio TnaA_{XSPRING}.

REFERENCIAS.

Aguilar-Fuentes J, Valadez-Graham V, Reynaud E, Zurita M. (2006) TFIID trafficking and its nuclear assembly during early *Drosophila* embryo development. *J Cell Sci.* **119**, 3866-3875.

Armstrong JA, Papoulas O, Daubresse G, Sperling AS, Lis JT, Scott MP, Tamkun JW. (2002) The *Drosophila* BRM complex facilitates global transcription by RNA polymerase II. *EMBO J.* **21**, 5245-54.

Bar-Peled M, Raikhel NV. (1996) A method for isolation and purification of specific antibodies to a protein fused to GST. *Analyt Biochem.* **241**, 140-142.

Bettinger JC, Lee K, Rougvie AE. (1996) Stage specific accumulation of terminal differentiation factor LIN-29 *Caenorhabditis elegans* development. *Development.* **122**, 2517-2527.

BD Biosciences Clontech. Protocol PT3529-1, Version VR32047. pp. 1-55.

BD Biosciences Clontech. Protocol PT3024-1, Version PR13103. pp. 1-32.

Bossis G, Melchior F. (2006) SUMO: regulating the regulator. *Cell Div.* **1**, 13.

Busturia A, Casanova J, Sánchez-Herrero E, Morata G.(1989) Structure and function of the bithorax complex genes of *Drosophila*. *Ciba Found. Symp.* **144**, 227-242.

Capelson, M, Corces VG. (2006). SUMO conjugation attenuates the activity of the gypsy chromatin insulator. *EMBO J.* **25**, 1906-1914.

Carrera I, Janody F, Leeds N, Duveau F, Treisman JE. (2008) Pygopus activates Wingless target gene transcription through the mediator complex subunits Med12 and Med13. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **105**, 6644-6649.

Chalkley GE, Moshkin YM, Langenberg K, Bezstarosti K, Blastyak A, Gyurkovics H, Demmers JA, Verrijzer CP. (2008) The transcriptional coactivator SAYP is a trithorax group signature subunit of the PBAP chromatin remodeling complex. *Mol Cell Biol.* **28**, 2920-2929.

Collins RT, Treisman JE. (2000) Osa-containing Brahma chromatin remodeling complexes are required for the repression of Wingless target genes. *Genes Dev.* **14**, 3140-3152.

Corona DF, Armstrong JA, Tamkun JW. (2004) Genetic and cytological analysis of *Drosophila* chromatin-remodeling factors. *Methods Enzymol.* **377**, 79-85.

Demakov, S., Gortchakov, A., Schwartz, Y., Semeshin, V., Campuzano, S., Modolell, J., Zhimulev I. (2004) Molecular and genetic organization of *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes: evidence for two types of interband regions. *Genetica*. **122**, 311-324.

Geiss-Friedlander R, Melchior F. (2007) Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **8**, 947-956.

Gilbert SF. (2000) *Developmental Biology*, 6th Edition. Sinauer Associates, INC, Publishers. 61-66, 263-290.

Grimaud C, Negre N, Cavalli G. (2006) From genetics to epigenetics: the tale of Polycomb group and trithorax group genes. *Chromosome Res.***14**, 363-75.

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

Hari K.L, Cook K.R, Karpen GH. (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.

Hengen PN (1997) Methods and reagents -False positives from the yeast two--hybrid system. *Tr Biochem Sci*. **22**, 33-34.

Hilgarth RS, Murphy LA, Skaggs HS, Wilkerson DC, Xing H, Sarge KD. (2004) Regulation and function of SUMO modification. *J Biol Chem*. **279**, 53899-902.

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

Juárez-Uribe RA. (2007) Análisis diferencial de las proteínas Tonalli de *Drosophila melanogaster*. Tesis de Licenciatura. Facultad de ciencias. UNAM.

Kaufman TC, Seeger MA, Olsen G. (1990) Molecular and genetic organization of the *Antennapedia* gene complex of *Drosophila melanogaster*. *Adv Genet*. **27**, 309-62.

Kennison, JA and J. W. Tamkun (1988). Dosage-dependent modifiers of *Polycomb* and *Antennapedia* mutations in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 8136-8140.

Kerscher O. (2007) SUMO junction-what's your function? New insights through SUMO interacting motifs. *EMBO Rep*. **8**, 550-5.

Kotaja N, Aittomäki S, Silvennoinen O, Palvimo JJ, Jänne OA. (2000) ARIP3 (androgen receptor-interacting protein 3) and other PIAS (protein inhibitor of activated STAT) proteins differ in their ability to modulate steroid receptor-dependent transcriptional activation. *Mol Endocrinol*. **14**, 1986-2000.

Lee H, Quinn JC, Prasanth KV, Swiss VA, Economides KD, Camacho MM, Spector DL Abat. (2006) PIAS1 confers DNA-binding specificity on the Msx1 homeoprotein. *Genes & Dev.* **20**, 784-794.

Mack PD, Kapelnikov A, Heifetz Y, Bender M. (2006) Mating-responsive genes in reproductive tissues of female *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci.* **103**, 10358-10363.

Marenda RD, Zraly CB, Dingwall AK. (2004) The *Drosophila* Brahma (SWI/SNF) chromatin remodelling complex exhibits cell-type specific activation and repression functions *Dev Biol.* **267**, 279-293.

Matunis MJ, Zhang XD, Ellis NA. (2006) SUMO: the glue that binds. *Dev Cell.* **11**, 596-597.

Melchior F, Schergaut M, Pichler A. (2003) SUMO: ligases, isopeptidases and nuclear pores. *Tr Biochem Sci.* **28**, 612-8.

Meulmeester E, Melchior F. (2008) Cell biology: SUMO. *Nature.* **452**, 709-11.

Mills E, Creamer LK. (1975) A conformational change in bovine β -lactoglobulin at low pH. *Biochim Biophys Acta.* **379**, 618-626

Mohrmann L, Langenberg K, Krijgsveld J, Kal AJ, Heck AJ, Verrijzer CP. (2004) Differential targeting of two distinct SWI/SNF-related *Drosophila* chromatin-remodeling complexes. *Mol Cell Biol.* **24**, 3077-88.

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

Peng Y, Lee J, Zhu C, Sun Z. (2010) A novel role for protein inhibitor of activated STAT (PIAS) proteins in modulating the activity of Zimp7, a novel PIAS-like protein, in androgen receptor-mediated transcription. *J Biol Chem.* **285**, 11465-11475.

QIAGEN The QIAexpressionist 06/2003.

Ren J, Gao X, Jin C, Zhu M, Wang X, Shaw A, Wen L, Yao X, Xue (2009) Systematic study of protein sumoylation: Development of a site-specific predictor of SUMOsp 2.0. *Y. Proteomics.* **9**, 3409-3412.

Sachdev S, Bruhn L, Sieber H, Pichler A, Melchior F, Grosschedl R. (2001) PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies. *Genes & Dev.* **15**, 3088-3103.

Savare J, Bonneaud N, Girard F. (2005) SUMO represses transcriptional activity of the *Drosophila* SoxNeuro and human Sox3 central nervous system-specific transcription factors. *Mol Biol Cell.* **16**, 2660-2669.

Scientific Frontiers in Developmental Toxicology and Risk Assessment. (2000) Committee on Developmental Toxicology, Board on Environmental Studies and Toxicology, National Research Council. *The National Academies Press.* Pag. 162

Sharrocks, AD. (2006) PIAS proteins and transcriptional regulation -more than just SUMO E3 ligases? *Genes & Dev.* **20**, 754-758.

Shio Y, Eisenman RN. (2003) Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**, 13225-30.

Srinivasan S, Dorigi KM, Tamkun JW. (2008) *Drosophila* Kismet regulates histone H3 lysine 27 methylation and early elongation by RNA polymerase II. *PLoS Genet.* **4**, e1000217.

Sullivan W, Hawley RS, Ashburner M. (2000) *Drosophila* Protocols. Cold Spring Harbor. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

Takahashi Y, Dulev S, Liu X, Hiller NJ, Zhao X, Strunnikov A (2008) Cooperation of sumoylated chromosomal proteins in rDNA maintenance. *PLoS Genet.* **4**, e1000215.

Talamillo A, Sánchez J, Cantera R, Pérez C, Martín D, Caminero E, Barrio R. (2008a) Smt3 is required for *Drosophila melanogaster* metamorphosis. *Development.* **135**, 1659-1668.

Talamillo A, Sánchez J, Barrio R. (2008b) Functional analysis of the SUMOylation pathway in *Drosophila*. *Biochem Soc Trans.* **36**, 868-73.

Tamkun JW, Deuring R, Scott MP, Kissinger M, Pattatucci AM, Kaufman TC, Kennison JA. (1992). Brahma: a regulator of *Drosophila* homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Cell* **68**, 561– 572.

Vázquez M, Moore L, Kennison JA. (1999) The trithorax group gene *osa* encodes an ARID-domain protein that genetically interacts with the Brahma chromatin-remodeling factor to regulate transcription. *Development.* **126**, 733-42.

Vedejs E, Martinez GR. (1979) Reversible loss of metal ions from the zinc binding site of copper-zinc superoxide dismutase. The low pH transition. *J Am Chem Soc.* **101**, 6454-6456.

Xiao H, Jeang KT. (1998) Glutamine-rich domains activate transcription in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **273**, 22873-6.

Zhang T, Sun Y, Tian E, Deng H, Zhang Y, Luo X, Cai Q, Wang H, Chai J, Zhang H. (2006) RNA-binding proteins SOP-2 and SOR-1 form a novel PcG-like complex in *C. elegans*. *Development*. **133**, 1023-33

Zhang H, Christoforou A, Aravind L, Emmons SW, van den Heuvel S, Haber DA. (2004a) The *C. elegans* Polycomb gene SOP-2 encodes an RNA binding protein. *Mol Cell*. **14**, 841-847.

Zhang H, Smolen GA, Palmer R, Christoforou A, van den Heuvel S, Haber DA. (2004b) SUMO modification is required for in vivo Hox gene regulation by the *Caenorhabditis elegans* Polycomb group protein SOP-2. *Nat Genet*. **36**, 507-511.

Zhao X, Blobel G. (2005) A SUMO ligase is part of a nuclear multiprotein complex that affects DNA repair and chromosomal organization. *Proc Natl Acad Sc*. **102**, 4777-4782.