



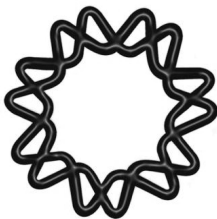
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**INTERACCIONES FÍSICA Y GENÉTICA ENTRE DMP18 Y
COMPONENTES DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN/REPARACIÓN
TFIIH EN *DROSOPHILA MELANOGASTER*.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS
P R E S E N T A
M.C. MARIANA HERRERA CRUZ

TUTOR: DR. MARIO ENRIQUE ZURITA ORTEGA



CUERNAVACA, MORELOS.

SEPTIEMBRE, 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue realizado en Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, en el Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, bajo la dirección del Dr. Mario Enrique Zurita Ortega con los fondos de PAPIIT/UNAM IN 20109-3, IXTLI/UNAM, Fundación Miguel Alemán y Howard Hughes Medical Institute, así como el apoyo de la beca de doctorado por CONACyT.

Agradezco al Dr. Mario Zurita por permitirme formar parte de su grupo de trabajo y por su apoyo académico a lo largo de este proyecto. De igual manera doy gracias a todos mis compañeros y amigos del laboratorio por los esfuerzos y aprendizaje compartidos; especialmente agradezco a mis maestras en esta formación científica: Dra. Viviana Valadez Graham, Dra. Martha Vázquez Laslop, Dra. Mariana Fregoso Lomas y Dra. Dvorak Montiel Condado. Gracias a Carmen Muñoz por su excelente trabajo y puntualidad.

Les agradezco a la Dra. Alejandra Covarrubias Robles y al Dr. David Romero Camarena por su extraordinaria asesoría a lo largo del doctorado, al haber formado parte de mi comité tutorial junto con mi director de tesis el Dr. Mario Zurita.

Agradezco a los miembros del jurado de examen, Dra. Susana López Charretón y doctores Lorenzo Segovia Forcella, Ramón González García-Conde, Gustavo Pedraza Alva e Ignacio López González, por la revisión de este manuscrito.

Ante todo agradezco a Dios, a mis padres, a mi prometido y a todos mis amigos y familiares que a cada momento me acompañaron y apoyaron en esta etapa de mi vida.

INDICE

<u>RESUMEN</u>	<u>5</u>
<u>ABSTRACT</u>	<u>6</u>
<u>INTRODUCCIÓN</u>	<u>7</u>
<u>ANTECEDENTES</u>	<u>13</u>
<u>HIPÓTESIS</u>	<u>16</u>
<u>OBJETIVOS</u>	<u>16</u>
<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	<u>17</u>
1. Líneas de moscas.....	17
2. Generación y caracterización de líneas transgénicas Dmp8-H6, H6-Dmp8,Dmp18-myc y myc-Dmp18.....	17
3. Caracterización molecular de las líneas <i>P{lacW}l(2)SH1279^{SH1279}</i> y transgénicas de Dmp8 y Dmp18.....	18
4. Obtención de extractos proteicos de moscas adultas y embriones.....	20
5. Células S2R+.....	22
6. Anticuerpos.....	25
7. Ensayos tipo Western.....	28
8. Caracterización genética de la línea <i>l(2)SH1279</i>	29
9. Supresión de los fenotipos de los organismos homocigos <i>l(2)SH1279</i>	30
10. Inducción del RNAi contra Dmp18 en la mosca y evaluación de los fenotipos generados.....	31
11. Supresión del efecto del RNAi contra Dmp8 en el ala.....	35
12. Análisis de la interacción genética entre <i>Dmp8</i> y <i>Dmp18</i>	39
<u>RESULTADOS</u>	<u>41</u>
La subunidad Dmp8 de TFIIH y el homólogo de Swc6/p18 ^{Hamlet} (Dmp18) están codificados en un transcrito bicistrónico en <i>D. melanogaster</i>	41
Dmp18 interacciona físicamente con las subunidades Dmp8 y Dmp52 de TFIIH y co-localiza en la cromatina con DmXPD.....	48

<i>Dmp18</i> y <i>Dmp8</i> interaccionan genética y funcionalmente	57
<u>DISCUSIÓN</u>	<u>70</u>
<u>CONCLUSIONES</u>	<u>78</u>
<u>PERSPECTIVAS</u>	<u>79</u>
<u>REFERENCIAS</u>	<u>81</u>
<u>ANEXOS</u>	<u>89</u>
I. Genotipos y descripción de las líneas de moscas	89
II. Oligonucleótidos	90
III. Vectores de expresión de células S2R+ de <i>Drosophila</i>	91
IV. Figuras suplementarias	92
V. Otros análisis genéticos relacionados con <i>Dmp8</i> y <i>Dmp18</i>	96

RESUMEN

TFIIH es un complejo multiproteico que refleja la estrecha relación entre dos funciones celulares básicas como son la transcripción y la reparación del daño al DNA, siendo un factor esencial en la transcripción de las RNA polimerasas I y II, y teniendo un papel fundamental en el mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos. De las 10 subunidades que lo conforman, p8/TTDA parece darle estabilidad al complejo y permite que se mantenga el nivel celular del mismo. En este trabajo se reporta que el homólogo de p8/TTDA en la mosca (denominado Dmp8) está codificado en un transcrito bicistrónico con el homólogo de la subunidad Swc6/p18^{Hamlet} (nombrada Dmp18) del complejo remodelador de la cromatina SWR1 de levadura o SRCAP de mamífero. Dicho complejo SWR1/SRCAP se encarga de catalizar el intercambio de la histona canónica H2A por su variante H2AZ en los nucleosomas.

En organismos eucariontes es rara la presencia de transcritos bicistrónicos, sin embargo, existen ejemplos de que las proteínas codificadas por ellos pueden estar relacionadas funcionalmente. Nuestros resultados muestran que Dmp18 interacciona físicamente con las subunidades Dmp8 y Dmp52 de TFIIH, y co-localiza con otra subunidad de este complejo (DmXPD) en la cromatina. Asimismo, se demuestra la interacción genética entre *Dmp8* y *Dmp18*, lo cual sugiere una posible conexión entre el factor de transcripción/reparación TFIIH y un presunto componente de un complejo remodelador de la cromatina involucrado en el intercambio de histonas. Interesantemente, los resultados obtenidos indican que al alterar conjuntamente los niveles de expresión de las dos proteínas (Dmp8 y Dmp18) se generan defectos específicos en las moscas, por lo que se propone que la organización de los genes que codifican estas proteínas ha sido seleccionada durante la evolución para mantener y asegurar su co-regulación.

Este extenso análisis molecular, genético y bioquímico de las interacciones físicas y genéticas entre Dmp18 y TFIIH abre nuevas vías para estudiar la función que estas proteínas tienen en la regulación de la transcripción y la reparación del DNA en el organismo.

ABSTRACT

The multisubunit DNA repair and transcription factor TFIIH maintains an intricate crosstalk with different factors to achieve its functions. The p8/TTDA subunit of TFIIH maintains the basal levels of the complex by interacting with the p52 subunit. In this work, we report that in *Drosophila melanogaster*, the homolog of the p8/TTDA subunit (*Dmp8*) is encoded in a bicistronic transcript with the homolog of the Swc6/p18^{Hamlet} subunit (*Dmp18*) of the SWR1/SRCAP chromatin remodeling complex, which catalyze the exchange of the canonical histone H2A with the H2AZ histone variant.

In eukaryotic cells, bicistronic transcripts are not common and in some cases, the two encoded proteins are functionally related. We found that *Dmp18* physically interacts with the *Dmp8* and *Dmp52* subunits of TFIIH and co-localizes with *DmXPD* in the chromatin. We also demonstrated that *Dmp18* genetically interacts with *Dmp8*, suggesting that a crosstalk might exist between TFIIH and a putative component of a fly chromatin remodeler complex involved in histone exchange. Interestingly, our results also show that when the level of one of these two proteins is decreased and the other maintained, a specific defect in the fly is observed, suggesting that the organization of these two genes in a bicistronic locus has been selected during evolution to allow co-regulation of both genes.

INTRODUCCIÓN

La expresión de genes que codifican proteínas requiere de la participación de un amplio grupo de proteínas, incluyendo la RNA polimerasa II (Pol II), factores de transcripción, coactivadores, el complejo Mediador y enzimas modificadoras de histonas, todas ellas reclutadas en el promotor de los genes activos. La formación del complejo de pre-inicio de la transcripción está acompañada por una etapa de remodelación de la cromatina, que puede incluir una serie de modificaciones post-traduccionales de las histonas y una desmetilación activa del DNA de la región promotora. Estos procesos producen un estado abierto de cromatina que es necesario para que empiece la síntesis del transcrito primario (Li *et. al.*, 2007). Asimismo, para mantener la integridad del genoma y asegurar la continuidad de la transcripción, deben eliminarse las lesiones del DNA que se originan por agentes genotóxicos como son: la irradiación con luz ultravioleta (UV), drogas antitumorales y otros agentes ambientales que pueden modificar la estructura del DNA. Todo esto sugiere la existencia de una estrecha relación entre los acontecimientos de la transcripción y la reparación del DNA. Una evidencia de esta conexión está en TFIIH, un factor esencial para la transcripción mediada por la Pol II (Conaway y Conaway, 1989; Feaver *et. al.*, 1991; Gerard *et. al.*, 1991; Flores *et. al.*, 1992) y con un papel fundamental en la reparación del DNA mediante la vía de escisión de nucleótidos (NER) (Hoeijmakers, 1994). TFIIH es un complejo multiproteico que también tiene un papel esencial en la transcripción por la RNA polimerasa I (Iben *et. al.*, 2002; Assfalg *et. al.*, 2012) y participa en el control del ciclo celular (Seroz, 1995).

Desde su descubrimiento hace veinte años, las 10 subunidades que conforman a TFIIH se han ido caracterizando bioquímica, molecular y genéticamente (revisado en Egly y Coin, 2011). Esos estudios han mostrado que la composición y estructura de este complejo se han conservado a través de la evolución, siendo similares en los organismos eucariontes (Cuadro 1) (Takagi *et. al.*, 2003). TFIIH está organizado funcionalmente en dos subcomplejos (Figura 1), que juntos participan en la iniciación y la elongación de la transcripción (revisado en Zurita y Merino, 2003). El subcomplejo central o “core” de

TFIIH, que incluye las proteínas XPB, XPD, p62, p52, p44, p34 y p8/TTDA, interviene en el mecanismo de NER, mientras que el complejo CAK (“CDK-Activating Kinase”) conformado por MAT1, ciclina H y CDK7 participa en el control del ciclo celular durante la transición de la fase G2 a la M (Larochelle *et. al.*, 1998). Dentro de las subunidades del complejo, algunas poseen actividades enzimáticas (Cuadro 1): XPB y XPD son dos helicasas dependientes de ATP de polaridades opuestas, CKD7 es una cinasa dependiente de ciclina y, en levadura, el homólogo de p44 es una ligasa E3 de ubiquitina (revisado en Compe y Egly, 2012). Se ha visto que la proteína XPD conecta ambos subcomplejos. Adicionalmente, se ha sugerido que la endonucleasa XPG, que participa en NER, refuerza la interacción entre el core y el CAK y puede participar también en la transcripción (revisado en Egly y Coin, 2011). Recientemente, se reportó una nueva subunidad putativa de TFIIH en levadura (Murakami *et. al.*, 2012), denominada Tfb6, la cual parece ser importante para disociar a XPB (Ssl2 en levadura) del resto del complejo después de que inició la transcripción.

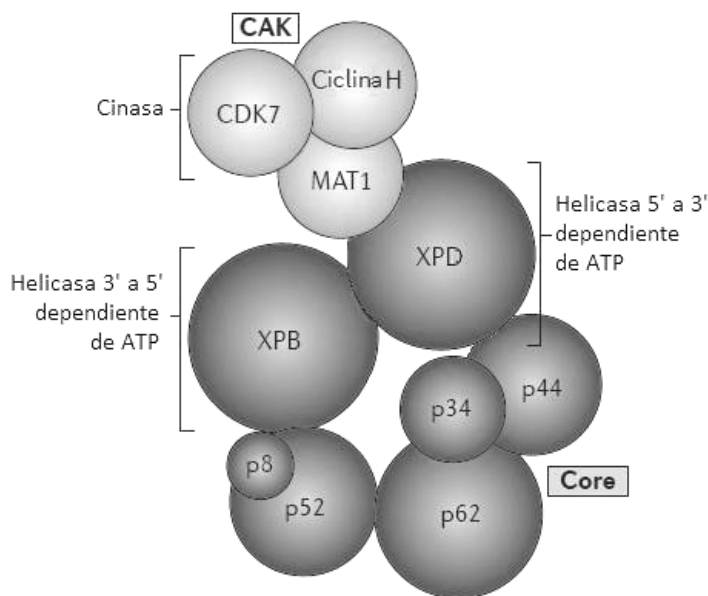


Figura 1. Estructura de TFIIH. El complejo de transcripción/replicación TFIIH en organismos eucariontes está conformado por diez subunidades organizadas en dos subcomplejos funcionales: el “Core”, compuesto por XPB, p62, p52, p44, p34, p8 y XPD; y el “CAK” (CDK-activating kinase), formado por CDK7, ciclina H y MAT1. Ambos subcomplejos están conectados a través de la proteína XPD. [Modificado de Compe y Egly, 2012]

Cuadro 1.
Composición del complejo de transcripción/repación TFIIH

Subcomplejo	Subunidad			Función
	Mamíferos	Levadura	<i>D. melanogaster</i>	
Core	XPB/ERCC3	Ssl2/Rad25	DmXPB (<i>hay</i>) ^a	Helicasa 5'–3' dependiente de ATP
	XPD/ERCC2	Rad3	DmXPD ^a	Helicasa 3'–5' dependiente de ATP, forma un puente entre el core y el CAK
	p62	Tfb1	Dmp62 ^a	Función estructural, interacciona con factores de transcripción y de NER
	p52	Tfb2	Dmp52 (<i>mrn</i>) ^a	Regula la actividad ATPasa de XPB
	p44	Ssl1	Dmp44	Regula la actividad helicasa de XPD. Ligasa E3 de ubiquitina (en levadura)
	p34	Tfb4	Dmp34	Función estructural, interacciona fuertemente con p44
	p8/TTDA	Tfb5	Dmp8 ^a	Regula la actividad ATPasa de XPB y estabiliza al complejo
CAK	MAT1	Tfb3	MAT1	Estabiliza al CAK
	CDK7	Kin28	CDK7	Cinasa del CTD de la RNA Pol. II
	CycH	Ccl1	CycH	Modula la actividad cinasa de CDK7

XPB y XPD, proteínas xeroderma pigmentosum grupos de complementación B y D, respectivamente; ERCC, proteínas que complementa la reparación por escisión (“excision repair cross-complementing”); MAT1, (“ménage à trois”) trío 1; CDK7, cinasa 7 dependiente de ciclina; CycH, ciclina H; Ssl, supresor de proteína stem-loop; TTDA, proteína tricotiodistrofia grupo de complementación A; Tfb, factor de transcripción b de la RNA polimerasa II; Ccl, ciclina C-like. (^a)Subunidades caracterizadas en *Drosophila melanogaster* por nuestro grupo de trabajo. [Modificado de Compe y Egly, 2012].

Como factor general de la transcripción mediada por la Pol II, TFIIH es esencial durante la etapa de iniciación de este proceso, ya que forma parte del complejo de pre-inicio (PIC) junto con TFIID (quien contiene la proteína que se une a la caja TATA del promotor), TFIIA, TFIIB (quien estabiliza a TFIID), la Pol II, TFIIF (que ancla la polimerasa) y TFIIE, los cuales se reclutan secuencialmente antes que TFIIH. Una vez que se establece el PIC, la actividad helicasa dependiente de ATP de la subunidad XPB de TFIIH se requiere para abrir el DNA en la región promotora y para promover el avance de la polimerasa para comenzar la síntesis del RNA mensajero (mRNA) (proceso conocido como escape del promotor). Para iniciar la transcripción es necesario que el dominio carboxilo-terminal (CTD) de la subunidad mayor de la Pol II sea fosforilado en la Ser5 del heptapéptido repetido que lo forma (Serizawa *et. al.*, 1993). Esta fosforilación la lleva a cabo la subunidad CDK7 de TFIIH, y puede ser modulada por MAT1 y ciclina H, las otras dos subunidades que conforman el subcomplejo CAK (Rossignol *et. al.*, 1997). CDK7 también fosforila la Ser7 del CTD de la Pol II, lo cual parece ser funcionalmente importante para el procesamiento de los RNAs pequeños que participan en la remoción de intrones del pre-mRNA (Egloff *et. al.*, 2007). Por otro lado, TFIIH también puede modular la actividad de varios reguladores transcripcionales y receptores nucleares y, ser modulado por ellos (revisado en Zurita y Merino, 2003; Compe y Egly, 2012).

La reparación por el mecanismo de NER resarce distorsiones en la hebra de DNA causadas por la irradiación con luz UV (como la formación de dímeros de ciclobutano de pirimidina (CPD) o fotoproductos 6-4 pirimidin-pirimidona) o cuando se intercalan agentes antitumorales como el cisplatino. El papel principal de TFIIH en NER es provocar la apertura del DNA alrededor de la región dañada para permitir su remplazo con un nuevo fragmento sin daño. El mecanismo de NER se puede llevar a cabo mediante dos vías dependiendo de la zona del genoma de la que se trate y de las proteínas involucradas en reconocer el daño. La primera vía, denominada reparación acoplada a la transcripción (TCR), se encarga de resarcir los daños en las regiones genómicas que están siendo transcripcionalmente activas; la segunda vía, llamada reparación global del genoma (GGR), permite restaurar los daños en el resto del genoma (revisado en Hanawalt y Spivak, 2008;

Compe y Egly, 2012). Una vez que el daño es reconocido, es necesario el reclutamiento de TFIIH, ya que la actividad helicasa dependiente de ATP de XPD es indispensable para abrir el DNA dañado y la actividad ATPasa de XPB favorece el anclaje del complejo al DNA (Coin *et. al.*, 2007). También se ha sugerido que XPD podría participar en el reconocimiento y verificación del DNA dañado (Mathieu *et. al.*, 2010).

Un aspecto importante en el estudio de TFIIH, que además demostró su participación en diversas funciones celulares, es el hecho de que mutaciones en XPB y XPD generan síndromes humanos hereditarios que incluyen a Xeroderma Pigmentosum (XP), al Síndrome de Cockayne combinado con XP (CS/XP) y a la Tricotodistrofia (TTD). Inicialmente éstos fueron clasificados como síndromes de reparación del DNA, pero sus características clínicas tan heterogéneas no se pueden explicar sólo por defectos en este proceso, por lo que también se asocian a defectos transcripcionales (revisado en Lehmann, 2003). XP es causado por defectos en NER y se caracteriza por la sensibilidad al sol y la alta predisposición (1000 veces mayor riesgo) al cáncer de piel, con aproximadamente un 30% de los pacientes presentando síntomas neurológicos y problemas cognitivos progresivos. El CS se asocia a defectos en la vía de reparación asociada a la transcripción (TCR) del mecanismo de NER y los pacientes son sensibles a la luz solar, tienen baja estatura, muestran signos de envejecimiento prematuro y algunos presentan defectos neurológicos. La TTD se ha asociado a deficiencias en la transcripción y en la reparación del DNA, los pacientes tienen manifestaciones características como cabello y uñas quebradizas e ictiosis, y alrededor del 50% presentan sensibilidad a la luz solar (revisado en Schärer, 2008).

Específicamente, mutaciones en el gen que codifica para la subunidad p8 de TFIIH provocan una forma fotosensible de TTD, denominada TTDA (Giglia-Mari *et. al.*, 2004; Ranish *et. al.*, 2004). Las células de estos pacientes muestran una significativa reducción en el nivel celular de todo el complejo a pesar de que ninguna de las otras subunidades presentan mutaciones, ni sus actividades enzimáticas están afectadas (Vermeulen *et. al.*, 2000). Cuando se transfectan fibroblastos de los pacientes que padecen TTDA con p8, se restablece el nivel basal de TFIIH y se rescata el fenotipo de sensibilidad a radiación UV

(Coin *et. al.*, 2006), sugiriendo que p8 (también denominada TTDA) regula el nivel del complejo TFIIH y lo estabiliza (Giglia-Mari *et. al.*, 2004). En las células de pacientes con TTDA, la disminución en el nivel basal de TFIIH afecta primordialmente el proceso de NER y reduce ligeramente la eficiencia de la transcripción, por lo que se ha propuesto que p8/TTDA, como parte integral de TFIIH, es una subunidad involucrada principalmente en el proceso de reparación del DNA (Vermeulen *et. al.*, 2000; Coin *et. al.*, 2006). Adicionalmente, se ha encontrado que p8/TTDA interacciona físicamente con p52, y que la actividad de ATPasa de XPB, la cual es indispensable para NER, se modula a través de esta interacción (Coin *et. al.*, 2006 y 2007). Por otro lado, experimentos con células humanas en cultivo sugieren que p8 se encuentra distribuido libremente en el citoplasma y asociado a TFIIH en el núcleo, pero ante la exposición a radiación UV la reserva citoplásmica se transloca al núcleo y se estabiliza su interacción con TFIIH (Giglia-Mari *et. al.*, 2006).

ANTECEDENTES

p8/TTDA es una proteína de 72 aminoácidos que está conservada en todos los eucariontes, incluida *Drosophila melanogaster* (Giglia-Mari *et. al.*, 2004). Interesantemente, el homólogo de p8/TTDA en la mosca de la fruta (en adelante denominado **Dmp8**) está codificado en un transcrito bicistrónico (Herrera Cruz, 2007). El primer marco de lectura abierto corresponde a la proteína Dmp8; mientras que el segundo, codifica para una proteína de 150 aminoácidos que hemos nombrado **Dmp18** en este trabajo. Esta última, al igual que Dmp8 se encuentra conservada en todos los eucariontes, aunque no en todos está codificada en una misma unidad transcripcional con p8/TTDA, como se mostrará más adelante. Análisis *in silico* indican que Dmp18 tiene una alta similitud en su secuencia de aminoácidos con la proteína p18^{Hamlet}/ZNHIT1 de humano, también conocida como Swc6 en *Saccharomyces cerevisiae*, las cuales forman parte de los complejos de remodelación de cromatina SRCAP de humano y SWR1 de levadura, quienes se encargan de catalizar el reemplazo de la histona canónica H2A por la variante H2A.Z de manera dependiente de ATP (Cai *et. al.*, 2003; Krogan *et. al.*, 2003; Kobor *et. al.*, 2004; Mizuguchi *et. al.*, 2004; Ruhl *et. al.*, 2006; Van Attikum y Gasser, 2009). También en *Arabidopsis thaliana*, se ha identificado un complejo similar a SWR1 de levadura donde mutantes de la proteína homóloga a Swc6 presentan defectos en la floración y en el desarrollo de la planta (Choi *et. al.*, 2007; March-Díaz *et. al.*, 2007). Interesantemente, en los diferentes estudios realizados en humano y levadura, tanto p8/TTDA como p18^{Hamlet}/ZNHIT1 han mostrado ser genes no esenciales para el organismo.

Diversos trabajos han identificado en el complejo TIP60 de *D. melanogaster* a la mayoría de los homólogos de los componentes de SRCAP y SWR1 (revisado en Bao y Shen, 2007b); sin embargo, en ningún trabajo se ha señalado a Dmp18 como parte de este complejo. Por otro lado, se ha reportado que TIP60 comparte subunidades con otros dos complejos encontrados en levadura: el remodelador INO80 y el modificador NuA4, este último con actividad acetil-transferasa de histonas (Cai *et. al.*, 2003; revisado en Bao y Shen, 2007a, 2007b y 2010). Además, se ha mostrado la participación de estos complejos

tanto en la regulación de la transcripción como en la reparación y replicación del DNA en diversos organismos (Kobor *et. al.*, 2004; Kusch *et. al.*, 2004; Papamichos-Cronakis *et. al.*, 2006; revisado en Bao y Shen, 2007a).

Más recientemente, se ha descrito a p18^{Hamlet}/ZNHIT1 como un nuevo sustrato de la MAPK p38, capaz de modular la actividad transcripcional de p53 en respuesta a estrés genotóxico causado por la exposición a radiación UV o cisplatino (agente para el tratamiento de varios tipos de cáncer), ocasionando la activación de varios genes pro-apoptóticos (Cuadrado *et. al.*, 2007; Lafarga *et. al.*, 2007). También se ha reportado que p18^{Hamlet}/ZNHIT1 se recluta de manera dependiente de p38 en el promotor del gen de miogenina al establecerse la diferenciación celular muscular, lo cual permite la acumulación de la histona H2A.Z en esta región genómica y la activación transcripcional subsecuente (Cuadrado *et. al.*, 2010). Por otro lado, se piensa que p18^{Hamlet}/ZNHIT1 tiene un papel en la regulación del ciclo celular permitiendo la detención del ciclo en la fase G1 al provocar una disminución del nivel de acetilación de la histona H4 en el promotor de la cinasa 6 dependiente de ciclina (CDK6), funcionando entonces como un represor transcripcional (Yang *et. al.*, 2009).

Como se ha mencionado, Dmp18, el homólogo de p18^{Hamlet}/ZNHIT1 en la mosca, está codificado en un mismo transcrito con la subunidad Dmp8 del complejo TFIIH. Esta organización génica particular de dos factores que pertenecen a dos complejos diferentes y que están involucrados en la transcripción, reparación del DNA y regulación del ciclo celular es muy interesante ya que, en eucariontes, existen ejemplos de proteínas codificadas en transcritos bicistrónicos que se relacionan funcionalmente entre sí (Ritchie y Wang, 1997; Sloan *et. al.*, 1999; Betrán y Ashburner, 2000; Lekven *et. al.*, 2001; Pavlik *et. al.*, 2006; revisado en Blumenthal, 2004). Además, al analizar las interacciones reportadas a partir de un ensayo de doble híbrido utilizando casi todas las proteínas de la mosca (Giot *et. al.*, 2003) se reportó que Dmp18 interacciona físicamente con Dmp52, otra subunidad del complejo TFIIH que se sabe también interacciona físicamente con Dmp8 (Coin *et. al.*, 2006 y 2007; Giglia-Mari *et. al.*, 2004).

Por todo ello, el análisis molecular, genético y bioquímico en *D. melanogaster* de las interacciones entre Dmp18 y componentes del complejo TFIIH que se muestran en este trabajo, aporta nuevos conocimientos para una mejor comprensión de la función que estas proteínas tienen en el organismo y genera herramientas para continuar investigando las bases moleculares de las enfermedades humanas relacionadas con TFIIH.

HIPÓTESIS

Dmp18, una proteína codificada en un mismo transcrito con el homólogo de p8/TTDA en *Drosophila melanogaster* (Dmp8), interacciona física y funcionalmente con componentes del complejo de transcripción/replicación TFIID.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Definir el papel de la proteína Dmp18 en *D. melanogaster*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar con qué proteínas del complejo TFIID interacciona físicamente la proteína Dmp18
2. Determinar si Dmp18 co-localiza con algún componente de los complejos TFIID en la cromatina.
3. Determinar la posible interacción genética de Dmp18 con algún componente de TFIID.

MATERIALES Y MÉTODOS.

1. Líneas de moscas.

Todas las líneas de moscas utilizadas se mantuvieron a 25°C en medio estándar de maíz (cornmeal) o medio con piloncillo con Nipagin o ácido propiónico como agente antimicótico. Como líneas silvestres se utilizaron *Oregon-R* o *w¹¹¹⁸*. Del banco BDSC de la Universidad de Indiana se obtuvieron las siguientes líneas: *Df(2L)Exel7022*, *Df(2L)BSC172*, *Df(2L)BSC110* y *P{GawB}Bx^{MS1096}*. La línea *P{GD10407}v25909* (denominada *dsDmp18* en este trabajo), que expresa un RNA de doble cadena contra *Dmp18*, se obtuvo del banco VDRC (Dietzl *et. al.*, 2007) en Vienna, y la línea *P{lacW}(2)SH1279^{SH1279}* se adquirió en el banco SzDSC de la Universidad de Szeged en Hungría. La línea *In(2LR)Gla, wg^{Gla-1} Bc¹ Egfr^{E1}*, donada por la Dra. Martha Vázquez, se utilizó como balanceador (cromosoma con rearrreglos genómicos, que posee marcadores dominantes e impide la recombinación homóloga) para las deficiencias o inserciones del segundo cromosoma, con la finalidad de permitir la identificación adecuada de los organismos adultos homocigos. El genotipo de todas las líneas se encuentra en el cuadro del Anexo I.

2. Generación y caracterización de líneas transgénicas Dmp8-H6, H6-Dmp8, Dmp18-myc y myc-Dmp18.

Se generaron construcciones que codifican para la secuencia de cDNA silvestre de *Dmp8* con 6 histidinas en el extremo amino (H6-Dmp8) o carboxilo (Dmp8-H6) (Herrera Cruz, 2007; Aguilar-Fuentes *et. al.*, 2008) y otras que llevan la secuencia de *Dmp18* con una etiqueta de *myc* en el extremo amino (*myc-Dmp18*) o en el carboxilo terminal (*Dmp18-myc*), y se clonaron en el vector de clonación pCR2.1 (Invitrogen) (Herrera Cruz, 2007). Posteriormente, cada construcción se subclonó, independientemente, en los vectores de expresión específicos de mosca: pUAST y pCaSpeR^{hsp83} (DGRC). Cada construcción se secuenció para confirmar su integridad. Las moscas transgénicas se produjeron por la compañía Genetic Services, Inc. siguiendo el protocolo estándar de microinyección (Rubin y Spradling, 1982). Finalmente, al cruzar cada individuo

microinyectado con organismos w^{1118} se establecieron líneas independientes y se determinó la localización de cada transgen en los diferentes cromosomas balanceando cada línea, usando como cromosomas balanceadores a *CyO* para el segundo cromosoma y a *TM2* o *MKRS* para el tercero (Herrera Cruz, 2007).

Es importante mencionar que el vector pCaSpeR^{hsp83} permite una expresión constitutiva y ubicua del gen de interés, mientras que el vector pUAST induce la expresión del gen clonado bajo la regulación de secuencias UAS de manera tejido y tiempo específicos donde se exprese el activador GAL4.

Para inducir la expresión de los transgenes de las líneas generadas con el vector pUAST es necesario cruzarlas con moscas que expresen a GAL4 (denominadas líneas “drivers”). El driver seleccionado para determinar la expresión de las proteínas recombinantes de Dmp8 y Dmp18 de las líneas pUAST generadas fue *Sgs3-GAL4* (Stock No. 6870 en Anexo I), el cual induce la expresión del UAS-transgen en las glándulas salivales de larvas de tercer instar. Por otro lado, para determinar la expresión de Dmp8 y Dmp18 recombinantes en las moscas generadas por el vector pCaSpeR^{hsp83}, bastó con aislar RNA total o proteínas de los organismos (embriones, adultos o glándulas salivales) para llevar a cabo los ensayos de RT-PCR y Western blot (descritos más adelante).

3. Caracterización molecular de las líneas *P{lacW}I(2)SH1279^{SH1279}* y transgénicas de Dmp8 y Dmp18.

3.1 Análisis de la presencia de la inserción *P{lacW}* en DNA genómico

Se obtuvo DNA genómico a partir de moscas adultas y con éste se llevaron a cabo reacciones de PCR para analizar la presencia del elemento P de la línea *I(2)SH1279*. Para aislar el DNA genómico se siguió un protocolo modificado de modificado de Engels *et. al.* (1990): se seleccionaron 1 a 10 moscas adultas del genotipo de interés y se añadieron 50 uL de buffer de extracción (10 mM Tris-HCl pH 8.2, 1 mM EDTA, 25 mM NaCl y 200 ug/mL proteinasa K adicionada al momento de usarse). Una vez homogenizada la muestra con ayuda de un micropistilo para tubos de 1.5 mL, se incubó por 15 min a temperatura ambiente, se agregó 1 uL de 0.1 M PMSF y se calentó a 65°C por 15 min. Luego, se congeló

la muestra en nitrógeno líquido y se dejó descongelar a 37°C. Este paso se repitió una vez más. Enseguida se realizó la extracción del DNA con fenol-cloroformo. Para precipitar el DNA se añadió 1/10 de volumen de 3 M de acetato de sodio (pH 5.3), 2 volúmenes de etanol absoluto frío y 1 uL de glicógeno a 20 mg/mL; se incubó por 2 horas a -70°C y se centrifugó a 14,000 rpm por 15 min a 4°C. La pastilla se lavó dos veces con 70% etanol y se dejó secar al aire. Finalmente, la disolución de DNA se realizó con agua bidestilada estéril.

El DNA genómico obtenido se empleó en reacciones de PCR para analizar la presencia del elemento P de la línea *I(2)SH1279*. Las condiciones de PCR para este ensayo fueron: un ciclo de 5 min a 94°C, 30 ciclos de 50 segundos (seg) a 92°C, 45 seg a 55°C y 50 seg a 72°C y, finalmente, 7 min a 72°C. Las combinaciones de oligonucleótidos utilizadas fueron: Up5'-p8 y Ampli3F, Up5'-p8 y Sec3'F, Down3'-p8 y Ampli3F, Down3'-p8 y Sec3'F, y como controles Up5'-p8 y Down3'-p8, Rp49a y Rp49b (Cuadro I del Anexo II).

3.2 Análisis de expresión por RT-PCR

El análisis de expresión de los transcritos endógenos de *Dmp8* y *Dmp18*, así como de los transcritos de *Dmp8-H6*, *H6-Dmp8*, *Dmp18-myc* y *myc-Dmp18* en las moscas transgénicas, se llevó a cabo mediante la técnica de RT-PCR como se describe a continuación.

3.2.1 Aislamiento de RNA total

El aislamiento de RNA total de glándulas salivales y moscas adultas se llevó a cabo con Trizol (Invitrogen), siguiendo el protocolo establecido por el proveedor. Por cada 100 mg de muestra se utilizó 1 mL de Trizol para homogenizar el tejido con ayuda de un micropistilo para tubos de 1.5 mL y la pastilla de RNA se disolvió en agua libre de RNAsas (agua con 0.1% DEPC). Para muestras de 1-10 mg, como es el caso de las glándulas salivales, se utilizaron sólo 800 uL de Trizol y se añadió glicógeno a una concentración final de 250 ug/mL para homogenizar el tejido. La integridad de cada muestra de RNA se analizó en un gel de agarosa al 0.8% con 2% (v/v) de formaldehído.

3.2.2 Preparación de cDNA y PCR

Para analizar la expresión de los genes de interés se sintetizó cDNA a partir del RNA total obtenido de organismos adultos o de glándulas salivales de larvas de tercer instar. Las reacciones de transcripción reversa (RT) se llevaron a cabo con la enzima M-MuLV de *Escherichia coli* (Roche) a partir de 1.0-5.0 ug de RNA total y se empleó Oligo-dT (Roche), siguiendo el protocolo del proveedor. El cDNA sintetizado se empleó como molde para la amplificación de DNA a través de reacciones de PCR utilizando oligonucleótidos específicos para las secuencias de *Dmp8*, *Dmp18*, el bicistrón *Dmp8-Dmp18*, los transgenes de *Dmp8-H6*, *H6-Dmp8*, *Dmp18-myc* y *myc-Dmp18*, y como control una región de *rp49* (Cuadro II del Anexo II). Las condiciones de PCR utilizadas fueron las mismas que se describieron en la sección 3.1.

4. Obtención de extractos proteicos de moscas adultas y embriones.

4.1 Obtención de proteínas solubles totales

Para obtener el extracto de proteínas solubles totales de organismos adultos y de embriones de *Drosophila* se utilizaron dos métodos. El primero de ellos consistió en homogenizar la muestra (moscas adultas o embriones decorionados) en el buffer de homogenización (250 mM sacarosa, 50 mM Tris pH 7.5, 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM EDTA) con inhibidores de proteasas (cOmplete, Roche) y 0.2 mM PMSF, utilizando un homogenizador de vidrio con pistilo de teflón. Luego, se adicionó SDS hasta una concentración final de 1 % (v/v) aproximadamente y se centrifugó a no más de 10,000 x *g* a 4°C por 10 min. Finalmente, el sobrenadante se recuperó en un tubo limpio con ayuda de una pipeta y la determinación de la cantidad de proteínas totales solubles de cada muestra se llevó a cabo por el método de Bradford.

El segundo método para aislar las proteínas solubles totales fue utilizando Trizol (Invitrogen). Una vez que se homogenizó la muestra (máximo 100 mg por mL de Trizol), se eliminaron los restos de tejido y se añadió 0.2 mL de cloroformo por mL de Trizol. Se centrifugó a no más de 12,000 x *g* por 15 min a temperatura ambiente (TA) y, una vez eliminada la fase acuosa superior y la interfase, se adicionó 1.5 mL de isopropanol (por mL

de Trizol empleado) a la fase rojiza de fenol-cloroformo. Se incubó por 10 min a TA y las proteínas presentes se precipitaron a 12,000 x *g* por 10 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se lavó 3 veces (20 min cada lavado a TA) con una solución de 0.3 M hidrocloreto de guanidina en 95% etanol. Luego, se hizo un lavado más (20 min a TA) con 100% etanol. Las centrifugaciones de los lavados se hicieron a 7,500 x *g* por 5 min a 4°C. Finalmente, una vez seca la pastilla se disolvió en una solución de 1% SDS con ayuda de una pipeta e incubando la muestra a 50°C.

4.2 Obtención de proteínas de la fracción nuclear soluble

La obtención del extracto nuclear a partir de embriones de *D. melanogaster* se basó en un método del laboratorio de Kadonaga J. T. modificado por Pazin M. J. (Sullivan *et. al.*, 2000), el cual permite la extracción de los núcleos en condiciones de baja salinidad. Los embriones colectados (0-21 horas de desarrollo) se decorionaron sumergiéndolos por 1 minuto (min) en una solución de cloro al 50%. Luego de varios lavados con abundante agua destilada, se secaron en una malla de nylon sobre toallas de papel para quitar el exceso de agua y se pesaron. A partir de este momento se comenzó a trabajar a 4°C en el cuarto frío. Por cada gramo de embriones se añadieron 3 mL de buffer I (15 mM HEPES pH 7.6, 10 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA y 350 mM sacarosa) con inhibidores de proteasas y 0.2 mM PMSF, y se desbarataron pasándolos tres veces en un homogenizador a 1000 rpm. La muestra homogenizada se filtró a través de una malla de Nitex, los restos de tejido se lavaron con buffer I (2 mL/gr de embriones) y se centrifugó a 10,000 x *g* a 4°C por 15 min para obtener la pastilla de núcleos. Se guardó el sobrenadante, que es la fracción de proteínas solubles del citoplasma, mientras que la pastilla se resuspendió en buffer I (3 mL/gr de embriones) y se volvió a centrifugar a 10,000 x *g* a 4°C por 15 min. Luego, se resuspendió en buffer AB (15 mM HEPES pH 7.6, 110 mM KCl, 5 mM MgCl₂ y 0.1 mM EDTA) con inhibidores de proteasas y 0.2 mM PMSF, utilizando 1 mL por cada gramo de embriones. La suspensión se transfirió a un tubo previamente pesado y se centrifugó a 10,000 x *g* a 4°C por 10 min. Luego de la centrifugación, el sobrenadante se decantó y el tubo con la nueva pastilla se pesó para

calcular la masa de núcleos obtenidos, restando a esta cantidad el peso del tubo vacío. Por cada gramo de núcleos obtenido, se añadieron 0.5 ml de buffer HEMG20 (25 mM HEPES pH 7.6, 12.5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 20% (v/v) glicerol) conteniendo 0.1 M de KCl, inhibidores de proteasas y 0.2 mM PMSF. La pastilla se resuspendió y la suspensión se incubó en hielo por 1 hora. Posteriormente, se hizo una ultracentrifugación a 100,000 x g a 4°C por 1 hora para obtener cuatro fracciones (de arriba abajo): delgada capa de lípidos, capa líquida de color amarillo y transparente que comprende alrededor del 50% del volumen total y representa la fracción nuclear soluble (SNF), capa líquida grisácea de material insoluble y capa sólida de material nuclear.

Para la obtención de SNF a partir de moscas adultas, se hicieron algunas modificaciones del protocolo ya descrito. Inicialmente, fue necesario coleccionar al menos 10 g de adultos los cuales se almacenaron a -70°C en buffer I con inhibidores de proteasas y 0.2 mM PMSF. Por cada gramo de moscas se adicionaron 3 ml de buffer I y la concentración final de sacarosa se ajustó a 350 mM tomando en cuenta el volumen final (moscas más buffer). Para la homogenización del tejido se pasaron 15 veces las moscas a través de un homogenizador a 1000 rpm. Luego, el homogenizado se filtró dos veces a través de malla de Nitex de poro mediano y fino. Los restos de tejido que quedaron en el filtro se lavaron con 5 ml adicionales de buffer I. El resto del procedimiento fue el mismo que para los embriones.

La cantidad de proteína en los extractos solubles obtenidos (fracción citoplásmica y SNF) se determinó a través del reactivo de Bradford (BioRad) siguiendo el protocolo establecido por el proveedor.

5. Células S2R+

5.1 Cultivo de células S2R+

5.1.1 Mantenimiento

Las células S2R+ de *Drosophila*, una sublínea de las células Schneider S2 que es capaz de responder a la señalización de Wingless (Yanagawa *et. al.*, 1998), se crecieron a 26°C y sin CO₂ en medio completo: medio de Schneider (Sigma-Aldrich 50146)

suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS; Hyclone SH30396.03) inactivado por calor, 100 U de penicilina, 100 ug/mL estreptomina y 0.25 ug/mL anfotericina B (solución de antibiótico-antimicótico; Sigma-Aldrich A5955). Cada cultivo alcanzó la confluencia en 2-3 días usando un factor de dilución 1:3, o en 5-6 días con una dilución 1:10.

5.1.2 *Conteo celular*

Antes de guardar las alícuotas para congelación o iniciar los cultivos para ensayos de transfección, se analizó la viabilidad celular usando azul de tripano, ensayo que también sirvió para determinar la densidad celular. Se preparó una suspensión uniforme de células tomando una alícuota inicial no menor a 200 uL de cultivo y añadiendo un volumen de solución de azul de tripano. Se llenó una cámara del hematocitómetro y se colocó el cubreobjetos. Con ayuda de un microscopio para cultivo (Olympus CKX31) se contaron las células localizadas en cada una de las cuatro esquinas y en los cuadros centrales, usando el objetivo 20X. Las células viables excluyen el colorante. El número total de células debe exceder 100 para ser confiable. Para determinar el número de células por mililitro se usó la siguiente fórmula:

$$\text{células / mL} = \frac{\text{\# de células contadas}}{\text{\# de cuadros contados}} \times 10^4 \times \text{factor de dilución}$$

5.1.3 *Congelación y descongelación*

Para su congelación, las células S2R+ se desprendieron de la botella con ayuda de una pipeta serológica y el cultivo se centrifugó por 2-3 minutos a 3000 rpm a 4°C; la pastilla celular se resuspendió en medio completo y se obtuvo la cantidad de células/mL. Se volvió a centrifugar y la pastilla se resuspendió en medio de congelación (medio Schneider suplementado con 20% FBS, con solución de antibiótico-antimicótico y 10% DMSO) para obtener una densidad celular de 5 a 10 millones de células/mL. Se realizaron alícuotas de 1 mL de suspensión celular por vial, se enfriaron a 4°C por 30 minutos, luego se mantuvieron a -20°C toda la noche y a -70°C por 24 horas y, finalmente, se almacenaron en nitrógeno líquido.

Para su descongelación, una vez que se sacó un vial de células del nitrógeno líquido, se descongeló rápidamente en un baño de agua a 25°. El mL de suspensión celular

se vertió en un tubo Falcon con 4 mL de medio completo y se incubó por 2-4 horas a temperatura ambiente. Luego, las células se resuspendieron y se centrifugaron a 3000 rpm, se decantó el medio para eliminar el DMSO y la pastilla se resuspendió en medio completo para sembrarse en una botella e incubarse a 26°C.

5.2 Transfección transitoria y obtención de extractos de proteínas solubles totales.

Las secuencias completas del cDNA de *Dmp8* y *Dmp18* se obtuvieron por transcripción reversa y PCR (RT-PCR), y se clonaron en los vectores pGEX4T-1 y pBluescript-KS(+), respectivamente. Una vez secuenciado, el producto de PCR correspondiente al marco de lectura completo de *Dmp8* se sub-clonó en los sitios *EcoR I* – *Not I* del vector de expresión pAc5.1/V5-His A (Anexo III panel a) para obtener una proteína de *Dmp8* con las etiquetas de V5 y 6-Histidinas en su extremo carboxilo (*Dmp8*-V5). Asimismo, *Dmp8* se clonó en otro vector pAc5.1/V5-His A modificado (Anexo III panel c) para generar una proteína con tres secuencias del epítipo FLAG (3XFLAG) en su extremo carboxilo (*Dmp8*-FLAG). Por otro lado, el plásmido de expresión para *Dmp18* se construyó a partir de otro vector pAc5.1/V5-His A modificado (Anexo III panel b) que permitió producir la proteína con la etiqueta 3XFLAG en su extremo amino (FLAG-*Dmp18*).

Los oligonucleótidos que se emplearon en la subclonación de *Dmp8* y *Dmp18* en los vectores de expresión de las células S2R+ fueron: ECOR1KOZp8 y p8-3'-NotI-nvo para *Dmp8* y ECOR1-p18 y p18-3-NOT1 para *Dmp18* (Cuadro III del Anexo II).

Las células S2R+ fueron independientemente transfectadas o co-transfectadas con cada construcción para permitir la expresión de las proteínas recombinantes de *Dmp8* y/o *Dmp18*. Para la transfección transitoria se utilizó fosfato de calcio (*Drosophila S2 Cells manual*, Invitrogen). En transfecciones sencillas se emplearon 19 ug de DNA plasmídico y en las co-transfecciones 10 ug de cada plásmido. Después de dos días, las células transfectadas se colectaron en buffer de lisis (25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 1% Triton X-100, 0.2 mM PMSF, pH 7.8) con inhibidores de proteasas.

Para obtener el extracto de proteínas solubles totales, las células se incubaron en el buffer de lisis por 30 min en rotación constante a 4°C y se centrifugaron a no más de 10,000 x *g* por 10 min a 4°C. El sobrenadante se recuperó en un tubo limpio y la

concentración de proteína de los extractos obtenidos se determinó mediante el reactivo de Bradford. Finalmente, la expresión de las proteínas recombinantes se analizó mediante ensayos tipo Western (Sección 7).

5.3 Co-inmunoprecipitación de proteínas

Una vez obtenido el extracto de proteínas solubles de las células S2R+, se reservó una fracción como 'Input'. El resto del extracto se incubó durante 1 h a 4°C con 40-50 μ L (v/v) de perlas de agarosa con proteína G (Invitrogen) previamente bloqueadas con PBS + 0.1% albúmina de suero bovino (BSA). Se centrifugó a 3,000 rpm por 2 min a 4°C y se recuperó el extracto pre-limpiado en un tubo nuevo. Este paso se repitió una vez más y cada muestra de perlas se marcó como pre-limpiados 1 y 2. Posteriormente, la mitad del extracto pre-limpiado se incubó a 4°C en rotación constante durante toda la noche con 2 μ g de anticuerpo monoclonal primario (anti-FLAG M2, Sigma) por cada mg de proteína presente en el extracto. La otra mitad del extracto se incubó en las mismas condiciones con un anticuerpo irrelevante (por ejemplo, una IgG de la misma especie en la que se produjo el anticuerpo primario de interés). Al siguiente día, a cada muestra se agregaron 20 μ L de agarosa con proteína G y se incubaron por 2 h a 4°C con rotación constante. Luego, se centrifugaron a 3,000 rpm a 4°C por 5 min. El sobrenadante se recuperó en un tubo limpio y se marcó como la fracción no unida (NU), mientras que las perlas se marcaron como la fracción de proteínas co-inmunoprecipitadas (IP). Finalmente, todas las muestras con perlas de agarosa se lavaron 4 veces con 1 mL de buffer de lisis.

Para determinar si las proteínas de interés co-inmunoprecipitaron, las muestras se separaron por electroforesis en un gel desnaturizante de acrilamida, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (0.2 μ m) y se analizaron mediante la técnica de Western.

6. Anticuerpos.

En este trabajo se utilizaron dos anticuerpos policlonales de conejo contra Dmp8, obtenidos por New England Peptides (NEP. Inc.), usando péptidos sintéticos correspondientes a los aminoácidos 45 a 59 y 62 a 73, respectivamente. El anticuerpo

policlonal contra Dmp18, generado en conejo usando un péptido sintético que corresponde a los aminoácidos 92 a 108 de la proteína fue obtenido por Sigma-Genosys. Los anticuerpos policlonales anti-XPD (S-19) y anti-CDK7 (ds-17) se adquirieron de Santa Cruz Biotechnology. El anticuerpo contra XPB fue previamente reportado por Aguilar-Fuentes (2006). El anticuerpo policlonal anti-Dmp52 se generó en rata usando los últimos 14 aminoácidos de esta proteína como epítotope (NEP. Inc.). Otros anticuerpos utilizados fueron: anti- β tubulina (E7) del banco Developmental Studies Hybridoma Bank, anti-TFIID (TBP, sc-421) de Santa Cruz Biotechnology, anti-c-myc (clona 9E10, Roche) y anti-FLAG (F1804 y F7425, Sigma).

El anticuerpo policlonal contra Dmp18 se purificó por columna de afinidad Affi-Gel 10 (Bio-Rad), en la cual se acopló el péptido antigénico que se utilizó para generar este anticuerpo.

Para los experimentos de inmunotinción de cromosomas politénicos (Figura 9 de la sección de Resultados) se emplearon los anticuerpos anti-XPD (Reynaud *et. al*, 1999) y un anticuerpo policlonal anti-Dmp18 distinto al utilizado para los ensayos tipo Western, reportado previamente por Cruz Becerra (2008).

6.1 Análisis para corroborar la especificidad de los anticuerpos

Para confirmar que los anticuerpos generados contra Dmp8 y Dmp18 reconocían específicamente a estas proteínas en un extracto de proteínas solubles de mosca, se llevaron a cabo ensayos tipo Western utilizando dichos anticuerpos previamente incubados con un péptido cuya secuencia correspondía al epítotope de Dmp8 o Dmp18 con el que fueron generados. Para asegurar que prácticamente todas las moléculas del anticuerpo estuvieran ocupadas con el péptido antigénico, cada anticuerpo se incubó por 2 horas con 10-100 veces más exceso molar de péptido. El cálculo de tales concentraciones se hizo de la siguiente manera:

- Cálculo de la concentración molar del anticuerpo: $1 \text{ M} = 150,000 \text{ g/L}$
- Cálculo de la concentración molar del péptido: $1 \text{ M} = \text{peso molecular en g/L}$

El peso molecular se obtuvo de acuerdo a la secuencia del péptido con ayuda del programa ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>).

El cálculo de los volúmenes necesarios para mantener la relación molar 1:10 de anticuerpo: péptido se hizo con base en la estimación de la concentración de cada uno, determinada con ayuda de un espectrofotómetro (NanoDrop). Finalmente, para definir el volumen final de anticuerpo que se incubaría con el péptido correspondiente, fue necesario considerar la dilución a la que se empleaba dicho anticuerpo para el ensayo tipo Western. A continuación se da el ejemplo de los cálculos realizados para Dmp8.

Anticuerpo anti-Dmp8:

- Concentración: 33.23 mg/mL
- 10 nM de anticuerpo = 1500 ug/mL; si se quiere incubar en un volumen final de 50 uL, se necesitan 75 ug de anticuerpo

$$(1500 \text{ ug})(50 \text{ uL})/1000\text{uL} = 75 \text{ ug de anticuerpo}$$
- Para tener 10 nM del anti-Dmp8 se necesitan 2.26 uL

$$\begin{array}{l} 33.03 \text{ ug de anticuerpo --- en } 1 \text{ uL} \\ 75 \text{ ug de anticuerpo ---- X} \quad \rightarrow \quad X = 2.26 \text{ uL} \end{array}$$

Péptido Dmp8:

- Secuencia: CISTDIVEVLQARVD
- Peso molecular: 1699 g/L = 1M
Entonces 100 nM = 169.9 ug/mL
- Para tener 100 nM en 50 uL necesito 8.5 ug de péptido

$$(169.9 \text{ ug})(50 \text{ uL}) / 1000 \text{ uL} = 8.5 \text{ ug}$$
- Concentración de la solución del péptido: 2.4 mg/mL
- Para tener 8.5 ug de péptido se necesitan 3.6 uL

$$\begin{array}{l} 2.4 \text{ ug de péptido --- } 1 \text{ uL} \\ 8.5 \text{ ug de péptido --- Y} \quad \rightarrow \quad Y = 3.6 \text{ uL} \end{array}$$

Entonces, se deben incubar 2.26 uL de anti-Dmp8 con 3.6 uL de péptido en un volumen de 50 uL. Ya que este anticuerpo se utiliza en una dilución 1:1000 para el ensayo tipo Western, se usarían 2.26 mL de solución para incubar la membrana con esta mezcla.

7. Ensayos tipo Western

Las proteínas solubles de todos los extractos obtenidos, a partir de los embriones, de las moscas adultas y de las células S2R+, se separaron en geles de acrilamida al 15 y 12% mediante electroforesis en una dimensión bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (0.20 μ m, Amersham) por 12-16 horas a 80 mA más 1-2 horas a 200 mA a 4°C. Las membranas se bloquearon por 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C, con una solución de 10 o 20% de leche en polvo en 1X PBS con 0.1% Tween-20 (PBT). Los anticuerpos primarios se incubaron en 5% leche en PBT por 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C para el caso de anti-Dmp8. Posteriormente, se hicieron 6 lavados (de 10 min cada uno) con PBT y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente en 5% leche en PBT con el correspondiente anticuerpo secundario acoplado a HRP (1:2000, Rockland). Finalmente, se realizaron 5 lavados (de 10 min cada uno) con PBT y uno con PBS. La detección de la señal se llevó a cabo con el sistema ECL plus (GE Healthcare) o SuperSignal West Pico (Thermo Scientific).

Para el análisis de expresión de las proteínas híbridas de Dmp8 y Dmp18 los anticuerpos primarios utilizados en los ensayos tipo Western y las diluciones empleadas para cada uno fueron: anti-Myc (1:400), anti-His6 (1:200), anti-Dmp8 (1:1000) y anti-Dmp18 purificado por columna de afinidad (1:1000). Para la inmunodetección de componentes de TFIIH, además de Dmp8, se emplearon los anticuerpos anti-Dmp52 (1:500), anti-XPB (1:1000) y anti-CDK7 (1:1000). Para los ensayos tipo Western con extractos de células S2R+, además de los anticuerpos que reconocen las subunidades de TFIIH y el anti-Dmp18, se utilizaron anti-FLAG M2 (1:10,000-1:20,000) y anti-V5 policlonal de conejo (1:10,000-1:20,000). Como control de carga se utilizaron los anticuerpos monoclonales anti- β Tubulina (1:2000-1:4000) o anti-TBP (1:1000).

8. Caracterización genética de la línea *P{lacW}I(2)SH1279*

Se hicieron cruzas entre organismos *P{lacW}I(2)SH1279/ CyO* con aquéllos que llevaban la inversión *In(2LR)Gla, wg^{Gla-1} Bc¹ Egfr^{E1}* (indicada únicamente como *In(2LR)Gla* en adelante) para que este último cromosoma funcionara como el nuevo balanceador de la inserción *I(2)SH1279*. Los heterócigos *I(2)SH1279/ In(2LR)Gla* se cruzaron entre sí y se permitió que la primera generación se desarrollara para evaluar la supervivencia de los organismos homócigos mediante el conteo de la progenie *wg^{Gla-1}* (marcador dominante que provoca que los ojos de las moscas se vean más pequeños, lisos y brillosos) (Brunner *et. al.*, 1999). Dicha supervivencia, reportada como porcentaje de viabilidad, se calculó dividiendo el número observado de moscas homócigas *I(2)SH1279* entre el número esperado y multiplicando este valor por 100. En este caso, el número esperado correspondió al número observado de organismos con el genotipo *I(2)SH1279/ In(2LR)Gla*.

Para caracterizar el fenotipo de las alas de los sobrevivientes homócigos, se observaron cuidadosamente los individuos adultos en un microscopio estereoscópico (Zeiss Stemi 2000-C). Se marcó el fenotipo de extensión de alas (“held-out wing”) cuando ambas alas se extendieron en un ángulo igual o mayor a 30° respecto a la línea media del cuerpo de la mosca (Figura 12). La penetrancia de este fenotipo se evaluó contando el número de individuos sin el marcador *wg^{Gla-1}*, o sea, que eran homócigos para la inserción, y cuántos de ellos tenían ambas alas extendidas.

Para evaluar la fertilidad de los sobrevivientes homócigos *I(2)SH1279*, se cruzaron hembras homócigas con machos *w¹¹¹⁸* y machos homócigos con hembras *w¹¹¹⁸*. Luego, se contó el número de huevos depositados y el número de ellos que se desarrollaron. Para este ensayo se realizaron tres experimentos independientes, cada uno con al menos tres cruzas por duplicado cada una.

Con la finalidad de corroborar que los fenotipos que presentan los homócigos *I(2)SH1279* se debía a la inserción del elemento P dentro del segundo exón de *Dmp8*, se realizaron cruzas recíprocas entre la línea *I(2)SH1279* y las deficiencias *Df(2L)Exel7022* y *Df(2L)BSC172*, las cuales descubren la región del bicistrón *Dmp8-Dmp18* (Anexo I). Como control se utilizó la deficiencia *Df(2L)BSC110*, que descubre una región genómica que es

común a la que pierden las dos deficiencias anteriores pero, que a diferencia de ellas, conserva el locus bicistrónico *Dmp8-Dmp18* (Anexo I). Adicionalmente, las tres deficiencias se cruzaron entre sí para determinar la viabilidad de los organismos homocigos y trans-heterocigos. Cabe mencionar que todas las deficiencias se balancearon con el cromosoma *In(2LR)Gla* para evaluar adecuadamente la supervivencia y los fenotipos de las alas.

9. Supresión de los fenotipos de los organismos homocigos *I(2)SH1279*.

Para evaluar la supresión de los fenotipos de letalidad, fertilidad y extensión de alas de los homocigos *I(2)SH1279*, se realizaron cruza entre la línea *I(2)SH1279* y las transgénicas que sobre-expresan, de manera ubicua y constitutiva, a *Dmp8-H6* ó a *myc-Dmp18*. El esquema de cruza desarrollado se muestra a continuación, donde *pCaSpeR* indica el transgen que codifica para *Dmp8-H6* ó *myc-Dmp18*.

(1A)

I(2)SH1279/ In(2LR)Gla ; TM2/ MKRS x *Sp/ In(2LR)Gla ; pCaSpeR/ MKRS*



I(2)SH1279/ In(2LR)Gla ; pCaSpeR/ MKRS

(1B)

I(2)SH1279/ In(2LR)Gla ; pCaSpeR/ MKRS x *I(2)SH1279/ In(2LR)Gla ; pCaSpeR/ MKRS*



I(2)SH1279/ I(2)SH1279 ; pCaSpeR/ MKRS

I(2)SH1279/ I(2)SH1279 ; pCaSpeR/ pCaSpeR

La viabilidad (en porcentaje) de las combinaciones homocigas y heterocigas de los alelos (genotipos de la progenie de la cruza 1B) se determinó dividiendo el número observado de moscas de cada genotipo entre el número esperado y multiplicando este valor por 100. Los números esperados se obtuvieron contando el número de individuos de cada genotipo (basándose en los cromosomas balanceadores que recibieron) y calculando el número de individuos de cada genotipo respecto a la clase más sana (genotipo con

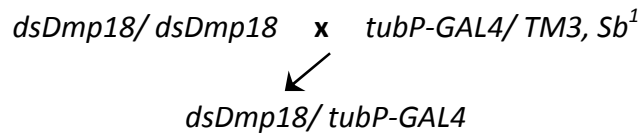
mayor número de individuos viables respecto a su frecuencia dentro de la progenie total). Adicionalmente, la fertilidad y la extensión de alas se evaluaron como se describió anteriormente.

10. Inducción del RNAi contra *Dmp18* en la mosca y evaluación de los fenotipos generados.

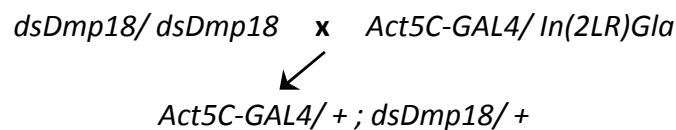
10.1 Inducción ubicua del RNAi contra *Dmp18*

Para inducir la expresión del UAS-RNAi contra *Dmp18* que contiene la línea *P{GD10407}v25909* (denominada *dsDmp18* en este trabajo), se cruzaron adultos *dsDmp18* con individuos *Act5C-GAL4* o *tubP-GAL4* (Stocks No. 4414 y 5138 en Anexo I), los cuales expresan el activador GAL4 de manera ubicua y constitutiva en la mosca, causando la inducción del UAS-RNAi de esa misma forma. La evaluación del efecto de la inducción del RNAi se hizo cuantificando la viabilidad (porcentaje de supervivencia) de las clases que llevaran una copia del UAS-RNAi y una del driver-GAL4. Dichas cruzas se hicieron a 18, 25 y 30°C ya que la actividad de GAL4 es dependiente de la temperatura, siendo mayor a 30°C.

(2)



(3)

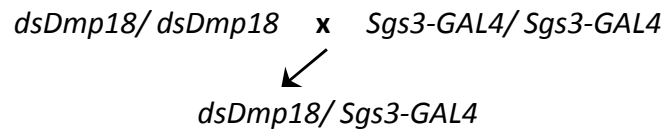


10.2 Inducción del RNAi contra *Dmp18* en las glándulas salivales y evaluación de los niveles de expresión de *Dmp8* y *Dmp18*.

La expresión del UAS-RNAi *dsDmp18* se indujo en las glándulas salivales de larvas de tercer instar mediante el driver *Sgs3-GAL4* (Stock No. 6870 en Anexo I). Adicionalmente, se indujo la co-expresión del UAS-RNAi y de UAS-Dicer 2 (*UAS-Dcr-2*)

(Stock No. 6008), el cual es un factor limitante en la producción de los RNAi en la mosca (Kim *et. al.*, 2003), con la finalidad de aumentar la expresión del RNAi. Como control de la correcta funcionalidad del driver, se hicieron cruzas entre moscas *Sgs3-GAL4* y una línea que lleva un UAS-GFP (Stock No. 1522) esperando que se provocara la inducción de la fluorescencia en ese tejido (Cruza 2). De esta manera, se disecaron las glándulas salivales en PBS, se depositaron en un portaobjetos con una gota de citifluor (Ted Pella, Inc.), se colocó un cubreobjetos y se observaron bajo el microscopio de fluorescencia (Zeiss Axiovert 200). Todas las cruzas se llevaron a cabo a 25°C.

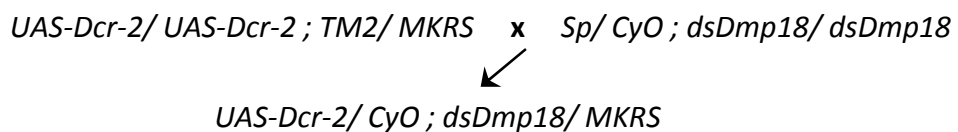
(4)



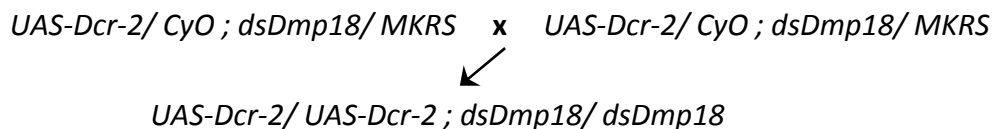
(5)



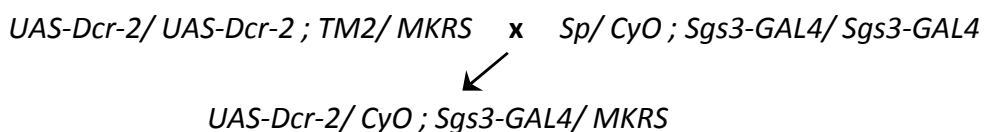
(6A)



(6B)



(7A)



(7B)

UAS-Dcr-2/ CyO ; Sgs3-GAL4/ MKRS x *UAS-Dcr-2/ CyO ; Sgs3-GAL4/ MKRS*

↙
UAS-Dcr-2/ UAS-Dcr-2 ; Sgs3-GAL4/ Sgs3-GAL4

(8)

UAS-Dcr-2/ UAS-Dcr-2 ; dsDmp18/ dsDmp18

x
UAS-Dcr-2/ UAS-Dcr-2 ; Sgs3-GAL4/ Sgs3-GAL4

↙
UAS-Dcr-2/ UAS-Dcr-2 ; dsDmp18/ Sgs3-GAL4

Las glándulas salivales de la progenie de la cruce 8 y de larvas que únicamente llevan el driver *Sgs3-GAL4*, se disecaron en buffer PBS con inhibidores de proteasas, se aisló el RNA total y se realizaron ensayos de RT-PCR semi-cuantitativa para analizar el efecto del RNAi *dsDmp18* sobre la expresión de los transcritos de *Dmp8* y *Dmp18*. Para ello, el cDNA utilizado como molde para las reacciones de PCR se sintetizó a partir de la misma cantidad de RNA total para cada una de las muestras que querían compararse. Se hizo una curva de amplificación para todas las secuencias de interés (*Dmp8*, *Dmp18* y *rp49* como control) para determinar en qué ciclo comenzaba la fase lineal de amplificación. Se preparó una misma mezcla de reacción por muestra y se prepararon reacciones de PCR individuales de 10 uL cada una para realizar las reacciones de PCR con punto final a distintos ciclos de amplificación (21 a 30). Todos los productos de amplificación se visualizaron en geles de 1.0-1.5% de agarosa con bromuro de etidio. La intensidad de las bandas de los productos de PCR se cuantificó por densitometría mediante el programa ImageJ (Java). Con los valores obtenidos se calculó la relación de la señal de *Dmp8* o *Dmp18* y la señal de su control interno *rp49*. La relación correspondiente para los distintos ciclos de amplificación indicó la cantidad relativa de cada transcrito y, con estos datos se comparó la expresión de *Dmp8* y *Dmp18* entre el fondo silvestre y el del RNAi.

A partir de las glándulas salivales de la progenie de la cruce 8 y de larvas silvestres, también se obtuvieron las proteínas solubles totales y se llevaron a cabo ensayos tipo Western para determinar la cantidad relativa de proteínas Dmp8 y Dmp18. Para la obtención de las proteínas solubles totales, las glándulas salivales (5-10 pares) se depositaron en 10 uL del buffer de homogenización del primer método descrito en la sección 4.1. Luego, se mezcló suavemente y se adicionó buffer Laemmli (Laemmli, 1970). Finalmente, las muestras se hirvieron 10 min a baño María, y las proteínas se separaron en geles de acrilamida al 15% mediante SDS-PAGE para el posterior análisis mediante Western blot. La densitometría de las señales de la inmunodetección de las proteínas se hizo con el programa ImageJ. Con esos valores se calculó la relación entre la cantidad de Dmp8 o Dmp18 respecto a la del control interno que fue β -Tubulina. De esta manera se comparó la expresión, a nivel de proteína, de Dmp8 y Dmp18 entre el fondo silvestre y el del RNAi.

10.3 Inducción del RNAi contra Dmp18 en el ala

Para inducir el UAS-RNAi *dsDmp18* en el ala de la mosca se utilizó el driver *MS1096* (Stock No. 8860 en Anexo I), el cual expresa a GAL4 en la región dorsal del disco imagal de ala (Capdevila y Guerrero, 1994). De la misma manera que para el caso de *Sgs3-GAL4*, se hicieron cruces entre el driver *MS1096* y una línea que lleva un transgen de UAS-GFP (Stock No. 1522 y 6452) para corroborar, mediante la observación bajo el microscopio de fluorescencia, la inducción de la expresión de GFP en la región dorsal de los discos imagales de alas. Se disecaron los discos de ala de las larvas dobles-heterocigas *MS1096/+; UAS-GFP/+*, se depositaron en un portaobjetos sobre una gota de citifluor, se colocó un cubreobjetos sobre la muestra y se observó bajo el microscopio.

De la cruce entre el driver y el *dsDmp18* se obtuvieron varios genotipos con combinaciones de distinto número de copias tanto para el driver-GAL4 como para el RNAi, que permitieron evaluar, de manera dosis-dependiente, el efecto de la expresión del RNAi. Las cruces se realizaron a 25°C.

se incluyó una copia de GAL80 (Stock No. 108071 en Anexo I) en las moscas homocigas para el driver *MS1096* y para el UAS-RNAi. Se sabe que GAL80 es inhibidor de GAL4. Las cruces se realizaron a 25°C y se analizaron los fenotipos bajo el microscopio estereoscópico.

(11A)

tubP-GAL80/tubP-GAL80 ; TM2/ MKRS x *Sp/ CyO ; dsDmp18/ dsDmp18*



tubP-GAL80/ CyO ; dsDmp18/ MKRS

(11B)

tubP-GAL80/ CyO ; dsDmp18/ MKRS x *tubP-GAL80/ CyO ; dsDmp18/ MKRS*



tubP-GAL80/ tubP-GAL80 ; dsDmp18/ dsDmp18

(12A)

♀♀ *MS1096/ MS1096 ; Sp/ In(2LR)Gla ; TM2/ MKRS*

x

♂♂ *tubP-GAL80/ tubP-GAL80 ; dsDmp18/ dsDmp18*



♀ *MS1096/ + ; tubP-GAL80/ In(2LR)Gla ; dsDmp18/ MKRS*

♂ *MS1096/ Y ; tubP-GAL80/ In(2LR)Gla ; dsDmp18/ MKRS*

(12B)

♀♀ *MS1096/ MS1096 ; Sp/ In(2LR)Gla ; TM2/ MKRS*

x

♂♂ *MS1096/ Y ; tubP-GAL80/ In(2LR)Gla ; dsDmp18/ MKRS*



♀ *MS1096/ MS1096 ; tubP-GAL80/ In(2LR)Gla ; dsDmp18/ MKRS*

♂ *MS1096/ Y ; tubP-GAL80/ In(2LR)Gla ; dsDmp18/ MKRS*

(12C)

♀♀ *MS1096/MS1096 ; tubP-GAL80/ In(2LR)Gla ; dsDmp18/ MKRS*
x
♂♂ *MS1096/Y ; tubP-GAL80/ In(2LR)Gla ; dsDmp18/ MKRS*
↓
♀ *MS1096/MS1096 ; tubP-GAL80/ In(2LR)Gla ; dsDmp18/ dsDmp18*
♂ *MS1096/Y ; tubP-GAL80/ In(2LR)Gla ; dsDmp18/ dsDmp18*

11.2 Expresión de Dmp8-H6 y myc-Dmp18 para evaluar la supresión del efecto del RNAi

Para evaluar si la expresión de Dmp8 y/o Dmp18 permitían la supresión de los fenotipos de las alas en las moscas *MS1096>dsDmp18*, se realizaron cruzas (a 25°C) que permitieron obtener individuos con una y dos copias de *Dmp8-H6* o *myc-Dmp18* y con una o dos copias del UAS-RNAi en un fondo homocigo (hemocigo en los machos) para *MS1096*. Las líneas transgénicas de *Dmp8-H6* y *myc-Dmp18* utilizadas, fueron las generadas a partir del vector pUAST, el cual permite dirigir la expresión del transgen de interés bajo el control de GAL4. De esta manera, *Dmp8-H6* o *myc-Dmp18* (señalados como pUAST en el siguiente esquema de cruzas) se expresaron, conjuntamente con el RNAi, sólo en el ala de la mosca.

(13A)

pUAST/pUAST ; TM2/ MKRS x *CyO/ In(2LR)Gla ; dsDmp18/ dsDmp18*
↓
pUAST/ In(2LR)Gla ; dsDmp18/ MKRS

(13B)

pUAST/ In(2LR)Gla ; dsDmp18/ MKRS x *pUAST/ In(2LR)Gla ; dsDmp18/ MKRS*
↓
pUAST/pUAST ; dsDmp18/ dsDmp18

(14A)

♀♀ *MS1096/ MS1096 ; Sp/ In(2LR)Gla ; TM2/ MKRS*
x
♂♂ *pUAST/ pUAST ; dsDmp18/ dsDmp18*
↓
♀ *MS1096/ + ; pUAST/ In(2LR)Gla ; dsDmp18/ MKRS*
♂ *MS1096/ Y ; pUAST/ In(2LR)Gla ; dsDmp18/ MKRS*

(14B)

♀♀ *MS1096/ MS1096 ; Sp/ In(2LR)Gla ; TM2/ MKRS*
x
♂♂ *MS1096/ Y ; pUAST/ In(2LR)Gla ; dsDmp18/ MKRS*
↓
♀ *MS1096/ MS1096 ; pUAST/ In(2LR)Gla ; dsDmp18/ MKRS*
♂ *MS1096/ Y ; pUAST/ In(2LR)Gla ; dsDmp18/ MKRS*

(14C)

♀♀ *MS1096/ MS1096 ; pUAST/ In(2LR)Gla ; dsDmp18/ MKRS*
x
♂♂ *MS1096/ Y ; pUAST/ In(2LR)Gla ; dsDmp18/ MKRS*
↓
♀ *MS1096/ MS1096 ; pUAST/ In(2LR)Gla ; dsDmp18/ dsDmp18*
♂ *MS1096/ Y ; pUAST/ In(2LR)Gla ; dsDmp18/ dsDmp18*
♀ *MS1096/ MS1096 ; pUAST/ pUAST ; dsDmp18/ MKRS*
♂ *MS1096/ Y ; pUAST/ pUAST ; dsDmp18/ MKRS*

Los fenotipos de las alas de la progenie de las cruzas 14B y 14C se observaron bajo el microscopio estereoscópico y se compararon entre sí. Como control en la caracterización de estos fenotipos se utilizó la progenie de las cruzas 15B y 15C, señaladas a continuación, las cuales se llevaron a cabo a 25°C:

(15A)

♀♀ *MS1096/ MS1096 ; Sp/ In(2LR)Gla ; TM2/ MKRS*
x
CyO/ In(2LR)Gla ; dsDmp18/ dsDmp18
↓
♀ *MS1096/ + ; Sp/ In(2LR)Gla ; dsDmp18/ MKRS*
♂ *MS1096/ Y ; Sp/ In(2LR)Gla ; dsDmp18/ MKRS*

(15B)

♀♀ *MS1096/MS1096; Sp/In(2LR)Gla; TM2/MKRS*
x
♂♂ *MS1096/Y; Sp/In(2LR)Gla; dsDmp18/MKRS*
↓
♀ *MS1096/MS1096; Sp/In(2LR)Gla; dsDmp18/MKRS*
♂ *MS1096/Y; Sp/In(2LR)Gla; dsDmp18/MKRS*

(15C)

♀♀ *MS1096/MS1096; Sp/In(2LR)Gla; dsDmp18/MKRS*
x
♂♂ *MS1096/Y; Sp/In(2LR)Gla; dsDmp18/MKRS*
↓
♀ *MS1096/MS1096; Sp/In(2LR)Gla; dsDmp18/dsDmp18*
♂ *MS1096/Y; Sp/In(2LR)Gla; dsDmp18/dsDmp18*

12. Análisis de la interacción genética entre *Dmp8* y *Dmp18*

La evaluación de la interacción genética entre *Dmp8* y *Dmp18* se llevó a cabo mediante la obtención de moscas con fondo homócigo *I(2)SH1279* que expresaron el RNAi *dsDmp18* en el ala de las moscas mediante la inducción con el driver *MS1096*. Los fenotipos de las alas se observaron cuidadosamente bajo el microscopio estereoscópico y, posteriormente, las alas se disectaron en seco y se fotografiaron para comparar su tamaño y evaluar su deformación mediante el análisis de las imágenes.

(16A)

♀♀ *MS1096/MS1096; Sp/In(2LR)Gla; TM2/MKRS*
x
♂♂ *I(2)SH1279/In(2LR)Gla; TM2/MKRS*
↓
♀ *MS1096/+; I(2)SH1279/In(2LR)Gla; TM2/MKRS*
♂ *MS1096/Y; I(2)SH1279/In(2LR)Gla; TM2/MKRS*

(16B)

♀♀ *MS1096/ MS1096 ; Sp/ In(2LR)Gla ; TM2/ MKRS*
x
♂♂ *MS1096/ Y ; I(2)SH1279/ In(2LR)Gla ; TM2/ MKRS*
↓
♀ *MS1096/ MS1096 ; I(2)SH1279/ In(2LR)Gla ; TM2/ MKRS*
♂ *MS1096/ Y ; I(2)SH1279/ In(2LR)Gla ; TM2/ MKRS*

(16C)

♀♀ *MS1096/ MS1096 ; I(2)SH1279/ In(2LR)Gla ; TM2/ MKRS*
x
♂♂ *MS1096/ Y ; I(2)SH1279/ In(2LR)Gla ; TM2/ MKRS*
↓
♀ *MS1096/ MS1096 ; I(2)SH1279/ I(2)SH1279 ; TM2/ MKRS*
♂ *MS1096/ Y ; I(2)SH1279/ I(2)SH1279 ; TM2/ MKRS*

(17A)

♀♀ *MS1096/ MS1096 ; Sp/ In(2LR)Gla ; dsDmp18/ dsDmp18* [De la progenie de la cruce 12C]
x
♂♂ *MS1096/ Y ; I(2)SH1279/ In(2LR)Gla ; TM2/ MKRS* [De la progenie de la cruce 13B]
↓
♀ *MS1096/ MS1096 ; I(2)SH1279/ In(2LR)Gla ; dsDmp18/ MKRS*
♂ *MS1096/ Y ; I(2)SH1279/ In(2LR)Gla ; dsDmp18/ MKRS*

(17B)

♀♀ *MS1096/ MS1096 ; I(2)SH1279/ In(2LR)Gla ; dsDmp18/ MKRS*
x
♂♂ *MS1096/ Y ; I(2)SH1279/ In(2LR)Gla ; dsDmp18/ MKRS*
↓
♀ *MS1096/ MS1096 ; I(2)SH1279/ I(2)SH1279 ; dsDmp18/ MKRS*
♂ *MS1096/ Y ; I(2)SH1279/ I(2)SH1279 ; dsDmp18/ MKRS*
♀ *MS1096/ MS1096 ; I(2)SH1279/ I(2)SH1279 ; dsDmp18/ dsDmp18*
♂ *MS1096/ Y ; I(2)SH1279/ I(2)SH1279 ; dsDmp18/ dsDmp18*

RESULTADOS

La subunidad Dmp8 de TFIIH y el homólogo de Swc6/p18^{Hamlet} (Dmp18) están codificados en un transcrito bicistrónico en *D. melanogaster*

Durante la caracterización de *Dmp8*, el homólogo de p8/TTDA en *Drosophila melanogaster* (la mosca de la fruta), se encontró que el gen que codifica para esta subunidad de TFIIH está en un locus bicistrónico (Figura 2a) localizado en el segundo cromosoma (2L: 5,009,931–5,010,825) y cuyo transcrito codifica dos marcos de lectura (NM_135051 y NM_001144319, NCBI). El transcrito bicistrónico tiene un intrón de 50 pares de bases (pb) localizado 35 pb después del codón de inicio de la traducción de *Dmp8* (Figura 2a). El segundo marco de lectura abierto (ORF) codifica para una proteína (la cual denominamos Dmp18 en este trabajo) cuya secuencia de aminoácidos es similar a la proteína p18^{Hamlet}/ZNHIT1 de humano o Swc6 de levadura (Figura 2b), la cual forma parte de los complejos remodeladores de la cromatina SRCAP de humano o SWR1 de levadura (Cai *et. al.*, 2005; Wu *et. al.*, 2005; Lu *et. al.*, 2009; Luk *et. al.*, 2010; revisado en Bao y Shen, 2007a). Estos complejos remodeladores son los encargados de realizar el intercambio de la histona H2A canónica por la variante H2AZ (Htz1 en levadura), lo cual parece ser relevante en regiones promotoras para que ocurra la activación de la transcripción (Wong *et. al.*, 2007) y necesario en las regiones de DNA dañadas para la remoción de la histona H2AX fosforilada (Lu *et. al.*, 2009; Van Attikum y Gasser, 2009; Morillo-Huesca *et. al.*, 2010). Por otro lado, se ha señalado la participación de p18^{Hamlet}/ZNHIT1 en respuestas a estrés genotóxico donde participan las MAP cinasas p38 α y p38 β , y la proteína p53 (Cuadrado *et. al.*, 2007 y 2010; Lafarga *et. al.*, 2007).

La organización génica en un locus bicistrónico es poco frecuente en organismos eucariontes, sin embargo, existen ejemplos de transcritos bicistrónicos que codifican dos proteínas funcionalmente relacionadas (revisado en Blumenthal, 2004). A través de un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas Dmp8 y Dmp18 se encontró que ambas se encuentran conservadas (datos no mostrados). Sin embargo,

lo más interesante fue que los genes de *p8* y *p18* están organizados en un locus bicistrónico en todas las especies de *Drosophila* secuenciadas hasta el momento (Figura 3). A pesar de que la información sobre las secuencias transcritas expresadas (ESTs) sólo está disponible para algunas especies de *Drosophila*, la configuración de los genes (de acuerdo a la información publicada de los genomas secuenciados) es la misma en todas las especies, estando juntos *Dmp8* y *Dmp18* e incluyendo una región intergénica pequeña entre los dos ORFs (Figura 4). Adicionalmente, se encontró esta misma configuración en otros dípteros e insectos, así como en un crustáceo, cuyas secuencias de DNA y/o ESTs se han reportado (Figuras 3 y 4), lo que sugiere que la organización de *p8* y *p18* se ha conservado por más de 350 millones de años de evolución para asegurar, posiblemente, una expresión coordinada de estos dos factores codificados en un mRNA bicistrónico.

Con la finalidad de confirmar que los dos genes, *Dmp8* y *Dmp18*, se transcriben en un solo mRNA, y sabiendo que no existen reportes de otro gen que codifique alguna de estas proteínas en la mosca, se realizó un ensayo de transcripción reversa y PCR (RT-PCR) utilizando oligonucleótidos que flanquean el locus bicistrónico, los cuales hibridan con el 5' UTR de *Dmp8* (oligo Up5'-p8) o con el extremo 5' a partir del codón de inicio (oligo p8-5) y el 3' UTR de *Dmp18* (oligo ORF2-3'). Las secuencias de dichos oligos se encuentran en el Anexo I. Como se muestra en la Figura 5a, se identificó un único producto de PCR cuya identidad, confirmada por secuenciación (datos no mostrados), corresponde al bicistrón de *Dmp8* y *Dmp18*.

Mediante ensayos preliminares tipo Northern, empleando las secuencias de los ORFs independientes de *Dmp8* (222 pb) y *Dmp18* (456 pb) como sondas de DNA, con muestras de RNA total aislado de larvas de tercer estadio, se detectó un único RNA cuyo tamaño (aproximadamente 790 nucleótidos) correspondía al esperado para el transcrito bicistrónico de *Dmp8-Dmp18* (Dra. Dvorak Montiel; datos no mostrados). Con el objetivo de analizar si este mRNA bicistrónico se expresa a lo largo del desarrollo de la mosca y para verificar que sea el único transcrito a partir del cual se producen *Dmp8* y *Dmp18*, se

aisló RNA total de todas las etapas de desarrollo de *D. melanogaster* (desde embrión hasta adulto) y se realizó un ensayo tipo Northern utilizando como sonda la secuencia del cDNA completo de Dmp8-Dmp18 (Figura 5b) (M.C. Cruz Becerra G.). Este experimento reveló la presencia del transcrito bicistrónico en todas las etapas de desarrollo analizadas y no mostró la existencia de ningún otro mRNA de distinto tamaño que pudiera codificar a Dmp8 y/o Dmp18. Estos datos aunados a la existencia de los ESTs reportados, confirman que Dmp8 y Dmp18 están codificados en un solo transcrito y que no existen otras copias de estos ORFs en el genoma de la mosca.

El hecho de que exista este transcrito bicistrónico no necesariamente indica la existencia de las proteínas Dmp8 y Dmp18 en la mosca. Por ello, para verificar la expresión de ambas proteínas, se generaron anticuerpos específicos para cada una de ellas (ver sección de Materiales y Métodos) y se analizó su presencia, mediante ensayos tipo Western a partir de extractos de proteínas solubles totales obtenidos de moscas adultas (Figura 6a). Se identificó una proteína del peso molecular ligeramente mayor al esperado para Dmp8 (8 KDa). Sin embargo, para el caso de Dmp18 el anticuerpo reconoció dos bandas, una de ellas con el peso esperado de 18 KDa y la otra con una movilidad menor. Por otro lado, cuando se realizó un fraccionamiento celular que permitió aislar la fracción de proteínas solubles nucleares del resto de proteínas citoplásmicas, se observó que la señal de 18 KDa fue preferencialmente nuclear, mientras que la de mayor peso molecular se encontró en el citoplasma (Figura 6b). Cabe mencionar que la especificidad de estos anticuerpos se corroboró mediante ensayos tipo Western donde fueron capaces de reconocer a Dmp8 y Dmp18 fusionadas a GST (Figura S1 en Anexo IV). Asimismo, en experimentos de competencia con los péptidos antigénicos con que se generaron dichos anticuerpos la señal de inmunodetección fue abolida (Figura S1 en Anexo IV).

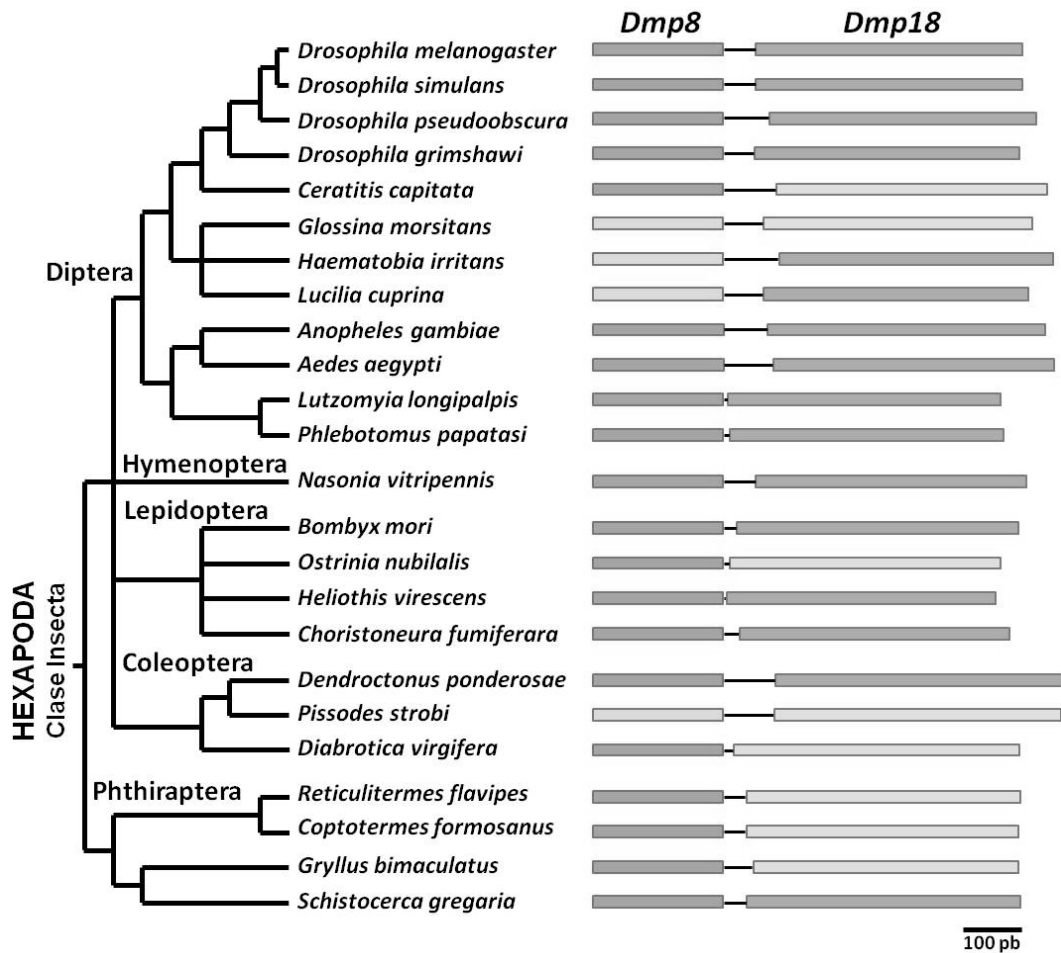


Figura 3. El transcrito bicistrónico de *Dmp8-Dmp18* se expresa en diferentes especies de insectos. Las secuencias de los transcritos se obtuvieron de los ESTs reportados en Genbank. Las cajas representan los ORFs de *Dmp8* y *Dmp18* (de izquierda a derecha) y la línea entre ellas representa la secuencia intergénica. Las cajas blancas indican cDNAs incompletos, ya sea en el extremo 5' (p8) o en el 3' (p18). Nótese que la región intergénica no es mayor a los 90 nucleótidos, inclusive, en algunos casos es muy pequeña; por ejemplo, en el gusano del tabaco *Heliothis virescens* que abarca sólo 2 nucleótidos. El árbol filogenético se realizó basándose en Waterhouse *et. al.* (2011) y en la base de datos sobre taxonomía del National Center of Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Root>).

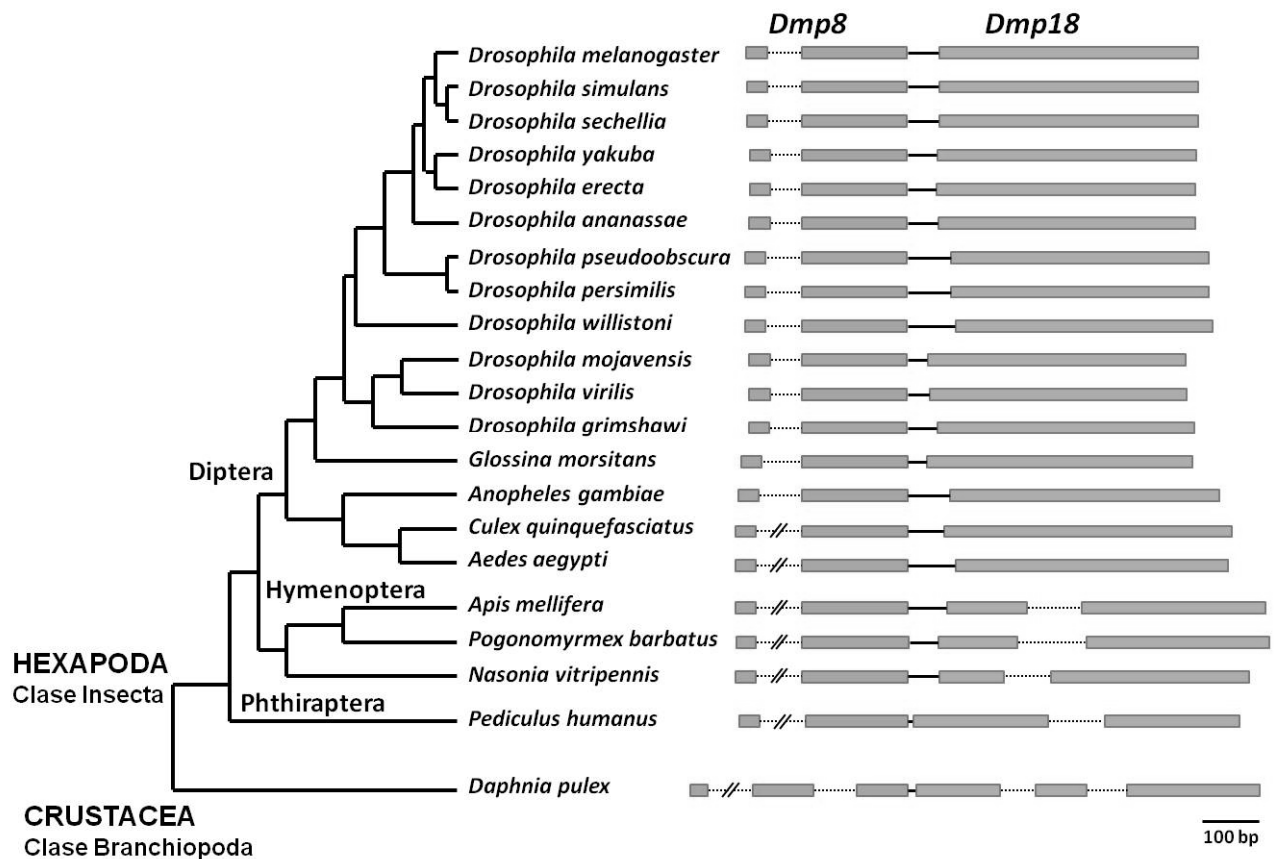


Figura 4. Organización génica de *p8* y *p18* en especies distintas de artrópodos. La configuración del gen de *p8*, que contiene un primer exón pequeño (30-36 pb) seguido de un intrón, se presenta en todos los genomas analizados. La región intergénica entre *p8* y *p18* varía en tamaño entre las diferentes especies, sin embargo nunca es mayor a los 90 pb. El gen de *p18* carece de intrones en la mayoría de las especies de dípteros, en cambio, en otros artrópodos presenta uno o dos intrones. En la figura, los exones se representan con las cajas grises, la región intergénica con la línea sólida y los intrones con líneas punteadas. El árbol filogenético se realizó basándose en Waterhouse *et. al.* (2011) y en la base de datos sobre taxonomía del National Center of Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Root>).

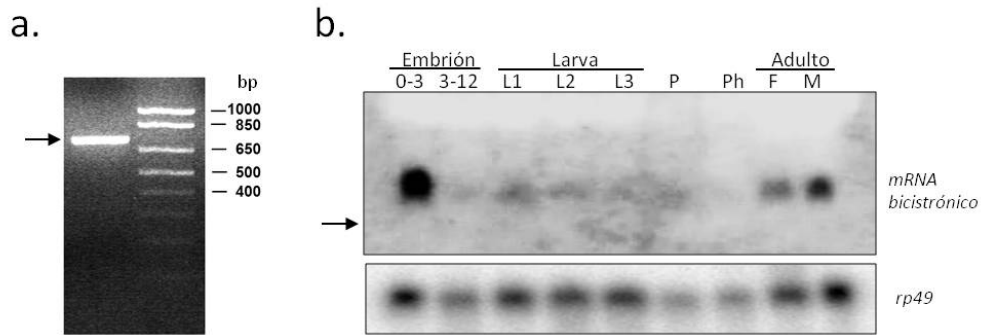


Figura 5. Dmp8 y Dmp18 están codificadas en un solo transcrito a lo largo del desarrollo de la mosca. (a) En *D. melanogaster* existe un único mRNA a partir del cual se expresan Dmp8 y Dmp18. El producto de la RT-PCR del transcrito bicistrónico (indicado por la flecha) se amplificó con oligos específicos que flanquean el mRNA *Dmp8-Dmp18* a partir de cDNA de adulto. Este fragmento fue secuenciado para confirmar la presencia de los dos ORFs completos (datos no mostrados). (b) Ensayo tipo Northern del desarrollo, utilizando la secuencia del cDNA completo de *Dmp8-Dmp18* como sonda, que muestra la presencia del transcrito bicistrónico en embriones (0-3 y 3-21 h), larvas de 1^{er}, 2^o y 3^{er} estadio (L1, L2 y L3), pupas (P), faratos (Ph) y adultos (hembras [F] y machos [M]). Ningún otro transcrito de distinto tamaño fue detectado. La flecha indica la posición de migración del mRNA de *rp49* (aproximadamente 650 nucleótidos) respecto a la del transcrito bicistrónico.

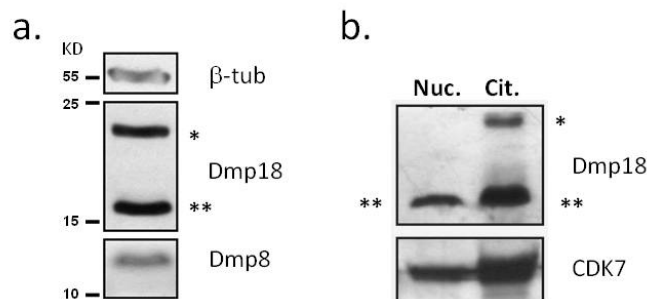


Figura 6. Las proteínas Dmp8 y Dmp18, codificadas en un mismo transcrito, se expresan en la mosca. (a) Mediante ensayos tipo Western utilizando extractos de proteínas solubles totales y los anticuerpos específicos contra Dmp8 y Dmp18, se observó que ambas proteínas se expresan en la mosca. Nótese que el anticuerpo contra Dmp18 reconoce dos bandas, una que corresponde al tamaño esperado para la proteína (***) y otra de mayor peso molecular (*). β-Tubulina se utilizó como control de carga. (b) La proteína de menor peso molecular que reconoce el anti-Dmp18 está localizada tanto en la fracción nuclear soluble (Nuc.) como en la citoplásmica (Cit.), mientras que la de mayor peso molecular se localiza preferencialmente en el citoplasma.

Dmp18 interacta físicamente con las subunidades Dmp8 y Dmp52 de TFIIH y co-localiza en la cromatina con DmXPD.

Como ya se mencionó, en organismos eucariontes existen ejemplos de correlaciones funcionales entre las proteínas codificadas en transcritos bicistrónicos (revisado en Blumenthal, 2004). Como una primera aproximación para analizar la posible relación funcional que Dmp8 y Dmp18 pueden tener por encontrarse codificadas en un mismo mRNA, se decidió estudiar si interactuaban físicamente. De manera interesante, en el análisis del mapa de interacciones proteicas de *D. melanogaster* (Giot *et. al.*, 2003) se había señalado que la subunidad Dmp52 de TFIIH interactuaba con el ORF que corresponde a Dmp18, lo cual sugería una posible interacción entre Dmp18 y TFIIH. Sin embargo, ya que Dmp18 está en el mismo transcrito que Dmp8 y debido a que la interacción física entre este último y Dmp52 ha sido demostrada claramente en humano y levadura (Zhou *et. al.*, 2007; Kainov *et. al.*, 2008), era posible que en los ensayos de interacción de Giot y colaboradores (2003), la construcción de Dmp18 que interactuó con Dmp52 pudiera llevar una parte de Dmp8. Entonces, para determinar si Dmp18 podía interactuar con Dmp52 y/o con Dmp8, se realizó un ensayo de doble híbrido en levadura (Cruz Becerra, 2008) utilizando las secuencias completas de las tres proteínas (Dmp8, Dmp18 y Dmp52). Se encontró que Dmp18 puede interactuar tanto con Dmp52 como con Dmp8, solamente cuando Dmp18 está fusionada al dominio de activación de GAL4 (AD). Asimismo, se vio que Dmp18 tiene la capacidad de homodimerizar, como había sido reportado previamente para su homólogo putativo en *Arabidopsis thaliana* (Choi *et. al.*, 2007). Como era de esperarse, también se observó la interacción entre Dmp8 y Dmp52, pero únicamente cuando Dmp8 está fusionada al AD y Dmp52 fusionada al dominio de unión al DNA (BD). Esto sugiere que la configuración en la que las proteínas se fusionaron a los dominios de GAL4 puede influir en su interacción. Los resultados de este ensayo se resumen en el cuadro de la Figura 7.

Para confirmar que Dmp18 interactúa con Dmp8 y/o Dmp52 se hicieron construcciones en vectores de expresión de células S2R+ de *Drosophila* con la finalidad de producir una proteína de Dmp18 fusionada en su extremo amino a tres secuencias del epítipo de FLAG (FLAG-Dmp18) y una proteína Dmp8 fusionada a esta misma etiqueta pero en su extremo C-terminal (Dmp8-FLAG). Las células S2R+ en cultivo se transfectaron transitoriamente y la presencia de las proteínas híbridas se analizó por ensayos tipo Western (Figura S2 en Anexo IV). Posteriormente, se realizaron co-inmunoprecipitaciones (coIP) usando un anticuerpo anti-FLAG. Los complejos de proteínas co-precipitadas se analizaron por Western blot utilizando anticuerpos específicos contra algunas subunidades de TFIID. Como se muestra en la Figura 8a, Dmp8-FLAG co-inmunoprecipitó con la proteína endógena Dmp52; sin embargo, no se identificaron otros componentes de TFIID (Dmp8, XPB y CDK7). Del mismo modo, en las células que expresaron FLAG-Dmp18 se encontró que, con el anti-FLAG, Dmp18 co-inmunoprecipitó con Dmp52 endógena, pero no con otras subunidades de TFIID (Figura 8b). Es importante resaltar que a pesar de que Dmp8-FLAG y FLAG-Dmp18 co-inmunoprecipitaron con la proteína Dmp52 endógena, no lo hicieron entre sí. Además, no fue posible realizar los mismos experimentos de coIP con las proteínas endógenas de Dmp8 y Dmp18 debido a que los anticuerpos no funcionaron en estos ensayos (datos no mostrados).

Lo anterior sugiere que, probablemente, Dmp8 y Dmp18 no pueden interactuar simultáneamente con Dmp52, quizá debido a que compiten por un mismo sitio de unión; o bien, porque la presencia de las etiquetas de FLAG en Dmp8 y en Dmp18 pudieron afectar de alguna manera otras posibles interacciones proteína-proteína. Esta observación es importante ya que XPB no inmunoprecipitó con Dmp8-FLAG, a pesar de que se sabe que ambas proteínas interactúan directamente con Dmp52 en el contexto de TFIID (Coin *et. al.*, 2007; Zhou *et. al.*, 2007; Kainov *et. al.*, 2008). Sin embargo, cabe la posibilidad de que la unión de alguno de los anticuerpos pudiera interferir estéricamente o afectar dichas interacciones físicas. A este respecto, al realizarse otros ensayos de coIP utilizando el anticuerpo que reconoce a la proteína Dmp52 endógena en su región carboxilo (región reportada como sitio de interacción con p8), no se observó inmunoprecipitación de Dmp8

ni de Dmp18 endógenas (datos no mostrados). De la misma manera, empleando el anticuerpo anti-V5 para inmunoprecipitar a la proteína Dmp52 fusionada a una etiqueta de V5 en su extremo carboxilo (Dmp52-V5 expresada en células S2R+ en cultivo), tampoco co-inmunoprecipitaron Dmp8 ni Dmp18 endógenas, ni ningún otro componente de TFIIH (datos no mostrados). Entonces, es posible que tanto la fusión de una etiqueta en el extremo carboxilo de Dmp52 como el uso del anticuerpo que reconoce esta misma región impidieran la interacción de Dmp52 con Dmp8 y, probablemente, con Dmp18.

AD BD	Dmp8	Dmp18	Dmp52
Dmp8	-	+	-
Dmp18	-	+	-
Dmp52	++	+	ND

Figura 7. Dmp18 interacciona con Dmp8 y Dmp52 en un ensayo de doble híbrido de levadura. Las proteínas de interés se fusionaron al dominio de unión al DNA (BD) o al dominio de activación (AD) de GAL4. En el cuadro se indican las combinaciones que mostraron (+) o no (-) interacción física directa entre sí; ND indica combinaciones no probadas. Dicha interacción se probó en condiciones rigurosas y mediante la actividad de β -gal. Nótese que Dmp18 interacciona con Dmp52 y Dmp8 cuando está fusionado al AD pero no al BD. Como control positivo se probó la interacción entre Dmp52 y Dmp8, los cuales interaccionaron sólo cuando Dmp8 está fusionado al AD. Dmp18 no fue capaz de interaccionar con la proteína de humano p53 ni con el antígeno SV40 en ninguna configuración (datos no mostrados).

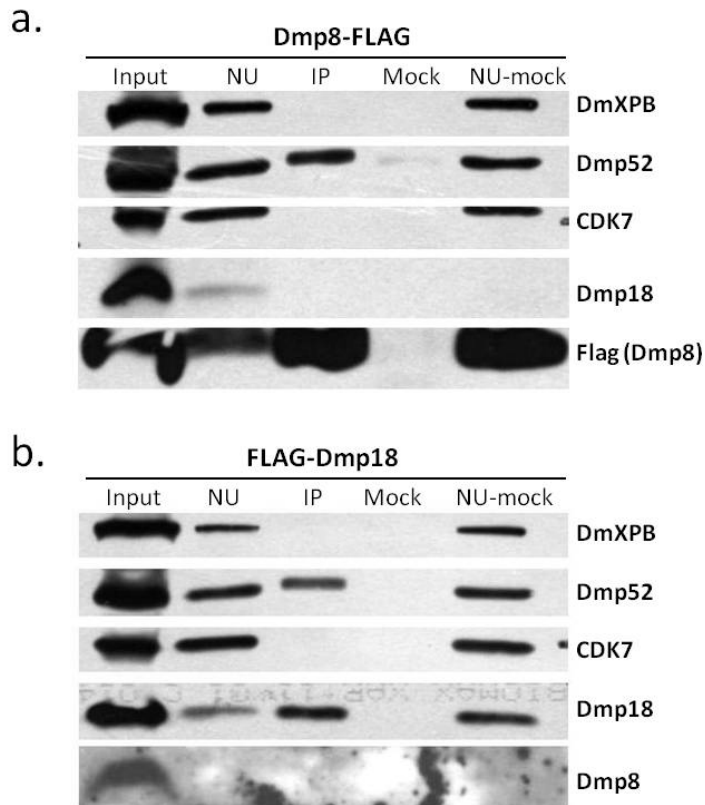


Figura 8. Dmp8-FLAG y FLAG-Dmp18 co-inmunoprecipitan con Dmp52 en células S2R+ en cultivo. La coIP (IP) con el anti-FLAG o con un anticuerpo irrelevante (Mock) se llevó a cabo a partir de extractos de proteínas solubles totales de células transfectadas con Dmp8-FLAG (**a**) o FLAG-Dmp18 (**b**), y el resultado se analizó mediante ensayos tipo Western usando anticuerpos específicos señalados a la derecha de cada panel. NU y NU-mock indican las proteínas que no co-inmunoprecipitaron. Sólo la proteína endógena de Dmp52 co-inmunoprecipitó con las proteínas de fusión a FLAG expresadas independientemente; sin embargo, Dmp8 y Dmp18 no inmunoprecipitaron juntas.

Ya que los resultados del ensayo de doble híbrido y las colP sugieren que Dmp18 interacciona físicamente con TFIIH, se analizó si Dmp18 podía co-localizar con algún componente de TFIIH en la cromatina. Se llevaron a cabo inmunotinciones de cromosomas politénicos de larvas de tercer instar (Dra. Viviana Valadez-Graham) y se observó que Dmp18 co-localiza con DmXPD (Figura 9) y DmXPB (datos no mostrados), lo cual puede sugerir una posible interacción física entre Dmp18 y TFIIH, pues por estudios previos realizados en nuestro grupo de trabajo se sabe que estas dos helicasas co-localizan con otras subunidades de TFIIH en los cromosomas politénicos. No se pudo determinar si Dmp18 co-localiza con Dmp8 debido a que los anticuerpos contra Dmp8 no mostraron señal específica en este tipo de ensayos.

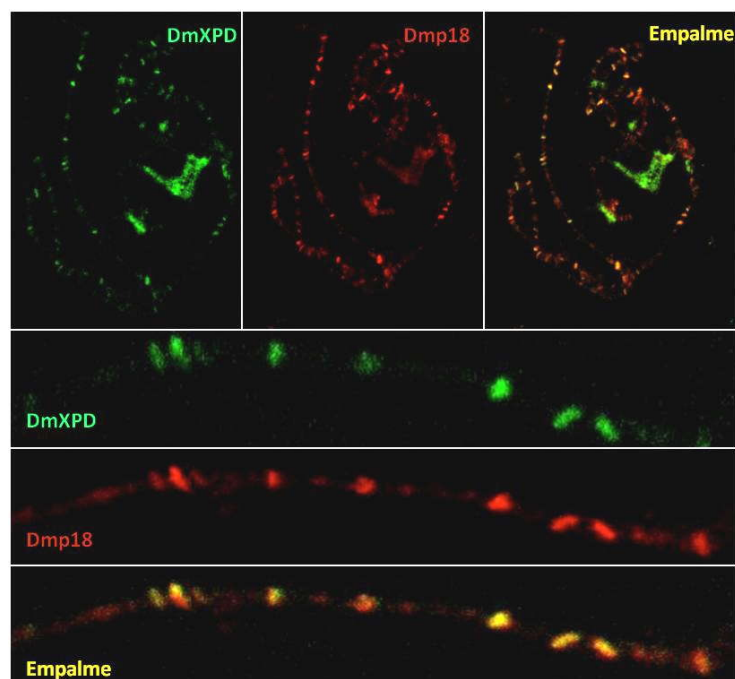


Figura 9. Dmp18 y la subunidad DmXPD de TFIIH co-localizan en la cromatina. Inmunotinción de cromosomas politénicos de larvas silvestres con anticuerpos contra DmXPD (verde) y Dmp18 (rojo). Obsérvese que ambas proteínas co-localizan (amarillo) en la mayoría de sitios cromosomales. Los paneles inferiores muestran un mayor acercamiento a una región cromosomal.

Por otro lado, para analizar las regiones específicas de interacción entre Dmp8, Dmp18 y Dmp52, se realizaron ensayos de pull-down *in vitro* (M.C. Cruz Becerra G.) usando a las proteínas Dmp8, Dmp18 y Dmp52 fusionadas a GST, así como proteínas de fusión para Dmp18 y Dmp52 que carecían de dominios específicos (Figura 10a). Se analizó la interacción directa entre estas proteínas recombinantes y las proteínas de Dmp8, Dmp18 y Dmp52 producidas a partir de sus cDNAs completos, los cuales fueron transcritos y traducidos *in vitro*. Se encontró que Dmp52 interacciona directamente con la región C-terminal de Dmp18 (Dmp18₄₉₋₁₅₂) que incluye el motivo de dedo-de-zinc tipo HIT (Figura 10b). La función de este dominio HIT aún no se ha determinado, pero se ha encontrado en proteínas nucleares involucradas en la regulación génica y la remodelación de la cromatina (He *et al.*, 2007). También se observó que Dmp8 interacciona con esta misma región del carboxilo de Dmp18 (Figura 10b). Posteriormente, se analizaron las regiones de Dmp52 que interaccionaban con Dmp18, encontrándose que este último puede unirse específicamente con el extremo carboxilo (CTD) de Dmp52 (aminoácidos 408-499) y con otra parte de la proteína fuera de este dominio (Figura 10c), sugiriendo que Dmp52 tiene al menos dos regiones de unión para Dmp18.

Los ensayos de pull-down mostraron que el CTD de Dmp52 puede interaccionar con Dmp18 y corroboraron que Dmp8 interacciona con el mismo dominio de Dmp52, como ya había sido reportado (Zhou *et al.*, 2007; Kainov *et al.*, 2008). Estos resultados llevaron a la nueva hipótesis de que estas tres proteínas podrían formar un complejo; o bien, que Dmp8 y Dmp18 no eran capaces de interaccionar simultáneamente con Dmp52. Para abordar esta pregunta, se llevó a cabo un ensayo de competencia empleando la misma técnica de pull-down (M.C. Cruz Becerra G.). Se incubó simultáneamente una de las proteínas de fusión a GST (GST-Dmp52 o GST-Dmp18), mientras se mantuvo constante la cantidad de un producto de transcripción-traducción *in vitro* (Dmp18 o Dmp52) y se varió la concentración de la otra construcción transcrita-traducida *in vitro* (Dmp8) (Figura 11).

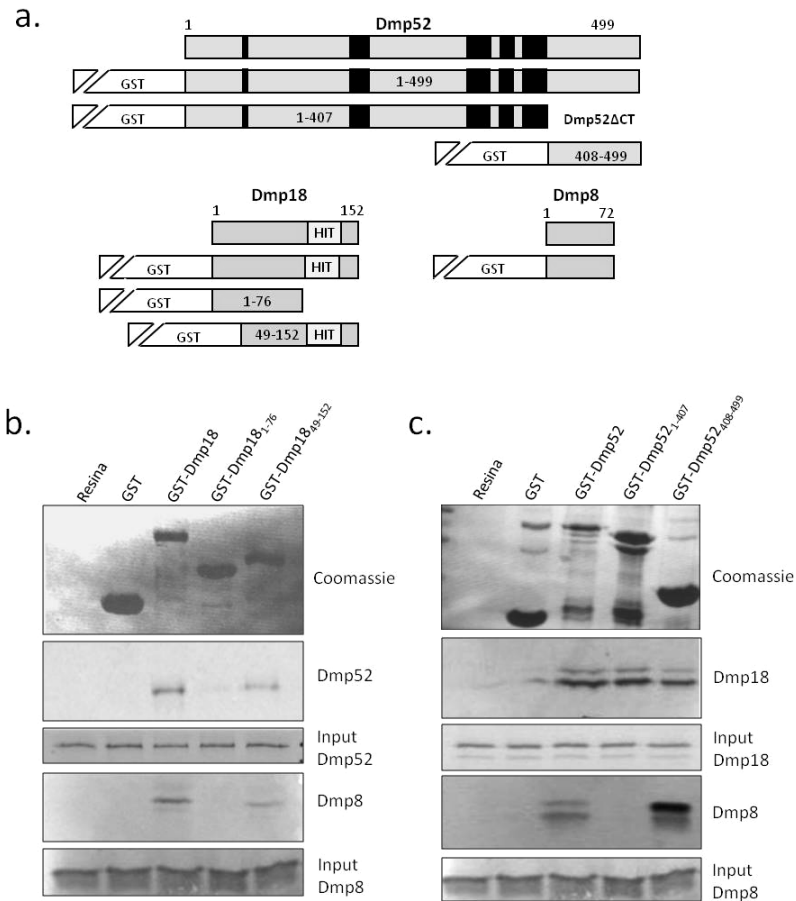


Figura 10. Mapeo de las interacciones físicas entre Dmp8, Dmp18 y Dmp52. (a) Diagrama de las diferentes construcciones usadas en el ensayo tipo pull-down *in vitro*. Los cDNAs completos de las proteínas se usaron para la transcripción-traducción *in vitro* y los productos obtenidos se utilizaron en los ensayos de pull-down con proteínas recombinantes fusionadas a GST. Las cajas negras en Dmp52 representan los dominios más conservados en diferentes especies. Se indica el motivo de dedo-de-zinc tipo HIT de Dmp18. **(b)** Dmp52 y Dmp8 interaccionan *in vitro* con el extremo carboxilo de Dmp18 (GST-Dmp18₄₉₋₁₅₂), el cual contiene el dominio HIT. **(c)** El C-terminal de Dmp52 (GST-Dmp52₄₀₈₋₄₉₉) interacciona *in vitro* con Dmp8 (como se esperaba) y Dmp18. Nótese que este último puede interaccionar con otra región de Dmp52 fuera del C-terminal (Dmp52₁₋₄₀₇). En (b) y (c), el primer panel indica la tinción con Coomassie de las diferentes proteínas recombinantes con GST; el resto de los paneles muestran los radiogramas de la retención de los productos transcritos-traducidos *in vitro*. El material de inicio (input) de cada experimento se señala para cada experimento.

Se encontró que la interacción que existe cuando se incubaba a Dmp52 con el fragmento de Dmp18 que contiene el dominio HIT (GST-Dmp18₄₉₋₁₅₂) disminuye considerablemente cuando la cantidad presente de Dmp8 va aumentando; sin embargo, una pequeña porción de Dmp52 permanece unida a Dmp18, probablemente a través de la interacción del dominio HIT con la región fuera del CTD de Dmp52 (Figura 11a). Es interesante que en estas condiciones no se observara interacción entre Dmp18 y Dmp8, lo que sugiere que Dmp8 tiene más afinidad a Dmp52 (Figura 11a). Por otro lado, cuando se llevó a cabo el pull-down incubando el CTD de Dmp52 (GST-Dmp52₄₀₈₋₄₉₉) con una cantidad constante de Dmp18 y concentraciones crecientes de Dmp8, se encontró que la interacción Dmp52–Dmp18 se perdió (Figura 11b). Conjuntamente, estos experimentos indicaron que, aunque Dmp8 y Dmp18 pueden unirse con el CTD de Dmp52, estas interacciones no se dan simultáneamente al menos *in vitro*, y es la interacción entre el CTD de Dmp52 y Dmp8 la que se favorece sobre aquella entre Dmp18 y el CTD de Dmp52. Esto también podría explicar por qué en los ensayos de coIP en las células en cultivo no se observó la interacción entre Dmp8 y Dmp18, aunque ambas pudieron co-inmunoprecipitar con Dmp52. No obstante, ya que Dmp18 parece interactuar con otra región de Dmp52 además del CTD, no se puede descartar la posibilidad de que estas dos proteínas puedan interactuar aún en presencia de Dmp8.

En resumen, los resultados arrojados por los experimentos de doble híbrido, coIP e interacción *in vitro*, sugieren fuertemente que la proteína Dmp18 interactúa físicamente con Dmp52, lo cual puede permitir su interacción con el complejo de transcripción/replicación TFIIF.

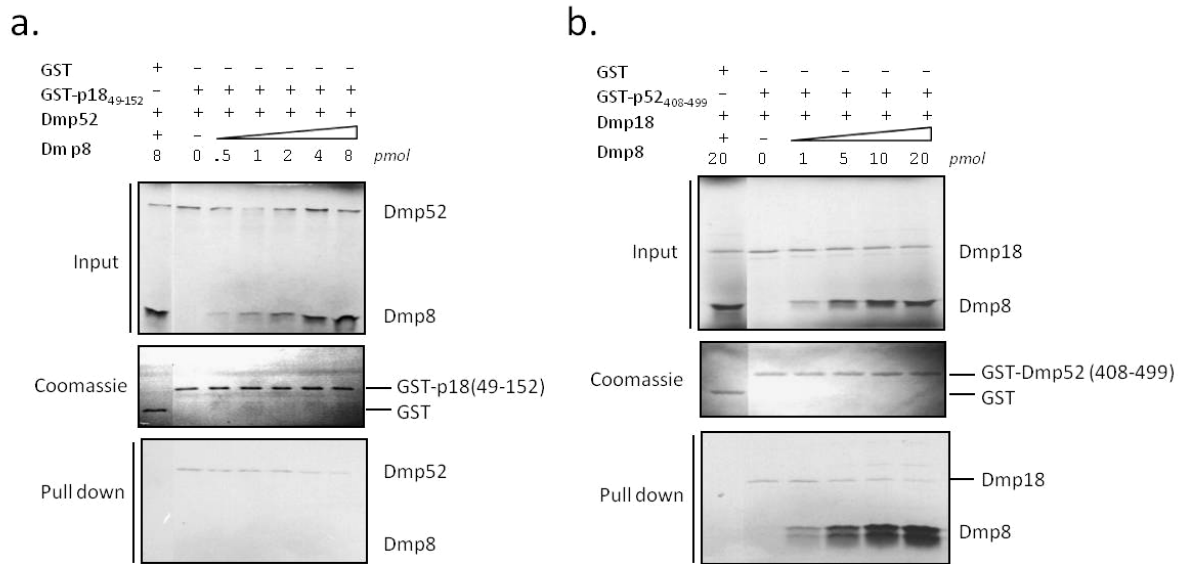


Figura 11. La interacción física entre Dmp52 y Dmp8 se favorece sobre aquella entre Dmp52 y Dmp18. Experimentos de competencia mediante ensayos de pull-down *in vitro*. Una de las proteínas de fusión a GST (Dmp52 o Dmp18) unida a una columna de agarosa con glutatión se puso a interaccionar con el producto de la traducción-transcripción *in vitro* de otra de las proteínas y se adicionaron concentraciones crecientes de Dmp8 para evaluar la interacción. **(a)** La unión entre Dmp52 y el dominio HIT de Dmp18 (GST-Dmp18₄₉₋₁₅₂) se reduce cuando se adicionan cantidades crecientes de Dmp8. Nótese que ante la presencia de Dmp52, Dmp8 no se retiene por GST-Dmp18, lo cual muestra que Dmp8 interacciona preferentemente con Dmp52. Sin embargo, a altas concentraciones de Dmp8 todavía una porción de Dmp18 sigue unida a Dmp52. **(b)** Dmp8 desplaza la interacción entre el C-terminal de Dmp52 (GST-Dmp52₄₀₈₋₄₉₉) y Dmp18.

***Dmp18* y *Dmp8* interactúan genéticamente y funcionalmente.**

Las diversas evidencias de la interacción física entre *Dmp18* y TFIIH apuntaban hacia la existencia de una relación funcional entre estos factores. Para probar esta hipótesis, se realizó un amplio análisis genético empleando diversas herramientas. Una de ellas fue el análisis de una línea de moscas, denominada *l(2)SH1279*, la cual lleva un elemento P{lacW} insertado en el segundo exón de *Dmp8* (Figura 2a). La localización y orientación del elemento P se confirmaron a través de PCRs sobre DNA genómico obtenido de moscas adultas (Figura S3 en Anexo IV), empleando oligonucleótidos que hibridan con una región dentro del elemento P y con otra de *Dmp8* (ver la sección de Materiales y Métodos para más detalles).

Inicialmente, se reportó que los organismos de la línea *l(2)SH1279* eran homocigos letales (Oh *et. al.*, 2003); sin embargo, se determinó que aproximadamente el 25% de las moscas homocigas puede desarrollarse hasta adulto y las hembras muestran semi-fertilidad (depositan pocos huevos fecundados), mientras que los machos son estériles (Figura 12a y Cuadro 2). Asimismo, el 100% de los sobrevivientes homocigos presentan un fenotipo de extensión de alas (a 45° respecto a la línea media del cuerpo), las cuales son ligeramente más pequeñas (Figura 12a). El fenotipo de extensión de alas ha sido descrito para diferentes mutantes de *D. melanogaster*, relacionadas con reguladores transcripcionales de genes que codifican proteínas involucradas en la formación del músculo, y puede servir para estudiar interacciones entre genes relacionados funcionalmente (Gutiérrez *et. al.*, 2003).

Ya que la inserción presente en la línea *l(2)SH1279* rompe con el ORF de *Dmp8*, se analizó por RT-PCR la expresión del transcrito bicistrónico en las moscas *l(2)SH1279* homocigas adultas, encontrándose que éste no se produce (Figura 12b). Como era de esperarse, utilizando oligonucleótidos específicos para amplificar únicamente la secuencia que corresponde al ORF de *Dmp8*, no se encontró producto alguno. No obstante, al emplear oligos específicos para amplificar el ORF de *Dmp18*, inesperadamente se encontró la presencia de este transcrito (Figura 12b), el cual puede iniciar su transcripción

dentro del elemento P como consecuencia de algún rearrreglo en la secuencia de DNA debido a la inserción del mismo. Adicionalmente, mediante ensayos tipo Western, se encontró que la proteína Dmp18 está presente en los organismos homocigos (Figura 12c).

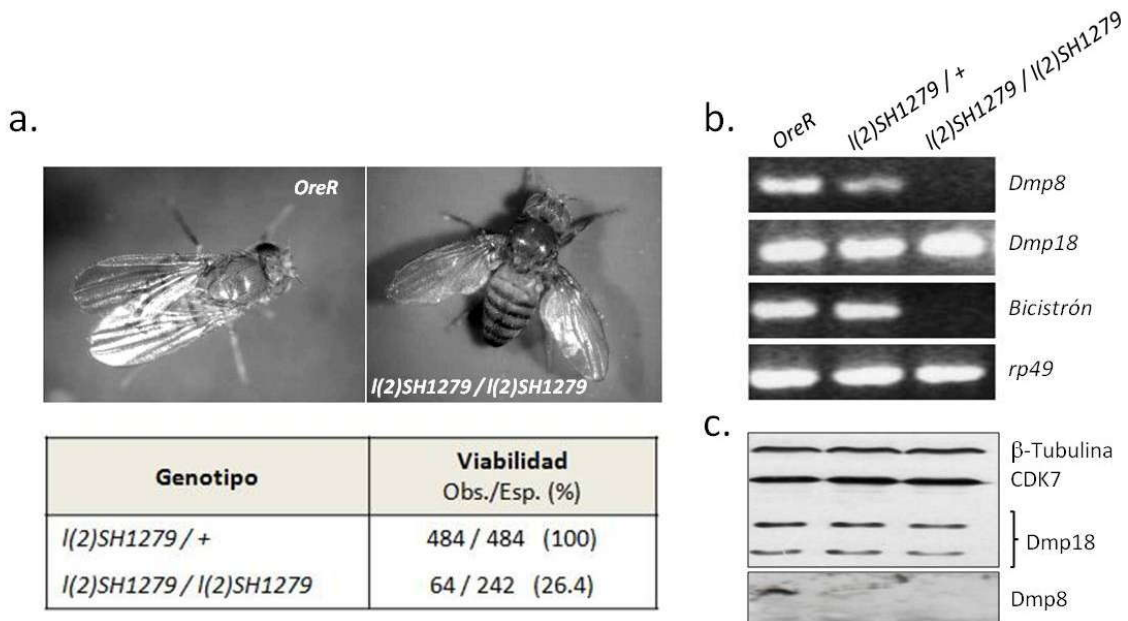


Figura 12. La falta de Dmp8 y la regulación anormal de la expresión de Dmp18 son semi-letales para la mosca y provoca un fenotipo de extensión de alas. (a) El alelo *I(2)SH1279* es una inserción de un elemento P{lacW} en el segundo exón del locus bicistrónico de *Dmp8-Dmp18* (Figura 2a), y es semi-letal ya que alrededor del 25% de los organismos homocigos sobreviven (indicado en el cuadro). Todos estos sobrevivientes presentan un fenotipo de extensión de alas. **(b)** Experimento de RT-PCR a partir de RNA total de adulto que muestra que en los homocigos *I(2)SH1279* no se observa la expresión del mRNA que codifica a *Dmp8* ni al bicistrón, mientras que se produce un transcrito para *Dmp18*. Para la amplificación de estas secuencias se utilizaron pares de oligos que pueden amplificar independientemente la región codificante de *Dmp8* o *Dmp18*, o bien, la del bicistrón completo (Materiales y Métodos). Como control se usó RNA total aislado de moscas de línea silvestre (*OreR*) y de los heterocigos *I(2)SH1279/+*, y para la PCR a *rp49*. **(c)** Ensayo tipo Western que confirma la ausencia de Dmp8 en los sobrevivientes homocigos *I(2)SH1279*, y muestra que la proteína Dmp18 está presente. CDK7 y β -Tubulina se usaron como controles de carga.

CUADRO 2

Supervivencia de las moscas con la inserción *P{lacW}/I(2)SH1279*

Genotipo	Viabilidad (%)	Fertilidad		Moscas con extensión de alas (%)
		Hembras	Machos	
<i>I(2)SH1279/+</i>	100	F	F	0
<i>I(2)SH1279/Df(2L)BSC110</i>	100	F	F	0
<i>I(2)SH1279/Df(2L)Exel7022</i>	50	sF	S	100 ^b
<i>I(2)SH1279/Df(2L)BSC172</i>	45	sF	S	100 ^b
<i>I(2)SH1279/I(2)SH1279</i>	26	sF	S	100 ^a

F: fértil, S: estéril, sF: semi-fértil

^a extensión de alas en un ángulo de 45° respecto al cuerpo

^b extensión de alas en un ángulo de ≤45° respecto al cuerpo

CUADRO 3

Supresión de la letalidad de *I(2)SH1279/I(2)SH1279* por la expresión de *Dmp8* y *Dmp18*

Genotipo	Supervivencia y fenotipos de <i>I(2)SH1279/I(2)SH1279</i>			
	Viabilidad (%)	Fertilidad		Moscas con extensión de alas (%)
		Hembras	Machos	
<i>Dmp8-H6(12)/MKRS</i>	99	F	F	0
<i>Dmp8-H6(12)/Dmp8-H6(12)</i>	89	F	F	0
<i>Dmp8-H6(9)/MKRS</i>	73	F	F	0
<i>Dmp8-H6(9)/Dmp8-H6(9)</i>	74	F	F	0
<i>myc-Dmp18(6)/MKRS</i>	50	sF	S	100 ^a
<i>myc-Dmp18(6)/myc-Dmp18(6)</i>	50	sF	S	100 ^a

F: fértil, S: estéril, sF: semi-fértil

^a extensión de alas en un ángulo de 45° respecto al cuerpo

El número anotado entre paréntesis indica el código de identificación de esa línea transgénica.

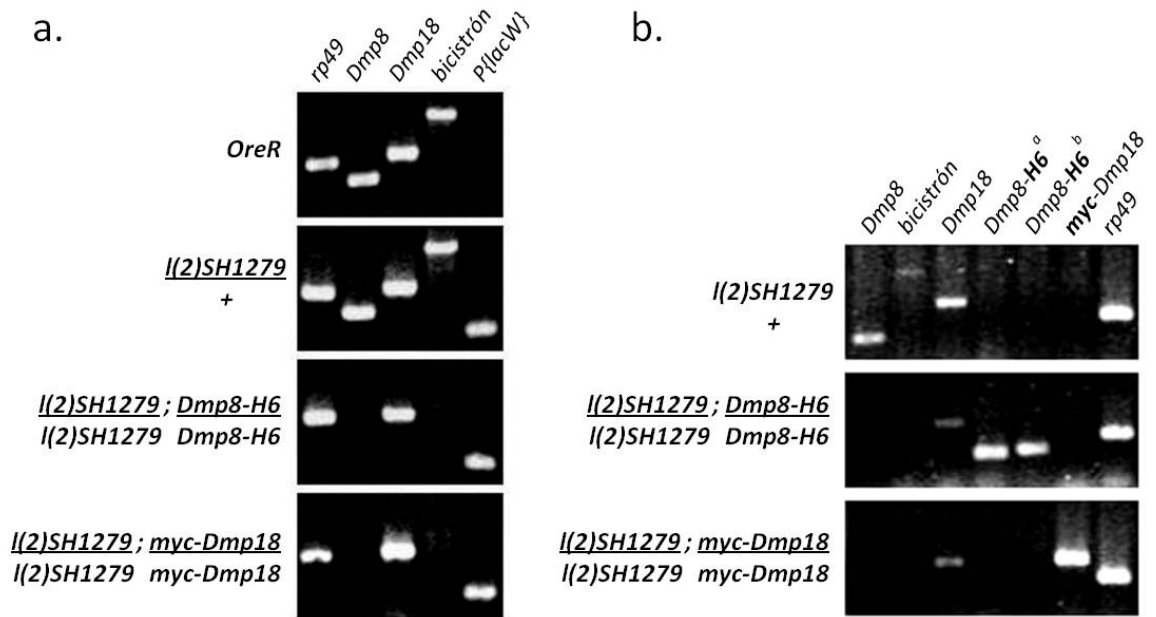


Figura 13. Análisis molecular que corrobora el genotipo de las homocigas *I(2)SH1279* que llevan dos copias de *Dmp8-H6* o *myc-Dmp18*. (a) PCRs sobre DNA genómico que confirma la presencia del elemento P dentro del ORF de *Dmp8* en las moscas *I(2)SH1279* homocigas, mientras que *Dmp18* se mantiene íntegro. Para analizar la presencia de la inserción P{lacW} se usó un oligo que hibrida con un extremo de este elemento P y otro con el extremo 5' de *Dmp8*. Como controles se usaron DNAs de una línea silvestre (*OreR*) y de las heterocigas *I(2)SH1279*/+. (b) Ensayo de RT-PCR que revela la expresión de los transcritos de *Dmp8-H6* o *myc-Dmp18* en las moscas con fondo genético homocigo para la inserción *I(2)SH1279*, donde además no hay transcrito de *Dmp8*, pero sí se produce el mRNA de *Dmp18*. Para amplificar los transcritos de los transgenes se utilizó un oligo que hibrida específicamente con una región generada por la clonación en el vector pCaSpeR; en el caso de *Dmp8-H6* también se usó un oligo complementario a la secuencia de la etiqueta de histidinas (^b). En ambos experimentos (paneles a y b) se usó como control a *rp49*.

Con la finalidad de confirmar que los fenotipos observados en las moscas homocigas *I(2)SH1279* se deben a la inserción en el locus bicistrónico de *Dmp8-Dmp18*, se analizaron dos deficiencias (líneas con pérdida de un fragmento de cromosoma) que carecen de un segmento del cromosoma 2, el cual incluye la región del bicistrón. La deficiencia *Df(2L)Exel7022* (Stock No. 7794 en Anexo I) pierde 17 genes incluyendo *Dmp8-Dmp18*, mientras que la deficiencia *Df(2L)BSC172* (No. 9605) pierde seis genes (Flybase). Ambas líneas mostraron ser inviables como homocigas y al combinarse entre sí (Cuadro 2), pero cuando cada una de ellas se cruza con la línea *I(2)SH1279* se obtuvieron organismos adultos viables con los mismos fenotipos de extensión de alas y alteración de la fertilidad (machos estériles y hembras semi-fértiles) que en las moscas homocigas *I(2)SH1279/I(2)SH1279*. Estas observaciones parecían indicar que los fenotipos generados se debían a la inserción *I(2)SH1279*. Se observó que la sobrevivencia de estas moscas trans-heterocigas es aproximadamente del 50% (Cuadro 2); es decir, superior a la observada en los sobrevivientes *I(2)SH1279* homocigos en los cuales hay expresión de *Dmp18*. Cabe mencionar que la expresión del mRNA de *Dmp8* y el bicistrón tampoco se detectó en las moscas trans-heterocigas *I(2)SH1279/Df(2L)Exel7022*, pero sí se observó el transcrito de *Dmp18* (Figura S3 del Anexo IV). Estos resultados sugerían que la relación entre los niveles de *Dmp8* y *Dmp18* es importante para mantener la homeostasis del organismo durante el desarrollo de la mosca.

Adicionalmente, se hicieron cruces entre la línea *I(2)SH1279* y una tercera deficiencia, *Df(2L)BSC110* (Stock No. 8835), la cual contiene el locus *Dmp8-Dmp18* pero carece de los genes que las otras dos deficiencias perdieron. Los organismos trans-heterocigos *I(2)SH1279/Df(2L)BSC110* fueron 100% viables y fértiles (Cuadro 2), corroborando que ninguno de los otros genes perdidos en las deficiencias que carecen de *Dmp8-Dmp18* intervienen en la viabilidad, en la alteración de la fertilidad, ni en la extensión de alas de las moscas *I(2)SH1279/Df(2L)Exel7022* y *I(2)SH1279/Df(2L)BSC172*.

Debido a que tanto en las moscas homocigas *I(2)SH1279/I(2)SH1279* como en aquellas con la combinación de la deficiencia y la inserción se genera el mRNA de *Dmp18* pero no el de *Dmp8*, se pensó que era principalmente la ausencia de *Dmp8* lo que

generaba un fenotipo semi-lethal y los fenotipos que afectaban la fertilidad de las moscas. Para verificar esta hipótesis, se utilizaron las moscas transgénicas que expresan constitutivamente a Dmp8 con una etiqueta de 6-histidinas en su extremo carboxilo (*Dmp8-H6*) o Dmp18 con una etiqueta de c-myc en el extremo amino (*myc-Dmp18*) (Herrera Cruz, 2007), con la finalidad de cruzarlas con las mutantes *I(2)SH1279* para generar organismos homocigos *I(2)SH1279* que llevaran una o dos copias del transgen. La expresión de las proteínas recombinantes en las líneas transgénicas seleccionadas se verificó mediante ensayos de RT-PCR y/o tipo Western (Figura S4 del Anexo IV) antes de realizar las cruces con la línea de la inserción.

En el Cuadro 3 se muestran los resultados de las cruces entre las mutantes *I(2)SH1279* y las transgénicas *Dmp18* y *Dmp8*. Nótese que una sola copia de Dmp8-H6 fue suficiente para permitir casi el 75% de la viabilidad y rescatar todos los fenotipos (esterilidad y alas extendidas) de las moscas homocigas *I(2)SH1279*. Sin embargo, la expresión de myc-Dmp18 no fue capaz de aumentar la viabilidad de las moscas homocigas, ni rescata esos fenotipos. Conjuntamente, se verificó que las moscas sobrevivientes fueran homocigas para la inserción *I(2)SH1279* mediante PCRs con DNA genómico (Figura 13a), y se analizó, mediante RT-PCR, la expresión del mRNA de *Dmp8* y *Dmp18* endógenos y de los transgenes *Dmp8-His* y *myc-Dmp18* (Figura 13b). Estos resultados confirmaron que todos los fenotipos observados en la mutante *I(2)SH1279* se generan, ante todo, por la falta de *Dmp8*.

La siguiente pregunta a contestar fue si Dmp18 interaccionaba genéticamente con TFIIH. Además de utilizar a la línea *I(2)SH1279* donde Dmp8 está afectado pero se produce a Dmp18, se empleó la línea *P{GD10407}v25909* (Dietzl *et. al.*, 2007) que expresa un RNA de doble cadena dirigido contra Dmp18 (a partir de ahora denominado *dsDmp18*) (Figura 14a). La inducción de la expresión de este *dsDmp18*, que actúa como RNA de interferencia (RNAi), se lleva a cabo mediante el sistema endógeno de levadura UAS-GAL4 (Piccin *et. al.*, 2001), que funciona muy eficientemente en la mosca y además puede ser controlado a través de la temperatura. Debido a la organización de Dmp8 y Dmp18 en un transcrito bicistrónico, se pensó que el *dsDmp18* podría ocasionar la degradación de todo el

transcrito bicistrónico. Para analizar esta posibilidad y comprobar la eficiencia del RNAi, se expresó el *dsDmp18* en las glándulas salivales de larvas de tercer instar mediante el driver *Sgs3-GAL4* (Stock No. 6870 en Anexo I) y se realizaron ensayos de RT-PCR semicuantitativa y tipo Western (Figura 14 b y c). En ambos experimentos se vió que la inducción del *dsDmp18* afecta (disminuye) la expresión de *Dmp8* y *Dmp18*. Cabe mencionar que la funcionalidad del driver *Sgs3-GAL4* se corroboró previamente; para ello se indujo la expresión de un UAS-GFP y se observó la fluorescencia de las glándulas salivales (datos no mostrados).

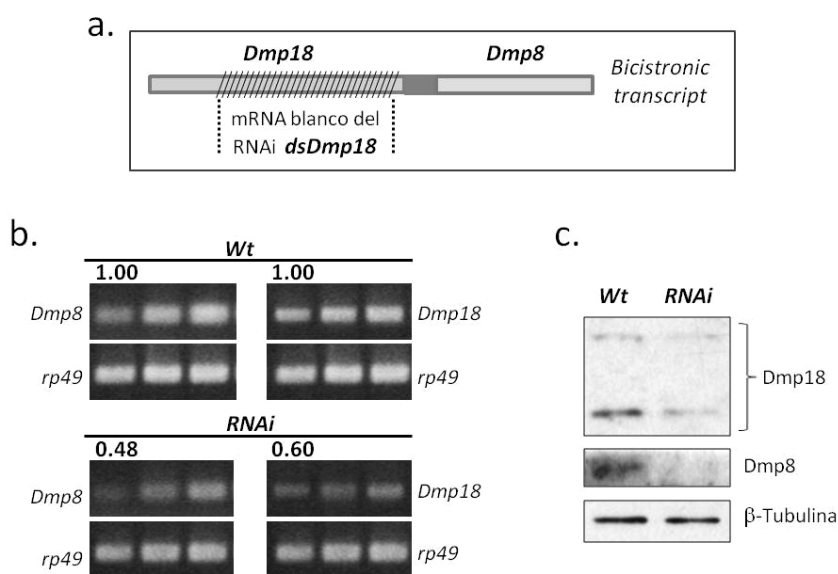


Figura 14. La expresión de un RNAi contra *Dmp18* (*dsDmp18*) provoca una clara disminución en la expresión de *Dmp18* y *Dmp8*. (a) La línea v25909 (Anexo 1) expresa un RNA de doble cadena contra *Dmp18* (región del transcrito de *Dmp18* con líneas en la figura) que reduce la expresión del bicistrón *Dmp8-Dmp18*. (b) Ensayo de RT-PCR a partir de RNA total de glándulas salivales donde se indujo la expresión de *dsDmp18* y *UAS-Dicer-2* con el driver *Sgs3-GAL4* (*RNAi*) que muestra la disminución en la expresión de *Dmp8* y *Dmp18*. Como control (*Wt*) se usaron glándulas de larvas que sólo llevan el driver. *rp49* fue el control interno en las PCRs. La cuantificación de las bandas se hizo por densitometría con el programa ImageJ. Los números indican la intensidad relativa de las señales de *Dmp8* o *Dmp18* respecto a *rp49* (Valor de 1 en la muestra *Wt*). (c) Análisis por Western blot del efecto del RNAi sobre la expresión de las proteínas *Dmp8* y *Dmp18*. Las proteínas solubles totales se aislaron de glándulas salivales de larvas que co-expresan al *dsDmp18* (*RNAi*) y *Dicer* (*Wt*). Se usó β -Tubulina como control de carga. Nótese que la expresión del RNAi genera una notable reducción en los niveles de *Dmp8* y *Dmp18*.

Posteriormente, se indujo la expresión del RNAi mediante los drivers que expresan a GAL4 bajo la regulación de los promotores de Act5C o α Tub84B (Stocks No. 4414 y 5138 en Anexo I), y se encontró que la expresión ubicua del RNAi, inducida por ambos drivers, fue letal para *D. melanogaster* (Cuadro 4). Entonces, ante la observación de los fenotipos presentes en las alas de las homocigas *l(2)SH1279/l(2)SH1279*, se decidió utilizar a las alas de las moscas como tejido blanco para analizar la posible interacción entre *Dmp8* y *Dmp18*, dirigiendo la expresión del RNAi en ese tejido a través del driver *MS1096* (Stock No. 8860 en Anexo I). Este driver expresa a GAL4 en la parte dorsal del disco imagal de ala, que da lugar al ala del adulto (Capdevila y Guerrero, 1994). Cabe mencionar que el transgen GAL4 de la línea *MS1096* está insertado en el cromosoma X, por lo que sólo se pueden tener machos hemicigas (con una copia de GAL4) y hembras heterocigas y homocigas. Como control de estos experimentos y para corroborar la funcionalidad del driver (que indujera la expresión en la región específica de los discos imagales de ala), se utilizaron líneas transgénicas que llevan un UAS-GFP (Stocks No. 1522 y 6452) y se cruzaron con moscas *MS1096*. Los discos imagales de ala se disecaron y se observaron bajo el microscopio de fluorescencia, confirmándose la correcta expresión de GFP inducida por el driver *MS1096* (datos no mostrados).

En la Figura 15a puede apreciarse que los machos hemicigas para el driver que llevan una copia de *dsDmp18* presentaron un fenotipo de alas ligeramente rizadas (como señala la flecha en la figura), mientras que en las hembras (heterocigas para el driver y para el RNAi) no se detectó ninguna alteración en la forma de las alas. Sin embargo, cuando la dosis del RNAi y del driver se incrementó, se vieron mayores defectos en las alas, incluyendo la presencia de ampollas, una disminución en el tamaño y una mayor deformación de la hoja (Figura 15b y Cuadro 4). Adicionalmente, se co-expresaron en el ala el RNAi y Dicer, encontrando que se incrementó dramáticamente el defecto de las alas (Figura 15c y Cuadro 4). Asimismo, en las moscas homocigas para el RNAi y con la dosis máxima del driver se expresó a GAL80, el cual es represor de GAL4. Como era de esperarse, la adición de GAL80 previno la aparición de los fenotipos (Cuadro 4), lo cual corroboró que los defectos del ala se originaron específicamente por la expresión del RNAi

dsDmp18 (inducida por GAL4). Cabe mencionar que la expresión en el ala de otros RNA de doble cadena dirigidos contra las subunidades Dmp52 y Dmp34 de TFIIF, que también funcionan como RNAi, producen fenotipos muy similares de alas más pequeñas y deformadas (Villicaña Torres, sometido). Sin embargo, en ninguno de los casos se generó el fenotipo de extensión de alas. El hecho de que *Dmp8* y *Dmp18* estén codificados en un mismo transcrito (Figura 5) y que el RNAi contra Dmp18 reduzca los niveles de expresión de ambos genes (Figura 14) indica que el fenotipo de extensión de alas de las homocigas *l(2)SH1279* podría deberse a un cambio en la relación de los niveles de Dmp8 y Dmp18.

Una vez que se caracterizó el efecto de la expresión del RNAi *dsDmp18* en las alas de las moscas, se decidió sobre-expresar en ese mismo tejido a *Dmp8-H6* y *myc-Dmp18* (Figura 16 y Cuadro 4). Se utilizaron líneas transgénicas que permiten inducir la transcripción de *Dmp8-H6* o *myc-Dmp18* bajo la regulación del sistema GAL4 (Herrera Cruz, 2007), por lo que al adicionar una copia (o más) de estos transgenes en las moscas que llevan el RNAi y el driver *MS1096*, tanto el transgen como el RNAi se expresaran únicamente en la región dorsal del disco de ala. Previo a este análisis, mediante ensayos de RT-PCR se comprobó la expresión de los transgenes de *Dmp8* y *Dmp18* de las líneas seleccionadas utilizando el driver de glándulas salivales *Sgs3-GAL4* (Figura S4 en Anexo IV). Cuando se expresó a *Dmp8-H6* en el ala, no se observó rescate de los fenotipos causados por la expresión del RNAi (primer panel de la Figura 16a), lo cual sugirió que los defectos del ala se debían en parte a la disminución de *Dmp18*. Consistentemente con esta hipótesis, cuando se expresó a *myc-Dmp18* se vió un rescate muy significativo en el tamaño y forma de las alas de las moscas que expresaban el RNAi (segundo panel de la Figura 16a). Interesantemente, algunas de las moscas en las que se co-expresó a *Dmp8-H6* o a *myc-Dmp18* y el RNAi en el disco de ala, mostraron diferente expresividad del fenotipo de extensión de alas (Figura 16b). Esto puede deberse a un gradiente en la expresión del RNAi y de los transgenes, lo cual desregula la relación entre los niveles de Dmp8 y Dmp18.

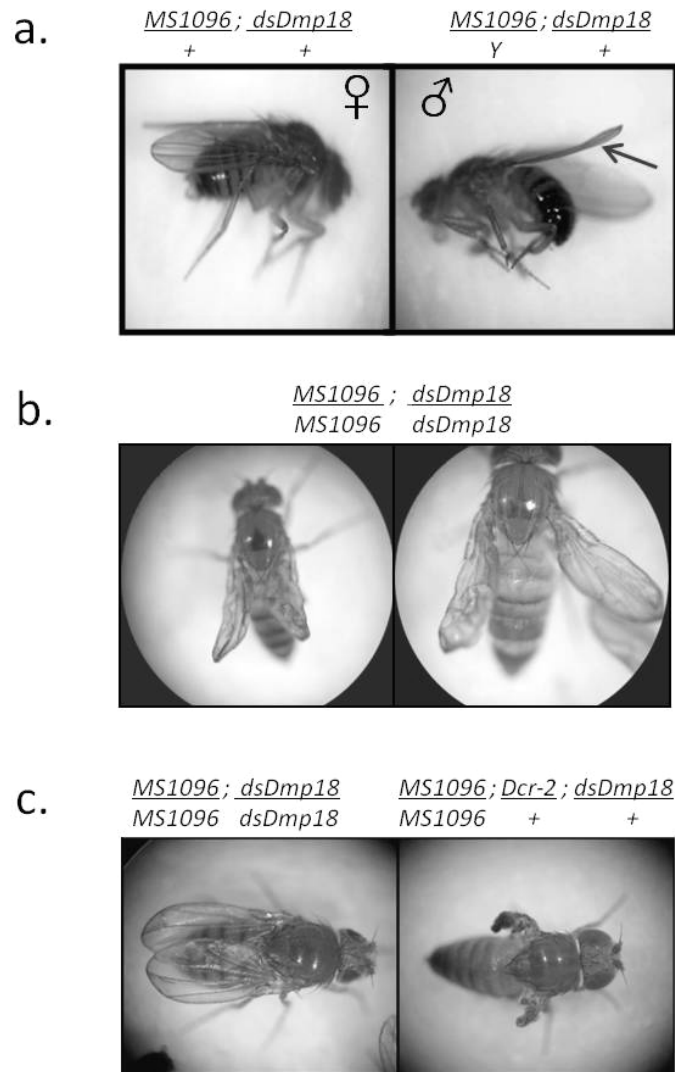


Figura 15. La reducción de los niveles de Dmp8 y Dmp18 en el ala de las moscas ocasiona alas más pequeñas y deformadas. Los fenotipos de ala asociados con la reducción de Dmp8 y Dmp18 ocasionada por la inducción del RNAi *dsDmp18* con el driver *MS1096* se agudizan de manera dosis-dependiente. **(a)** Las hembras con una copia del RNAi y una del driver no muestran alteraciones evidentes en sus alas, mientras que los machos (hemícigos para el driver) presentan una suave deformación en la hoja que produce alas ligeramente rizadas (señalada por la flecha). **(b)** En machos y hembras con la dosis máxima posible del driver y el RNAi se incrementan los defectos de las alas, mostrando disminución en el tamaño y deformación de la hoja. **(c)** La expresión de Dicer (*Dcr-2*) incrementa notablemente el fenotipo del ala generado por la expresión del RNAi. Nótese que las alas prácticamente están ausentes en estos organismos.

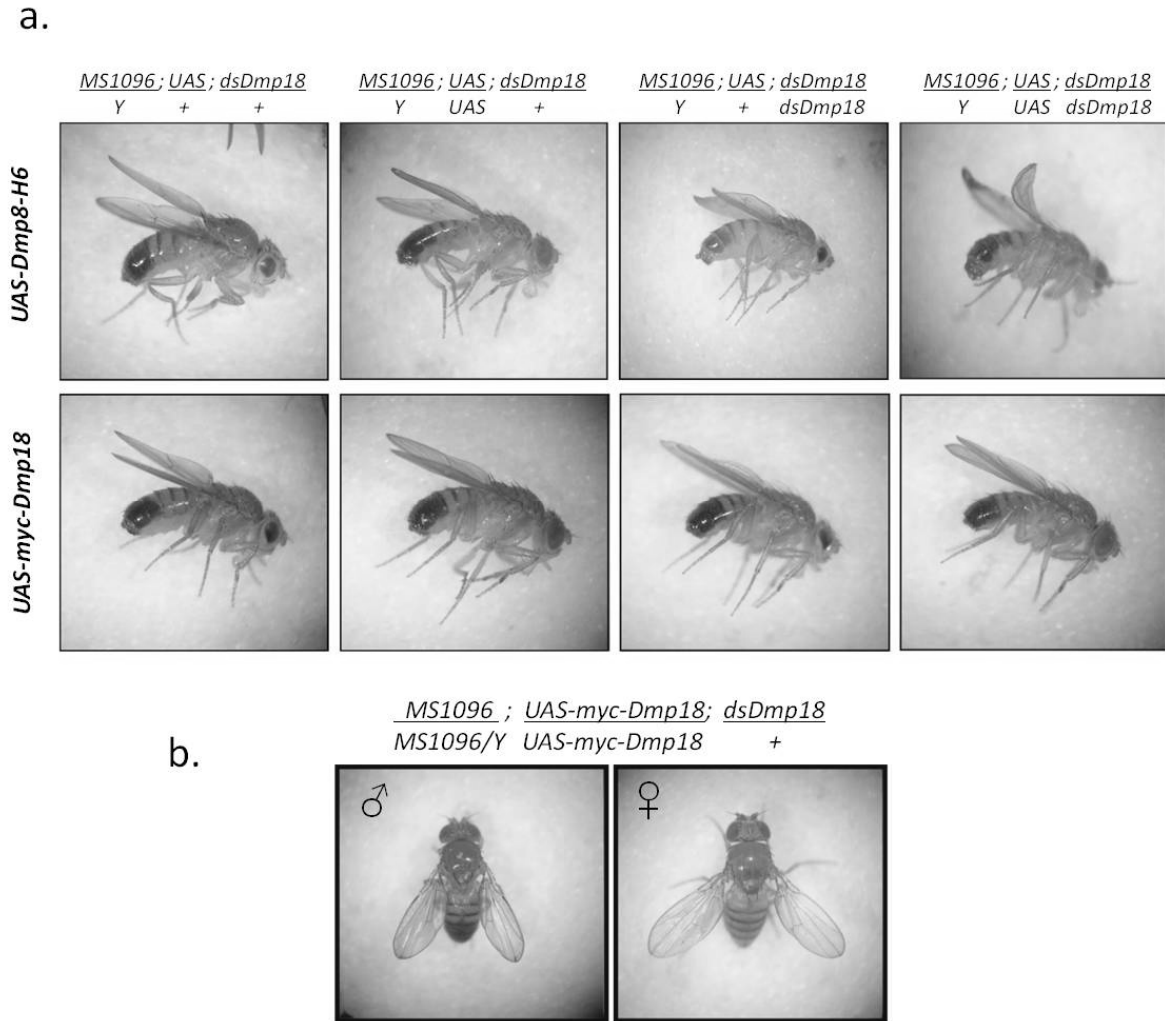


Figura 16. La sobre-expresión de myc-Dmp8 en el disco de ala suprime los fenotipos generados por la expresión de *dsDmp18* y genera un fenotipo de extensión de alas. (a) Moscas que expresan el RNAi *dsDmp18* y a Dmp8-H6 o a myc-Dmp18 (indicado en el genotipo como *UAS*) en el disco de ala por el driver *MS1096*. Obsérvese que la expresión de Dmp8-H6 no rescata los defectos de las alas, mientras que la de myc-Dmp18 prácticamente suprime el fenotipo generado por el RNAi en la dosis máxima de éste y del driver. Los genotipos se indican en la figura. **(b)** Moscas que sobre-expresan a myc-Dmp18 en el mismo dominio del disco de ala donde se induce el RNAi *dsDmp18* presentan expresividad variable de extensión de alas (no mayor a 45° respecto a la línea media del cuerpo de la mosca). Un fenotipo similar se ve en algunas moscas donde se co-expresan Dmp8-H6 y *dsDmp18* en el mismo dominio del ala que regula *MS1096* (datos no mostrados).

Finalmente, con el propósito de investigar si existe interacción genética entre *Dmp18* y *Dmp8* se hicieron cruzas que permitieron obtener moscas que expresaran el RNAi *dsDmp18* en los discos de ala de las moscas con un fondo genético que llevara el alelo *l(2)SH1279* (Cuadro 4). Ya que el RNAi disminuye parcialmente la expresión de *Dmp8* y *Dmp18*, la combinación de éste con la mutante *l(2)SH1279* como homóciga debería abolir la expresión de *Dmp8* y parcialmente reducir la de *Dmp18*. De manera muy interesante se encontró que, en las moscas homócigas *l(2)SH1279* que expresaban a *dsDmp18* en el ala, se genera una muy evidente reducción en el tamaño general del ala y la deformación es mayor (Figura 17). Además, este efecto se presenta en el 100% de las moscas. Inclusive, se observó que las moscas homócigas para ambos, la inserción y el RNAi, no nacen. En suma, estos resultados sugieren fuertemente que la reducción simultánea de *Dmp18* y *Dmp8* en el ala de la mosca produce un efecto sinérgico en el crecimiento y desarrollo. Asimismo, indican la existencia de una interacción genética entre *Dmp18* y *Dmp8*, que se encuentran codificados en un mismo transcrito, y propone una conexión funcional entre ellos.

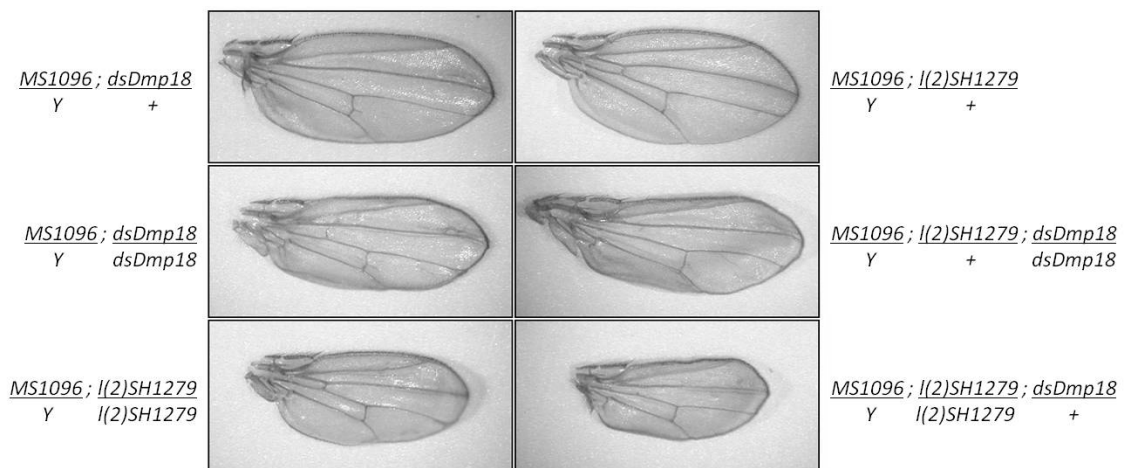


Figura 17. Interacción genética entre *Dmp8* y *Dmp18*. La combinación de la expresión del RNAi *dsDmp18* en el ala, a través del driver *MS1096*, con la presencia de la inserción *l(2)SH1279* aumenta la deformación del ala y la reducción en su tamaño. En la figura se muestran alas representativas de las diferentes combinaciones de dosis del RNAi y el alelo *l(2)SH1279* en machos hemécigos para *MS1096*. Las moscas homócigas para el RNAi y la inserción no se desarrollan hasta adultos.

CUADRO 4

Fenotipos ocasionados por la expresión del RNAi *dsDmp18*.

Genotipo	Fenotipo
<i>dsDmp18/dsDmp18</i>	Ninguno ^b
<i>dsDmp18/tub-GAL4</i>	Letal ^c
<i>Act5C-GAL4/+; dsDmp18/+</i>	Letal ^c
<i>MS1096/+ o Y; dsDmp18/+</i>	Machos con alas ligeramente rizadas
<i>MS1096/MS1096 o Y; dsDmp18/+</i>	Hembras con alas ligeramente rizadas; machos con alas rizadas y ligeramente deformadas
<i>MS1096/MS1096 o Y; dsDmp18/dsDmp18</i>	Hembras y machos con alas rizadas, ligeramente deformadas y más pequeñas
<i>MS1096/+ o Y; UAS-Dcr-2/+; dsDmp18/+</i>	Alas prácticamente ausentes
<i>MS1096/MS1096 o Y; tubP-GAL80; dsDmp18/dsDmp18</i>	Ninguno ^b
<i>UAS-Dmp8/UAS-Dmp8; dsDmp18/dsDmp18</i> ^a	Ninguno ^b
<i>UAS-Dmp18/UAS-Dmp18; dsDmp18/dsDmp18</i> ^a	Ninguno ^b
<i>MS1096/MS1096 o Y; UAS-Dmp8/UAS-Dmp8; dsDmp18/dsDmp18</i> ^a	Alas rizadas, ligeramente deformadas y más pequeñas. Algunos organismos con alas extendidas.
<i>MS1096/MS1096 o Y; UAS-Dmp18/UAS-Dmp18; dsDmp18/dsDmp18</i> ^a	Algunos organismos con alas extendidas.
<i>MS1096/MS1096 o Y; I(2)SH1279/I(2)SH1279</i>	Alas extendidas y más pequeñas
<i>MS1096/MS1096 o Y; I(2)SH1279/I(2)SH1279 ; dsDmp18/+</i>	Alas extendidas, muy pequeñas
<i>MS1096/MS1096 o Y; I(2)SH1279/I(2)SH1279 ; dsDmp18/dsDmp18</i>	Letal ^c

^a Para la expresión de las proteínas híbridas de Dmp8-H6 y myc-Dmp18 se usaron dos líneas independientes en cada caso. ^b Ninguno se refiere a que no se observó diferencia con el fenotipo silvestre. ^c Letal indica la ausencia de organismos adultos viables para el genotipo señalado.

DISCUSIÓN

TFIIH es un complejo multifuncional que interacciona con diferentes grupos de factores como son diversos activadores y represores transcripcionales y otras proteínas involucradas en la reparación del DNA (revisado en Zurita y Merino, 2003). En este trabajo se mostró que la subunidad Dmp8 del complejo de transcripción/repación TFIIH está codificada en un transcrito bicistrónico que también codifica a la proteína Dmp18, que parece ser el homólogo de Swc6/p18^{Hamlet}/ZNHIT1, un componente del complejo remodelador de la cromatina SWR1 de levadura o SRCAP de humano.

Nuestros resultados mostraron que la organización genómica de *Dmp8* y *Dmp18* presente en *D. melanogaster* está conservada en otros artrópodos, lo que implica que la expresión posiblemente coordinada de estos dos genes se ha conservado durante la evolución por más de 350 millones de años. Curiosamente, en algunas especies la secuencia entre los dos ORFs es muy pequeña, y si ambos se traducen a partir del mismo mRNA, esto sugiere la existencia de un mecanismo de traducción único y novedoso, aún no descrito. Ante esta observación, en algún momento se consideró la posibilidad de que Dmp8 y Dmp18 pudieran estarse produciendo a partir de un mismo polipéptido grande mediante un corte proteolítico posterior. Dicha hipótesis parecía apoyarse por el hecho de que el anticuerpo anti-Dmp18 reconocía un polipéptido con un peso molecular mayor al esperado para Dmp18 (que podría ser un precursor putativo o la proteína con modificaciones post-traduccionales). Sin embargo, varias evidencias indicaron que Dmp8 y Dmp18 no se producen a partir de un mismo polipéptido. La primera, fue la detección de una sola proteína usando dos anticuerpos distintos contra Dmp8. La segunda fue que tanto *Dmp8* como *Dmp18* poseen sus propios codones de inicio y de término, y que en la secuencia intergénica entre los dos ORFs hay varios codones de paro en los tres posibles marcos de lectura. Finalmente, la tercera evidencia fue que al analizar la expresión de las proteínas Dmp8 y Dmp18 en las moscas homocigas *l(2)SH1279/l(2)SH1279* (donde la inserción del elemento P impide la expresión del transcrito de *Dmp8* pero permite la de

Dmp18), los ensayos tipo Western no detectaron a *Dmp8* mientras que las dos bandas que corresponden a *Dmp18* estaban presentes (Figura 12c). Asimismo, los fenotipos observados en estas moscas homocigas fueron rescatados únicamente con la expresión de *Dmp8* (Cuadro 3).

Con el hallazgo de que *Dmp8* y *Dmp18* son codificadas en un mismo mRNA, y dado que existen ejemplos de transcritos bicistrónicos en eucariontes cuyas proteínas codificadas se relacionan funcionalmente, se propuso la existencia de una posible interacción entre *Dmp18* y *Dmp8* y/o TFIIH. Como ya se mencionó, los complejos SWR1 y SRCAP están involucrados en el intercambio de la histona canónica H2A por su variante H2A.Z, la cual se encuentra localizada en los nucleosomas de la región de inicio de la transcripción donde también se sitúa TFIIH como parte del complejo de pre-inicio (Li *et. al.*, 2005; Venters y Pugh, 2009). Por otro lado, existen reportes que señalan la participación de componentes de SWR1 y SRCAP en la respuesta celular para reparar daños en el DNA (Lans *et. al.*, 2012). Entonces, tanto TFIIH como SWR1/SRCAP son complejos multiproteicos que participan en la transcripción y en la reparación del DNA.

Mediante múltiples enfoques, se mostró que *Dmp18* puede interaccionar físicamente con TFIIH, principalmente a través de la interacción directa con *Dmp52*. Esta interacción de *Dmp18* con *Dmp52* es interesante ya que no existen reportes que indiquen la existencia funcional de p52 fuera de TFIIH o asociado a otras proteínas que no sean las de este mismo complejo. Como ya se mencionó, en humanos y en levadura se ha reportado claramente que el CTD de p52 interacciona con p8, y se ha indicado que esta interacción es relevante para la estabilidad del complejo TFIIH (Zhou *et. al.*, 2007), y ya que p52 es importante para el ensamblaje de XPB al “core” de TFIIH y para modular su actividad ATPasa (de la que depende la apertura del DNA durante la vía NER), la interacción de p8 con p52 parece estimular la actividad ATPasa de XPB (Jawhari *et. al.*, 2002; Coin *et. al.*, 2006 y 2007). Basándonos en los resultados obtenidos en este trabajo, *Dmp18* interacciona con *Dmp8*, y también puede interaccionar con dos regiones de *Dmp52*: el CTD, que también es la región de unión para *Dmp8*, y otra región fuera de este dominio. Sin embargo, aunque *Dmp8* y *Dmp18* pueden unirse con la región carboxilo (CTD)

de Dmp52, estas interacciones no parecen darse de manera simultánea al menos *in vitro*. No obstante, ya que Dmp18 parece interactuar con otra región de Dmp52 además del CTD, es posible que una vez ensambladas las 10 subunidades de TFIIH, Dmp18 pueda aún interactuar con Dmp52 *in vivo*. Esta hipótesis se ve apoyada por el hecho de que Dmp18 co-localiza con otra subunidad de TFIIH, DmXPD, en la mayoría de los sitios inmunoteñidos de los cromosomas politénicos (Figura 9). Adicionalmente, este resultado se refuerza por estudios en levadura que muestran que TFIIH (su subunidad p44 homóloga) y SWR1 (la ATPasa Swr1 del complejo) co-ocupan el nucleosoma +1 que se encuentra adelante del sitio de inicio de la transcripción, donde también se localiza la histona H2AZ (Venters y Pugh, 2009).

Un resultado que arrojaron los ensayos de pull-down *in vitro* fue que la interacción del CTD de Dmp52 con Dmp8 es quien parece favorecerse sobre aquella entre Dmp18 y el CTD de Dmp52. Esta posible predilección de Dmp52 para unirse a Dmp8 podría explicar por qué en los ensayos de coIP en las células S2R+ en cultivo (Figura 8) no se observó la interacción entre Dmp8 y Dmp18, a pesar de que ambas co-inmunoprecipitaron con Dmp52. La aparente inconsistencia en los resultados de los ensayos de pull-down y del doble híbrido, con los obtenidos de las coIPs respecto a la detección de la interacción entre Dmp8 y Dmp18, también puede deberse a las distintas condiciones de cada tipo de ensayo. Asimismo, la presencia de la etiqueta de FLAG en las proteínas recombinantes pudo interferir en las interacciones proteína-proteína. También, cabe mencionar que en el ensayo de doble híbrido (Figura 7) no todas las combinaciones probadas para analizar la interacción directa entre las proteínas fueron efectivas; inclusive, la interacción ya reportada de Dmp8-Dmp52 sólo se observó cuando Dmp8 se fusionó al dominio de activación de GAL4 y Dmp52 al de unión al DNA, pero no en la combinación recíproca. Entonces, es posible que la conformación o el contexto de aminoácidos generado por la adición del péptido de fusión (haya sido la GST o la etiqueta de FLAG), así como la región de la proteína a la que éste se unió, pudieron influir en los resultados obtenidos en el análisis de las interacciones físicas entre Dmp8, Dmp18 y Dmp52, así como en otras posibles interacciones de éstas con otras proteínas. Otra posibilidad que no puede

descartarse es que los anticuerpos utilizados para realizar las colPs pudieran bloquear regiones de interacción entre Dmp8 y Dmp18, que en los otros ensayos quedaron disponibles para que esa interacción se llevara a cabo.

Además de las interacciones físicas descritas en este estudio, se encontró evidencia genética que refuerza la conexión funcional entre Dmp8 y Dmp18. La inserción de un elemento P que interrumpe la secuencia codificante del gen de *Dmp8* es semi-lethal para la mosca, ya que pocos organismos son capaces de desarrollarse hasta adultos, los cuales no tienen un fenotipo silvestre. Tal situación parece coincidir con el hecho de que algunos pacientes con TTDA son capaces de sobrevivir a pesar de la ausencia total de p8, pero presentan manifestaciones severas de TTD (Giglia-Mari *et. al.*, 2004). Las moscas sobrevivientes que carecen de Dmp8 (las homocigas *l(2)SH1279*) presentan un fenotipo de extensión de alas y reducción en el tamaño de las mismas, así como alteraciones en la fertilidad, siendo estériles los machos y semi-fértiles las hembras (Figura 12 y Cuadro 2). La esterilidad y la reducción en el tamaño de varias estructuras de organismos adultos son fenotipos que se describieron previamente para mutantes de Dmp52 (Fregoso *et. al.*, 2007) y de DmXPB (Merino *et. al.*, 2002). Sin embargo, la extensión de alas parece ser un rasgo característico de la mutante de Dmp8 y podría ser una consecuencia indirecta de la falta de Dmp8, ya que existen reportes de diversos y distintos tipos de mutaciones monoalélicas que pueden ocasionar fenotipos similares (Hayashi *et. al.*, 1993; Prout *et. al.*, 1997).

Por otra parte, la inducción del RNAi contra Dmp18 en las alas de las moscas (que reduce la expresión de Dmp18 pero también de Dmp8) ocasiona una ligera reducción en el tamaño del ala, una alteración en su forma y, en algunas ocasiones, la generación de una ampolla en la región media distal de ésta. La presencia de ampollas en las alas fue un fenotipo reportado en moscas con algunas combinaciones heteroalélicas de XPB, proponiéndose su origen en una tasa de apoptosis alta y anormal en los discos imagales, la cual podía deberse a una reparación deficiente del DNA durante el desarrollo del organismo (Merino *et. al.*, 2002). Ya que Dmp8 ha sido reportada como una subunidad de TFIIH con un papel fundamental en el mecanismo de reparación del DNA mediante la vía

de NER, podría esperarse que al disminuir los niveles de expresión de Dmp8, ya sea por la inducción del RNAi o por la presencia de la inserción *I(2)SH1279*, este mecanismo de reparación sea deficiente y pueda generarse un fenotipo similar al de las mutantes de XPB en las alas de las moscas. Por otro lado, ya que Dmp18 se ha visto implicado en la diferenciación muscular en mamíferos (Cuadrado *et. al.*, 2010), y sabiendo que la extensión de alas puede resultar por defectos en los músculos indirectos del vuelo (De la Pompa *et. al.*, 1989), podría suponerse que alteraciones en la expresión de Dmp18 pudieran provocar el fenotipo de extensión de alas. Sin embargo, este fenotipo no se observó en las alas donde se indujo el RNAi, probablemente porque el driver *MS1096* sólo induce la expresión de éste en la región anterior del disco de ala, y no otros tejidos donde estén los precursores de los músculos necesarios para el vuelo de la mosca. No obstante, los datos obtenidos en el ensayo de rescate del fenotipo del RNAi *dsDmp18* en las alas de las moscas por la expresión de Dmp8-H6 o myc-Dmp18 (Figura 16), sugieren que el fenotipo de extensión de alas puede deberse a un desbalance en la co-expresión de Dmp8 y Dmp18. Por lo tanto, parece necesario co-regular los niveles de estas dos proteínas para tener un adecuado desarrollo del ala.

Una manera para asegurar la co-regulación de la expresión de los genes de *Dmp8* y *Dmp18* es su organización en un locus bicistrónico. Esta suposición parece reafirmarse por la evidencia de que tal organización génica permite la generación de un transcrito bicistrónico y está conservada en muchos insectos y probablemente en varios artrópodos desde hace cientos de millones de años. Otro resultado que parece apoyar la importancia de la co-regulación de Dmp8 y Dmp18 es que los mismos fenotipos de infertilidad y extensión de alas se presentan cuando se tiene una carencia de Dmp8 debida a la presencia homóciga de la inserción *I(2)SH1279*, o bien, por combinaciones transheterocigas de esta inserción con las deficiencias genómicas donde se pierde el locus *Dmp8-Dmp18*, recordando que en ambos casos Dmp18 está presente. Asimismo, la pérdida parcial de Dmp18 en las alas (causada por la expresión del RNAi) combinada con la ausencia de Dmp8 (generada por la presencia de la inserción *I(2)SH1279*), resulta en una mayor deformación y reducción del tamaño de las alas en comparación con las

moscas que sólo pierden a Dmp8 o que sólo expresan el RNAi contra Dmp18 (Figura 17). Dado que no se conoce el mecanismo a través del cual se regula la traducción del bicistrón *Dmp8-Dmp18*, sería relevante conocer si a nivel traduccional o post-traduccional se mantiene, se refuerza o se pierde la co-regulación que se propone tiene el producir este único transcrito.

En resumen, los resultados de este análisis genético y la evidencia de la interacción física de Dmp18 con Dmp8 y Dmp52, sugieren que en *D. melanogaster* existe una conexión funcional entre TFIIH y Dmp18. Sin embargo, surge una nueva pregunta: ¿a qué nivel funcional se da esta interacción?

Ya que las interacciones físicas entre algunos componentes de varios complejos multiproteicos pueden ser transitorias y volverse estables o más duraderas cuando la célula se ve expuesta a diferentes formas de estrés o cuando se lleva a cabo un proceso celular determinado, la interacción física de Dmp18 con TFIIH podría favorecer o regular algunas de las actividades celulares en las que participa este factor o alguno de sus componentes, como son la transcripción, la reparación del DNA y el control del ciclo celular. Adicionalmente, la interacción de TFIIH con Dmp18 podría implicar una conexión con el complejo TIP60, que es el posible homólogo de SWR1/SRCAP en la mosca. Tanto en *D. melanogaster* como en mamíferos, TIP60 parece ser la fusión del complejo SWR1 y del complejo NuA4, el cual posee actividad de transferasa de acetilos de histonas (HAT) (Kobor *et. al.*, 2004; Eisenberg *et. al.*, 2005; Lu *et. al.*, 2009). Además de su actividad HAT, TIP60 interviene en múltiples funciones celulares incluyendo apoptosis, reparación del DNA, progreso del ciclo celular y señalización durante el desarrollo (Sapountzi *et. al.*, 2006). Particularmente en *D. melanogaster*, además de participar en el intercambio selectivo de la variante H2A por la H2AZ (H2Av en la mosca) en sitios de daño al DNA (Kusch *et. al.*, 2004), el complejo TIP60 se ha visto implicado en procesos de regulación transcripcional (Qi *et. al.*, 2006; Tea y Luo, 2011), relacionándose así, con una función que también puede involucrar a TFIIH.

A pesar de que se han caracterizado e identificado varias de las subunidades del complejo TIP60, la proteína Dmp18 de mosca o p18^{Hamlet}/ZNHIT1 de mamífero no se ha

definido como parte de este complejo. De modo interesante, el complejo SRCAP de humano, homólogo a SWR1 de levadura, no se ha descrito en la mosca. Por lo tanto, no se sabe si Dmp18 es parte de TIP60 o si tiene funciones independientes a dicho complejo. Por otro lado, aunque ni Dmp18 ni p18^{Hamlet}/ZNHIT se hayan encontrado en los complejos TIP60 de mosca y humano, respectivamente, se sabe que las proteínas que se comportan como subunidades de un complejo en un organismo suelen ser componentes del mismo en otro, pero a veces su interacción se pierde durante el proceso de purificación del complejo. Por consiguiente, aún sería posible que Dmp18 interactuara con TIP60 en la mosca. A este respecto, consistente con la interacción genética entre Dmp8 y Dmp18 mostrada en este trabajo, existen reportes que indican que el homólogo de Dmp18 en levadura (Swc6) interactúa genéticamente con los homólogos de las subunidades DmXPD y Dmp44 (Rad3 y Ssl1 en levadura) de TFIIH (Collins *et. al.*, 2007; Costanzo *et. al.*, 2010); indicando que también existe una posible relación funcional entre p18 y TFIIH en levadura. Asimismo, si en la mosca Dmp18 es verdaderamente un componente del complejo homólogo a SWR1, como se ha indicado que en la levadura lo es Swc6, entonces los fenotipos observados a partir de las interacciones genéticas pueden ser la consecuencia de la interacción funcional entre SWR1 y TFIIH.

Con base en los datos previamente publicados y los resultados aquí presentados, la identificación del complejo que contenga a Dmp18, así como la demostración de que tal complejo interactúa directamente con TFIIH, permitirán examinar el o los mecanismos que relacionan la incorporación y el intercambio de la histona H2Av (única variante de la histona H2A en la mosca, que incluye características de las formas H2AZ y H2AX de mamífero) con la incorporación de TFIIH en los promotores de genes para regular la transcripción o en zonas de DNA dañado para permitir su reparación. Por otra parte, si Dmp18 establece individualmente una interacción con TFIIH, se requerirá evaluar si esto tiene un efecto directo en la activación o represión transcripcional; pues se ha visto que p18^{Hamlet} puede funcionar como cofactor para regular la actividad de receptores nucleares (Wang *et. al.*, 2007) y puede modular la actividad transcripcional de la proteína p53 interviniendo en decisiones vitales de la célula para sobrevivir a condiciones de estrés

generadas por daños al DNA (Cuadrado *et. al.*, 2007; Lafarga *et. al.*, 2007). Igualmente, se sabe que TFIIH interacciona con p53 de múltiples maneras tanto en células humanas (Wang *et. al.*, 2007) como en *D. melanogaster* (Okuda *et. al.*, 2008; Villicaña Torres, sometido), por lo que deberá tomarse en cuenta este otro factor que podría intervenir en la interacción de Dmp18 con TFIIH.

CONCLUSIONES

A partir de los datos que se reportan en este trabajo y después de ser discutidos, las conclusiones a las que se llega son:

1. En *Drosophila melanogaster*, la subunidad Dmp8 de TFIIH se encuentra codificada en un mismo transcrito con Dmp18, que es el homólogo de Swc6/p18^{Hamlet} en levadura y en humano, respectivamente.
2. El transcrito bicistrónico que codifica a *Dmp8* y *Dmp18* se expresa en todas las etapas de desarrollo de *D. melanogaster*.
3. La organización génica que da lugar a un transcrito bicistrónico para *p8* y *p18* está conservada en varias especies de la clase insecta y en otros artrópodos.
4. Dmp18 interacciona físicamente con dos regiones de la subunidad Dmp52 de TFIIH.
5. Dmp8 y Dmp18 pueden unirse con el dominio carboxilo terminal (CTD) de Dmp52, pero estas interacciones no se dan simultáneamente al menos *in vitro*. La interacción entre el CTD de Dmp52 y Dmp8 se favorece sobre aquella entre Dmp18 y el CTD de Dmp52.
6. Dmp18 co-localiza con la subunidad DmXPD de TFIIH en la cromatina.
7. Dmp8 y Dmp18 interaccionan física y genéticamente.
8. La falta de Dmp8, aún en presencia de Dmp18, es semi-letal para la mosca, provoca esterilidad en machos y semi-fertilidad en hembras, genera un fenotipo de extensión de alas y disminución en el tamaño de las mismas.
9. La reducción simultánea de Dmp8 y Dmp18 en el ala de la mosca tiene un efecto sinérgico en el crecimiento y desarrollo de ésta.
10. La desregulación de la co-expresión de Dmp8 y Dmp18 provocan un fenotipo de extensión de alas, lo cual sugiere que es necesario co-regular los niveles de las dos proteínas para tener un adecuado desarrollo del ala.

PERSPECTIVAS

En este trabajo se mostró que *Dmp8* está codificado en un mismo mRNA con *Dmp18* y que tal organización génica en un locus bicistrónico está conservada en otros artrópodos. Por ello se sugiere estudiar el mecanismo mediante el cual dicho mRNA bicistrónico se traduce, lo cual permitirá conocer si se mantiene, se refuerza o se pierde la co-regulación que se propone conlleva la síntesis de este único transcrito.

Por otro lado, para estudiar a qué nivel se da la interacción funcional entre Dmp18 y TFIIH sugerida por los resultados de nuestro análisis genético y bioquímico, se proponen varias estrategias. Una de ellas es evaluar posibles interacciones genéticas entre Dmp18 y otros componentes de TFIIH, como son Dmp52, XPB y XPD, ya que nuestro grupo de trabajo posee líneas de moscas mutantes en estos genes. También se podría evaluar la interacción genética entre Dmp18 y TIP60 (ver sección b en Anexo V), así como entre Dmp18 y p53. Sin embargo, ya que Dmp18 está codificada en el mismo transcrito que Dmp8 y debido a que nos se cuenta con ninguna mutante que solo afecte al primero, la generación de mutantes de Dmp18 sería de gran utilidad en el estudio de las interacciones genéticas y físicas de esta proteína en la mosca. Con estas mutantes también se podría evaluar el efecto de la deficiencia o carencia de Dmp18 en un fondo donde Dmp8 no se encuentre afectado. Una estrategia complementaria para este análisis sería el uso de la línea de RNAi *dsDmp18* aunada a la expresión de Dmp8. A este mismo respecto, se podría corroborar si el fenotipo de extensión de alas de la mutante *l(2)SH1279* se debe a un desbalance en los niveles de co-expresión de Dmp8 y Dmp18 mediante la expresión del RNAi *dsDmp18* en otros tejidos blanco además del disco imagal de ala, como sería el tejido muscular.

Otra propuesta para continuar con el estudio de las funciones que Dmp18 tiene en la mosca comprende la identificación del o los complejos proteicos que contienen a Dmp18, lo cual podría llevarse a cabo mediante técnicas como la purificación por afinidad en tándem y espectrometría de masas. También, la utilización del sistema de células S2R+ en cultivo puede ofrecer una alternativa para verificar dichas interacciones físicas.

Por otro lado, analizar la dinámica intracelular de Dmp18 será otra vía a través de la cual se puede conocer más sobre la función que esta proteína tiene en el organismo. Para ello será necesaria la adquisición de un nuevo conjunto de anticuerpos, incluyendo otro que pueda reconocer a Dmp18 y ser funcional para las técnicas de inmunotinción, así como aquéllos que reconozcan proteínas del complejo de TIP60 o alguna otra que sea identificada como presunta compañera de Dmp18. Esto también permitirá analizar si Dmp18 co-localiza con componentes de la maquinaria basal de transcripción o de NER en la cromatina, y cuál es su localización celular en diferentes etapas del desarrollo y en diversos tipos de tejido.

REFERENCIAS

- Aguilar-Fuentes, J., Valadez-Graham, V., Reynaud, E. y Zurita, M. (2006) TFIID trafficking and its nuclear assembly during early *Drosophila* embryo development. *J. Cell Sci.* **119**, 3866-3875.
- Aguilar-Fuentes, J., Fregoso, M., Herrera, M., Reynaud, E., Braun, C., Egly, J.M. y Zurita, M. (2008) p8/TTDA overexpression enhances UV-irradiation resistance and suppresses TFIID mutations in a *Drosophila* trichothiodystrophy model. *PLoS Genet.* **4**(11): e1000253.
- Assfalg, R., Lebedev, A., Garcia Gonzalez, O., Schelling, A., Koch, S. e Iben, S. (2012) TFIID is an elongation factor of RNA polymerase I. *Nucleic Acids Res.* **40**, 650-659.
- Bao, Y. y Shen, X. (2007a) INO80 subfamily of chromatin remodeling complexes. *Mutat. Res.* **582**, 2041-2050
- Bao, Y. y Shen, X. (2007b) SnapShot: Chromatin Remodeling Complexes. *Cell* **129**, 632-632e1.
- Bao, Y. y Shen, X. (2010) SnapShot: Chromatin Remodeling: INO80 and SWR1. *Cell* (2010) 158-158e2.
- Betrán, E. y Ashburner, M. (2000) Duplication, dicistronic transcription, and subsequent evolution of the *Alcohol dehydrogenase* and *Alcohol dehydrogenase-related* genes in *Drosophila*. *Mol. Biol. Evol.* **17**, 1344-1352.
- Blumenthal, T. (2004) Operons in eukaryotes. *Brief. Funct. Genomic. Proteomic* **3**, 199-211.
- Brunner, E., Brunner, D., Fu, W., Hafen, E. y Basler, K. (1999). The dominant mutation *Glazed* is a gain-of-function allele of *wingless* that, similar to loss of APC, interferes with normal eye development. *Dev. Biol.* **206**, 178-188.
- Cai, Y., Jin, J., Tomomori-Sato, C., Sato, S., Sorokina, I., Parmely, T.J., Conaway, R.C. y Conaway, J.W. (2003) Identification of new subunits of the multiprotein mammalian TRRAP/TIP60-containing histone acetyltransferase complex. *J. Biol. Chem.* **278**, 42733–42736.
- Cai, Y., Jin, J., Florens, L., Swanson, S.K., Kusch, T., Li, B., Workman, J.L., Washburn, M.P., Conaway, R.C. y Conaway, J.W. (2005) The mammalian YL1 protein is a shared subunit of the TRRAP/TIP60 histone acetyltransferase and SRCAP complexes. *J Biol Chem* **280**: 13665–13670.
- Capdevila, J. y Guerrero, I. (1994). Targeted expression of the signaling molecule decapentaplegic induces pattern duplications and growth alterations in *Drosophila* wings. *EMBO J.* **13**, 4459–4468
- Choi, K., Park, C., Lee, J., Oh, M., Noh, B. y Lee, I. (2007) *Arabidopsis* homologs of components of the SWR1 complex regulate flowering and plant development. *Development* **134**, 1931-1941.

- Coin, F., De Santis, L.P., Nardo, T., Zlobinskaya, O., Stefanini, M. y Egly, J.M. (2006) p8/TTD-A as a Repair-Specific TFIIH Subunit. *Mol. Cell* **21**, 1-12.
- Coin, F., Oksenysh, V. y Egly, J.M. (2007) Distinct roles for the XPB/p52 and XPD/p44 subcomplexes of TFIIH in damaged DNA opening during Nucleotide Excision Repair. *Mol. Cell* **26**, 245-256.
- Collins, S.R., Miller, K.M., Maas, N.L., Roguev, A., Fillingham, J., *et al.* (2007) Functional dissection of protein complexes involved in yeast chromosome biology using a genetic interaction map. *Nature* **446**, 806-810.
- Compe, E. y Egly, J.M. (2012) TFIIH: when transcription met DNA repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 343-354.
- Conaway J.W. y Conaway R.C. (1989) A multisubunit transcription factor essential for accurate initiation by RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* **264**, 2357-2362.
- Costanzo, M., Baryshnikova, A., Bellay, J., Kim Y., Spear, E.D., *et al.* (2010) The genetic landscape of a cell. *Science* **327**, 425-431.
- Cruz Becerra, G.L. (2008) *Análisis de la posible interacción de p18^{Hamlet} con las subunidades p8 y p52 de TFIIH*. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología, UNAM.
- Cuadrado, A., Lafarga, V., Cheung, P.C., Dolado, I., Llanos, S., Cohen, P. y Nebreda, A.R. (2007) A new p38 MAP kinase-regulated transcriptional coactivator that stimulates p53-dependent apoptosis. *EMBO J.* **26**, 2115-2126.
- Cuadrado, A., Corrado, N., Perdiguero, E., Lafarga, V., Muñoz-Canoves, P. y Nebreda, A.R. (2010) Essential role of p18^{Hamlet}/SRCAP-mediated histone H2A.Z chromatin incorporation in muscle differentiation. *EMBO J.* **29**, 2014-2025.
- De la Pompa, J.L., Garcia, J.R. y Ferrús, A. (1989) Genetic analysis of muscle development in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Bio.* **131**, 439-454.
- Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, K.C., Barinova, Y., Fellner, M., Gasser, B., Kinsey, K., Oppel, S., Scheiblauer, S., Couto, A., Marra, V., Keleman, K. y Dickson, B.J. (2007) A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature* **448**, 151-156.
- Drosophila Schneider 2 (S2) Cells* [manual en línea]. (1998-2002) Invitrogen Corporation. <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/schneidercells_man.pdf> [Consulta: 01 marzo 2011]
- Egloff, S. O'Reilly, D., Chapman, R.D., Taylor, A., Tanzhaus, K., Pitts, L., Eick, D. y Murphy, S. (2007) Serine-7 of the RNA polymerase II CTD is specifically required for snRNA gene expression. *Science* **318**, 1777-1779.
- Egly, J.M. y Coin, F. (2011) A history of TFIIH: Two decades of molecular biology on a pivotal transcription/repair factor. *DNA Repair* **10**, 714-721.

- Eissenberg, J.C., Wong, M. y Chrivia, J.C. (2005) Human SRCAP and *Drosophila melanogaster* DOM are homologs that function in the *Notch* signaling pathway. *Mol. Cell Biol.* **25**, 6559-6569.
- Engels, W.R., Johnson-Schlitz, D.M., Eggeston, W.B. y Sved, J. (1990) High-frequency P element loss in *Drosophila* is homolog dependent. *Cell* **62**, 515-525.
- Feaver, W.J., Gileadi, O. y Kornberg, R. (1991) Purification and characterization of yeast RNA polymerase II transcription factor b. *J. Biol. Chem.* **266**, 19000-19005.
- Flores, O., Lu, H. y Reinberg, D. (1992) Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II. Identification and characterization of factor IIH. *J. Biol. Chem.* **267**, 2786-2793.
- Fregoso, M., Lainé, J.P., Aguilar-Fuentes, J., Mocquet, V., Reynaud, E., Coin, F., Egly, J.M. y Zurita, M. (2007) DNA repair and transcriptional deficiencies caused by mutations in the *Drosophila* p52 subunit of TFIIH generate developmental defects and chromosome fragility. *Mol. Cell Biol.* **27**, 3640-3650.
- Gerard, M., Fischer, L., Moncollin, V., Chipoulet, J.M., Chambon, P. y Egly, J.M. (1991) Purification and interaction properties of the human RNA polymerase B(II) general transcription factor BTF2. *J. Biol. Chem.* **266**, 20940-20945.
- Giglia-Mari, G., Coin, F., Ranish, J.A., Hoogstraten, D., Theil, A., *et al.* (2004) A new, tenth subunit of TFIIH is responsible for the DNA repair syndrome trichothiodystrophy group A. *Nat. Genet.* **36**, 714-719.
- Giglia-Mari, G., Miquel, C., Theil, A.F., Mari, P.O., Hoogstraten, D., Ng, J.M., Dinant, C., Hoeijmakers, J.H. y Vermeulen, W. (2006) Dynamic interaction of TTDA with TFIIH is stabilized by Nucleotide Excision Repair in living cells. *PLoS Biol.* **4**(6): e156.
- Giot, L., Bader, J.S., Brouwer, C., Chaudhuri, A., Kuang, B., Li, Y., Hao, Y.L., *et al.*, (2003) A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science* **302**, 1727-1736.
- Gutiérrez L., Zurita M., Kennison J.A. y Vázquez M. (2003) The *Drosophila* trithorax group gene *tonally(tna)* interacts genetically with the Brahma remodeling complex and encodes an SP-RING finger protein. *Development* **130**: 343-54.
- Hanawalt, P.C. y Spivak, G. (2008) Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 958-970.
- Hayashi, S., Hirose, S., Metcalfe, T. y Shirras, A.D. (1993) Control of imaginal cell development by the *escargot* gene of *Drosophila*. *Development* **118**, 105-115.
- He, F., Umehara, T., Tsuda, K., Inoue, M., Kigawa, T., Matsuda, T., Yabuki, T., Aoki, M., Seki, E., Terada, T., Shirouzu, M., Tanaka, A., Sugano, S., Muto, Y. y Yokoyama, S. (2007) Solution structure of the zinc finger HIT domain in protein FON. *Protein Sci.* **17**, 1577-1587.
- Herrera Cruz, M. (2007) *TTDA y ORF2 en Drosophila melanogaster y su posible interacción con TFIIH*. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología, UNAM.

- Hoeijmakers J.H. (1994) Human nucleotide excision repair syndromes: molecular clues to unexpected intricacies. *Eur. J. Cancer* **30A**, 1912-1921.
- Iben, S., Tschochner, H., Bier, M., Hoogstraten, D., Hozák P., Egly, J.M. y Grummt, I. (2002) TFIIH plays an essential role in RNA polymerase I transcription. *Cell* **109**, 297–306.
- Jawhari, A., Lainé, J.P., Dubaele, S., Lamour, V., Poterszman, A., Coin, F., Moras, D. y Egly, J.M. (2002) p52 mediates XPB function within the transcription/repair factor TFIIH. *J. Biol. Chem.* **277**, 31761-31767.
- Kainov, D.E., Vitorino, M., Cavarelli, J., Poterszman, A. y Egly, J.M. (2008) Structural basis for group A trichothiodystrophy. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 980-984.
- Kim, K., Lee, Y.S., Harris, D., Nakahara, K. y Carthew, R.W. (2006) The RNAi pathway initiated by Dicer-2 in *Drosophila*. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **71**, 39-44.
- Kobor, M.S., Venkatasubrahmanyam, S., Meneghini, M.D., Gin, J.W., Jennings, J.L., Link, A.J., Madhani, H.D. y Rine, J. (2004) A protein complex containing the conserved Swi2/Snf2-related ATPase Swr1p deposits histone variant H2A.Z into euchromatin. *PLoS Biol* **2**, E131.
- Krogan, N.J., Keogh, M.C., Datta, N., Sawa, C., Ryan, O.W., Ding, H., Haw, R.A., Pootoolal, J., Tong, A., Canadien, V., Richards, D.P., Wu, X., Emili, A., Hughes, T.R., Buratowski, S. y Greenblatt, J.F. (2003) A Snf2 family ATPase complex required for recruitment of the histone H2A variant Htz1. *Mol. Cell* **12**, 1565–1576.
- Kusch, T., Florens, L., Macdonald, W.H., Suanson, S.K., Glaser, R.L., Yates, J.R. 3rd, Abmayr, S.M., Washburn, M.P. y Workman, J.L. (2004) Acetylation by Tip60 is required for selective histone variant exchange at DNA lesions. *Science* **306**, 2084-2087.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lafarga, V., Cuadrado, A. y Nebreda, A.R. (2007) p18(Hamlet) mediates different p53-dependent responses to DNA-damage inducing agents. *Cell Cycle* **6**, 2319-2322.
- Lans, H., Marteijn, J.A. y Vermeulen, W. (2012) ATP-dependent chromatin remodeling in the DNA-damage response. *Epigenetics Chromatin* **5**:4.
- Larochelle, S., Pandur, J., Fisher, R.P., Salz, H. y Suter, B. (1998) Cdk7 is essential for mitosis and for *in vivo* Cdk-activating kinase activity. *Genes Dev.* **12**, 370-381.
- Lehmann, A.R. (2003). DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *Biochimie* **85**, 1101–1111
- Lekven, A.C., Thorpe, C.J., Waxman, J.S. y Moon, R.T. (2001) Zebrafish *wnt8* encodes two Wnt8 proteins on a bicistronic transcript and is required for mesoderm and neuroectoderm patterning. *Dev. Cell* **1**, 103-114.
- Li, B., Pattenden, S.G., Lee, D., Gutiérrez, J., Chen, J., Seidel, C., Gerton, J. y Workman J.L. (2005) Preferential occupancy of histone variant H2AZ at inactive promoters

- influences local histone modifications and chromatin remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **102**, 18385-18390.
- Li, B., Carey, M. y Workman, J.L. (2007) The role of chromatin during transcription. *Cell* **128**, 707-719.
- Lu, P.Y., Lévesque, N. y Kobor, M.S. (2009) NuA4 and SWR1-C: two chromatin-modifying complexes with overlapping functions and components. *Biochem. Cell Biol.* **87**, 799-815.
- Luk, E., Ranjan, A., Fitzgerald, P.C., Mizuguchi, G., Huang, Y., Wei, D. y Wu, C. (2010) Stepwise histone replacement by SWR1 requires dual activation with histone H2A.Z and canonical nucleosome. *Cell* **143**, 725-736.
- March-Díaz, R., García-Domínguez, M., Florencio, F.J. y Reyes, J.C. (2007) SEF, a new protein required for flowering repression in Arabidopsis, interacts with PIE1 and ARP6. *Plant Physiol.* **143**, 893-901.
- Mathieu, N., Kaczmarek, N. y Naegeli, H. (2010) Strand- and site-specific DNA lesion demarcation by the xeroderma pigmentosum group D helicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 17548-17550.
- Merino, C., Reynaud, E., Vázquez, M. y Zurita, M. (2002) DNA repair and transcriptional effects of mutations in TFIH in *Drosophila* development. *Mol. Biol. Cell* **13**, 3246-3256.
- Mizuguchi, G., Shen, X., Landry, J., Wu, W.H., Sen, S. y Wu, C. (2004) ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science* **303**, 343-348.
- Morillo-Huesca, M., Clemente-Ruiz, M., Andújar, E. y Prado, F. (2010) The SWR1 histone replacement complex causes genetic instability and genome-wide transcription misregulation in the absence of H2A.Z. *PLoS One* **5**(8): e12143.
- Murakami, K., Gibbons, B.J., Davis, R.E., Nagai, S., Liu, X., Robinson, P.J., Wu, T., Kaplan, C.D., y Kornberg, R.D. (2012) Tfb6, a previously unidentified subunit of the general transcription factor TFIH, facilitates dissociation of Ssl2 helicase after transcription initiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 4816-4821.
- Oh, S.W., Kingsley, T., Shin, H.H., Zheng, Z., Chen, H.W., Chen, X., Wang, H., Ruan, P., Moody, M. y Hou, S.X. (2003) A P-element insertion screen identified mutations in 455 novel essential genes in *Drosophila*. *Genetics* **163**, 195-201.
- Okuda, M., Tanaka, A., Satoh, M., Mizuta, S., Takazawa M., Ohkuma, Y. y Nishimura, Y. (2008) Structural insight into the TFIIE-TFIH interaction: TFIIE and p53 share the binding region on TFIH. *EMBO J.* **27**, 1161-1171.
- Papamichos-Chronakis, M., Krebs, J.E. y Peterson, C.L. (2006) Interplay between Ino80 and Swr1 chromatin remodeling enzymes regulates cell cycle checkpoint adaptation in response to DNA damage. *Genes Dev.* **20**, 2437-2449.

- Pavlik, P., Konduri, V., Massa, E., Simonette, R. y Beckingham, K.M. (2006) A dicistronic gene pair within a cluster of "EF-hand" protein genes in the genomes of *Drosophila* species. *Genomics* **88**, 347-359.
- Piccin, A., Salameh, A., Benna, C., Sandrelli, F., Mazzotta, G., Zordan, M., Rosato, E., Kyriacou, C.P. y Costa, R. (2001) Efficient and heritable functional knock-out of an adult phenotype in *Drosophila* using a GAL4-driven hairpin RNA incorporating a heterologous spacer. *Nucleic Acids Res.* **29**, 55-65.
- Prout, M., Damania, Z., Soong, J., Fristrom, D. y Fristrom, J.W. (1997) Autosomal mutations affecting adhesion between wing surfaces in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **146**, 275-285.
- Qi, D., Jin, H., Lilja, T. y Mannervik, M. (2006) *Drosophila* Reptin and other TIP60 complex components promote generation of silent chromatin. *Genetics* **174**, 241-251.
- Ranish, J.A., Hahn, S., Lu, Y., Yi, E.C., Li, X.J., Eng, J. y Aebersold, R. (2004) Identification of TFB5, a new component of general transcription and DNA repair factor IIH. *Nat. Genet.* **36**, 707-713.
- Reynaud, E., Lomeli, H., Vazquez, M. y Zurita, M. (1999). The *Drosophila melanogaster* homologue of the Xeroderma pigmentosum D gene product is located in euchromatic regions and has a dynamic response to UV light-induced lesions in polytene chromosomes. *Mol. Biol. Cell* **10**, 1191-1203.
- Ritchie, H. y Wang, L.H. (1997) A mammalian bicistronic transcript encoding two dentin-specific proteins. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **231**, 425-428.
- Rossignol, M., Kolb-Cheynel, I. y Egly, J.M. (1997) Substrate specificity of the cdk-activating kinase (CAK) is altered upon association with TFIH. *EMBO J.* **15**, 1877-1884.
- Rubin, G.M. y Spradling, A.C. (1982) Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* **218**, 348-353.
- Ruhl, D.D., Jin, J., Cai, Y., Suanson, S., Florens, L., Washburn, M.P., Conaway, R.C, Conaway, J.W. y Chrivia, J.C. (2006) Purification of a human SRCAP complex that remodels chromatin by incorporating the histone variant H2A.Z into nucleosomes. *Biochemistry* **45**, 5671-5677.
- Sapountzi, V., Logan, I.R. y Robson, C.N. (2006) Cellular functions of TIP60. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **38**, 1496-1509.
- Schärer, O.D. (2008) The molecular basis for different disease states caused by mutations in TFIH and XPG. *DNA Repair* **7**, 339-344.
- Serizawa, H., Conaway, J.W. y Conaway, R.C. (1993) Phosphorylation of C-terminal domain of RNA polymerase II is not required in basal transcription. *Nature* **363**, 371-374.
- Seroz, T., Hwang, J.R., Moncollin, V. y Egly J.M. (1995) TFIH: a link between transcription, DNA repair and cell cycle regulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **5**, 217-221.

- Sloan, J., Kinghorn, J.R. y Unkles, S.E. (1999) The two subunits of human molybdopterin synthase: evidence for a bicistronic messenger RNA with overlapping reading frames. *Nucleic Acids Res.* **27**, 854-858.
- Sullivan, W., Ashburner, M. y Hawley, R.S. (2000) *Drosophila protocols*. Cap. 31. Cold Spring Harbor, New York: CSHL Press.
- Takagi, Y., Komori, H., Chang, W.H., Hudmon, A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. y Kornberg, R.D. (2003) Revised subunit structure of yeast transcription factor IIH (TFIIH) and reconciliation with human TFIIH. *J. Biol. Chem.* **278**, 43897-43900.
- Tea, J.S. y Luo, L. (2011) The chromatin remodeling factor Bap55 functions through the TIP60 complex to regulate olfactory projection neuron dendrite targeting. *Neural Dev.* **6**:5.
- Van Attikum, H. y Gasser, S.M. (2009) Crosstalk between histone modifications during the DNA damage response. *Trends Cell Biol.* **19**, 207-217.
- Venters, B.J. y Pugh, B.F. (2009) A canonical promoter organization of the transcription machinery and its regulators in the *Saccharomyces* genome. *Genome Res.* **19**, 360-371.
- Vermeulen, W., Bergmann, E., Auriol, J., Rademakers, S., Frit, P., Appeldoorn, E., Hoeijmakers, J.H. y Egly, J.M. (2000) Sublimiting concentration of TFIIH transcription/DNA repair factor causes TTD-A trichothiodystrophy disorder. *Nat. Genet.* **26**, 307-313.
- Wang, J., Li, Y., Zhang, M., Liu, Z., Wu, C., Yuan, H., Li, Y.-Y., Zhao, X. y Lu, H. (2007) A zinc finger HIT domain-containing protein, ZNHIT-1, interacts with orphan nuclear hormone receptor Rev-erb β and removes Rev-erb β -induced inhibition of *apoCIII* transcription. *FEBS J.* **274**, 5370-5381.
- Waterhouse, R.M., Zdobnov, E.M., Tegenfeldt, F., Li, J. y Kriventseva, E.V. (2011) OrthoDB: the hierarchical catalog of eukaryotic orthologs in 2011. *Nucleic Acids Res.* **39**, Database issue D283-D288.
- Wong, M.M, Cox, L.K. y Chrivia, J.C. (2007) The chromatin remodeling protein, SRCAP, is critical for deposition of the histone variant H2A.Z at promoters. *J. Biol. Chem.* **282**, 26132-26139.
- Wu, W.H., Alami, S., Luk, E., Wu, C.H., Sen, S., Mizuguchi, G., Wei, D. y Wu, C. (2005) Swc2 is a widely conserved H2AZ-binding module essential for ATP-dependent histone exchange. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 1064-1071.
- Yanagawa, S., Lee, J.S. y Ishimoto, A. (1998) Identification and characterization of a novel line of *Drosophila* Schneider S2 cells that responds to wingless signaling. *Journal of Biological Chemistry* **273** (48): 32353-32359.

- Yang, Z., Cao, Y., Zhu, X., Hang, Y., Ding, Y. y Liu, X. (2009) Znhit1 causes cell cycle arrest and down-regulates CDK6 expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **386**, 146-152.
- Zhou, Y., Kou, H. y Wang, Z. (2007) Tfb5 interacts withTfb2 and facilitates nucleotide excision repair in yeast. *Nucleic Acids Res.* **35**, 861-871.
- Zurita, M. y Merino, C. (2003) The transcriptional complexity of the TFIIH complex. *Trends Genet.* **19**, 578-584.

ANEXOS

I. Genotipos y descripción de las líneas de moscas.

Colección	Stock	Genotipo	Comentarios
BDSC	7794	<i>w¹¹¹⁸; Df(2L)Exel7022/CyO</i>	Deficiencia que descubre la región 25B10;25C3 (2L:5000837--5058522)
BDSC	9605	<i>w¹¹¹⁸; Df(2L)BSC172/CyO</i>	Deficiencia que descubre la región 25B10;25C1 (2L:5000837--5037253)
BDSC	8835	<i>w¹¹¹⁸; Df(2L)BSC110/CyO</i>	Deficiencia que descubre la región 25C1;25C4 (2L:5029595--5064620)
BDSC	8860	<i>w¹¹¹⁸ P{GawB}Bx^{MS1096}</i>	Expresa GAL4 en la región dorsal del disco imagal de ala. [cromosoma X]
BDSC	1522	<i>w*; P{UAS-GFP.S65T}eg[T10]</i>	Expresa a la GFP bajo el control de UAS. [cromosoma 3]
BDSC	6452	<i>y¹ w*; P{UAS-GFP::lacZ.nls}30.1</i>	Expresa a GFP y a LacZ bajo el control de UAS. [cromosoma 3]
BDSC	4414	<i>y¹ w*; P{Act5C-GAL4}25FO1/ CyO, y⁺</i>	Expresa GAL4 de manera ubicua, bajo la regulación del promotor de Act5C. [cromosoma 2]
BDSC	5138	<i>y¹ w*; P{tubP-GAL4}LL7/ TM3, Sb¹</i>	Expresa GAL4 de manera ubicua, bajo la regulación del promotor de α Tub84B. [cromosoma 3]
BDSC	6870	<i>w¹¹¹⁸; P{Sgs3-GAL4.PD}TP1</i>	Expresa GAL4 en las glándulas salivales de larvas de tercer instar. [cromosoma 3]
DGRC	108071	<i>w*; P{FRT(w^{hs})}G13 P{tubP-GAL80}LL2</i>	Expresa GAL80 de manera ubicua. [cromosoma 2]
VDRC	v25909	<i>w¹¹¹⁸; P{GD10407}v25909</i>	Contiene un UAS-RNAi inducible contra <i>Dmp18</i> . [cromosoma 3]
Szeged	SH1279	<i>w¹¹¹⁸; P{lacW}SH1279^{SH1279}</i>	Contiene un elemento P insertado en el primer exón de <i>Dmp8</i> . [cromosoma 2]
-	6008	<i>w¹¹¹⁸; P{UAS-Dcr-2.D}</i>	Expresa Dicer-2 bajo el control de UAS. [cromosoma 2]

II. Oligonucleótidos

Cuadro I. Oligos para analizar la presencia del elemento P{lacW} en la línea I(2)SH1279.

Oligo	Año	Clave	Secuencia (5' a 3')	Uso
1772	2007	Ampli3F	CAA TCA TAT CGC TGT CTC ACT CA	Verificación de la inserción del elemento P{LacW} en la línea I(2)SH1279
2666	2007	Sec3'F	GAC ACT CAG AAT ACT ATT C	Verificación de la inserción del elemento P{LacW} en la línea I(2)SH1279
6047	2008	Up5'-p8	GAT TGT TTA TTA ATT TCG GC	Amplificación de Dmp8 y bicistrón Dmp8-Dmp18, y verificación de la inserción del elemento P{LacW} en la línea I(2)SH1279
6048	2008	Down3'-p8	GAT TTT ATG GGT TGT GTA GG	Amplificación de Dmp8, y verificación de la inserción del elemento P{LacW} en la línea I(2)SH1279

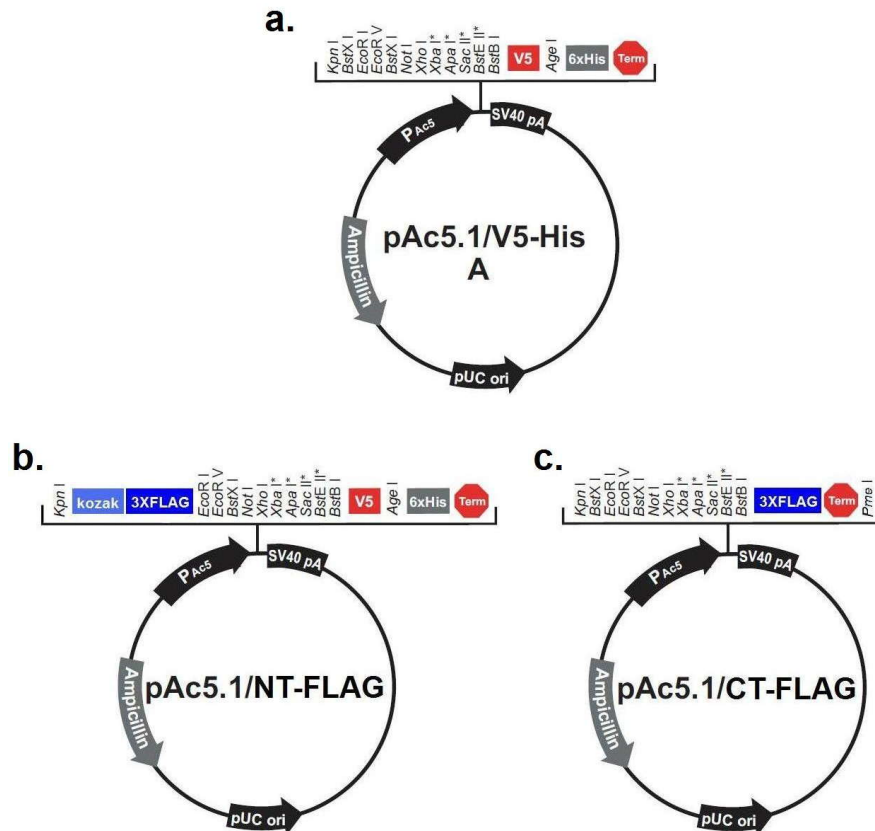
Cuadro II. Oligos para el análisis de Dmp8 y Dmp18.

Oligo	Año	Clave	Secuencia (5' a 3')	Uso
310	2006	Hsp83 5'	CGA TAC CGT CGA CCT CGA G	Amplificación de secuencias clonadas en el vector pCaSpeR ^{hsp83} y análisis de la expresión de esos transgenes
53	2006	p8-5	GGC AAC ATG GTA AAT GTT ATG AAA GGA	Amplificación de Dmp8, Dmp8-H6 y bicistrón Dmp8-Dmp18
54	2006	p8His	CTA GTG GTG ATG ATG GTG ATG AGC GTC CTT GTC GTG CAG CGG	Amplificación y secuenciación de Dmp8-H6
1998	2007	p8-3'	CTA AGC GTC CTT GTC GTG CAG CGG AAA	Amplificación de Dmp8 y H6-Dmp8
968	2006	His5'-p8	ATG CAT CAC CAT CAT CAC CAC ATG GTA AAT GTT ATG AAA GGA	Amplificación y secuenciación de H6-Dmp8
55	2006	Orf2 5	ACA ACC ATG ACG GGT CGC GAA TCC AAC	Amplificación de Dmp18 y Dmp18-myc
56	2006	Orf2myc	CTA TAG GTC CTC TTC AGA GAT GAG CTT CTG CTC GGC CGT CCA CTT GAG GCA	Amplificación y secuenciación de Dmp18-myc
969	2006	ORF2-3'	TCA GGC CGT CCA CTT GAG GCA GCG CGT	Amplificación de Dmp18, myc-Dmp18 y bicistrón Dmp8-Dmp18
970	2006	Myc5'-ORF2	ATG GAG CAG AAG CTC ATC TCT GAA GAG GAC CTA ATG ACG GGT CGC GAA TCC	Amplificación y secuenciación de myc-Dmp18
275	2006	Myc	CTA TAG GTC CTC TTC AGA GA	Amplificación y secuenciación de Dmp18-myc
463	2006	6His	CTA GTG GTG ATG ATG GTG AT	Amplificación y secuenciación de Dmp8-H6
6049	2008	Up5'-ORF2	ATC CAA TAG CCA AAA GTA AAA ACC	Amplificación de Dmp18
2891	2009	Rp49a	TCA AGA TGA CCA TCC GCC CA	Amplificación de rp49
2892	2009	Rp49b	GTT CTC TTG AGA ACG CAG GC	Amplificación de rp49

Cuadro III. Oligos para la clonación de *Dmp8* y *Dmp18* en los vectores de expresión de células S2R+ de *Drosophila*

Oligo	Año	Clave	Secuencia (5' a 3')	Uso
6156	2010	ECOR1KOZp8	GC GAA TTC GCC GCC ATG GTC ATG GTA AAT GTT	Clonación de <i>Dmp8</i> en pAc5.1/V5-His A y en pAc5.1/CT-FLAG
1252	2011	p8-3'-NotI-nvo	CG CGG CGG CCG CCA AGC GTC CTT GTC GTG	
6158	2010	ECOR1-p18	GC GAA TTC ATG ACG GGT CGC GAA TCC AAC	Clonación de <i>Dmp18</i> en pAc5.1/NT-FLAG
6159	2010	p18-3-NOT1	CGC GGC GGC CGC TCA GGC CGT CCA CTT GAG	

III. Vectores de expresión de células S2R+ de *Drosophila*



Los vectores de expresión de células S2R+ de *Drosophila* que se utilizaron para clonar a *Dmp8* fueron **(a)** pAc5.1/V5-His A (Invitrogen) y **(b)** pAc5.1/NT-FLAG. Para la clonación de *Dmp18* se usó el vector **(c)** pAc5.1/CT-FLAG. En todos los casos se clonó en los sitios *EcoR I* y *Not I*. En el cuadro III del Anexo II se señalan los oligonucleótidos empleados en estas clonaciones. [(b) y (c) fueron generados a partir de (a) por M.C. Claudia Villicaña Torres]

IV. Figuras suplementarias

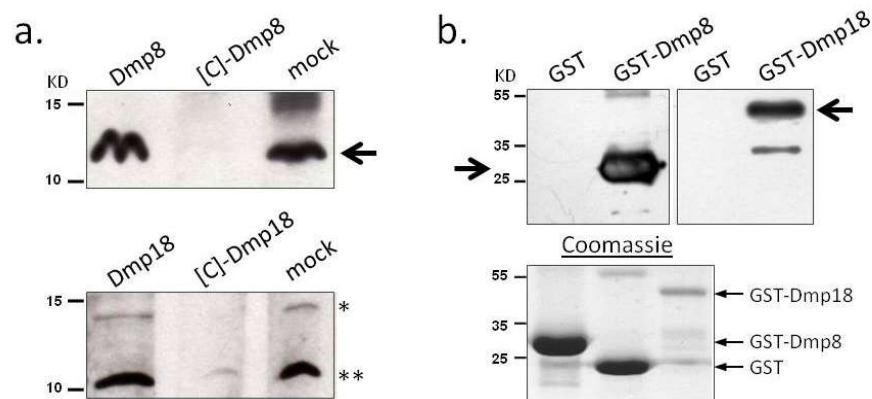


Figura S1. Especificidad de los anticuerpos que reconocen a Dmp8 y Dmp18. (a) La especificidad de los anticuerpos se analizó en un ensayo tipo Western mediante la competencia con el péptido antigénico correspondiente para Dmp8 ([C]-Dmp8) o Dmp18 ([C]-Dmp18), utilizando extractos de proteínas solubles totales obtenidos de moscas adultas de línea silvestre. Como control (mock) se compitió cada anticuerpo con la misma solución que sirvió de disolvente para cada péptido. Nótese que las dos señales reconocidas por el anti-Dmp18 (segundo panel), la que corresponde al tamaño esperado para la proteína (**) y otra de mayor peso molecular (*), fueron competidas. (b) Experimento tipo Western que muestra que los anticuerpos anti-Dmp8 y anti-Dmp18 son capaces de reconocer específicamente a las proteínas de fusión a GST-Dmp8 y GST-Dmp18, respectivamente. Como control se usó a GST. En el panel inferior se muestra la tinción con Coomassie de las proteínas: GST (26 KDa), GST-Dmp8 (34 KDa) y GST-Dmp18 (44 KDa).

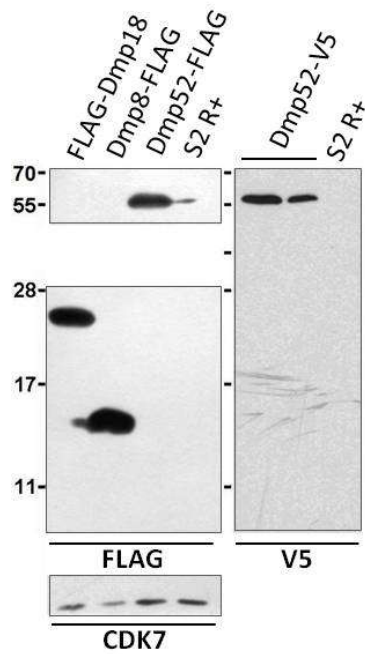


Figura S2. Detección de las proteínas recombinantes de Dmp8 y Dmp18 expresadas en células S2R+. Ensayo tipo Western utilizando los anticuerpos contra las etiquetas FLAG y V5, que confirma la expresión de cada proteína recombinante transfectada independientemente en células S2R+ en cultivo. Como control se utilizaron los extractos de proteínas solubles totales de células S2R+ sin transfectar. CDK7 se usó como control de carga.

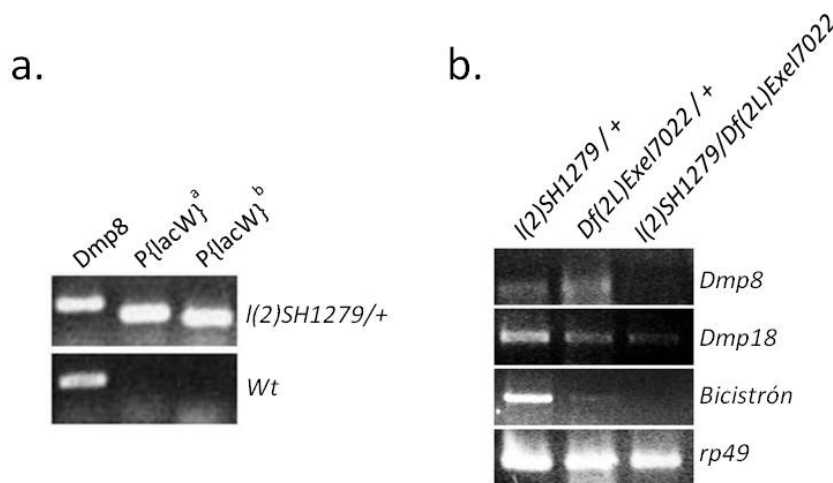


Figura S3. La inserción del elemento P{lacW} en el segundo exón de *Dmp8* impide la expresión del transcrito de *Dmp8* pero no del de *Dmp18*. (a) PCRs sobre DNA genómico que confirma la localización y orientación del elemento P de la línea *I(2)SH1279*. Se emplearon oligonucleótidos que hibridan con el extremo 3' del elemento P y la región 5' del ORF de *Dmp8* para verificar la localización de la inserción (*P{lacW}*); (^a) y (^b) indican el uso de dos pares de oligos distintos. El DNA genómico se aisló de una línea silvestre (Wt) y de adultos heterocigotos *I(2)SH1279/+*. Como control interno se amplificó la secuencia de DNA que corresponde al gen de *Dmp8*. (b) Experimento de RT-PCR a partir de RNA total de adulto que muestra que, a diferencia de los individuos heterocigotos *I(2)SH1279/+* y *Df(2L)Exel7022/+*, en las moscas trans-heterocigotas *I(2)SH1279/Df(2L)Exel7022* no se observa la expresión del mRNA que codifica a *Dmp8* ni al bicistrón, mientras que se produce el transcrito de *Dmp18* (los genotipos se indican en la figura). Este mismo resultado se observó en los sobrevivientes homocigotos *I(2)SH1279* (Figura 11b). Los oligos utilizados pueden amplificar independientemente la región codificante de *Dmp8* o *Dmp18*, o bien, la del bicistrón completo. *rp49* se empleó como control interno.

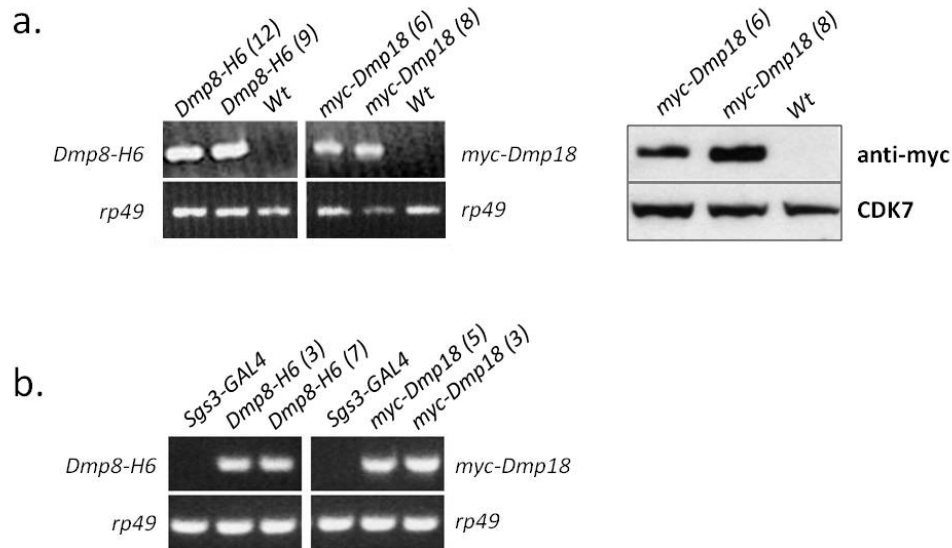


Figura S4. Detección de la expresión de Dmp8-H6 y myc-Dmp18 en moscas transgénicas.

(a) Ensayos de RT-PCR y Western blot donde se determinó la expresión constitutiva de las proteínas recombinantes de Dmp8 y Dmp18 en moscas transgénicas adultas generadas mediante el vector pCaSpeR^{hsp83}. Para las PCRs (panel de la izquierda) se utilizaron oligonucleótidos que hibridan con una región específica del vector de expresión y el extremo 3' de los transgenes de *Dmp8-H6* o *myc-Dmp18*. Como control interno se usó *rp49*. Para la inmunodetección de la proteína myc-Dmp18 (panel de la derecha) en extractos de proteínas solubles totales, se utilizó el anticuerpo contra la etiqueta de c-myc. Cabe mencionar que no fue posible determinar la presencia de Dmp8-H6 porque el anticuerpo que reconoce la etiqueta de 6-histidinas mostró señal inespecífica (datos no mostrados). Como control de carga se usó CDK7. **(b)** RT-PCR que muestra la expresión de los mRNAs de *Dmp8-H6* y *myc-Dmp18* (de moscas transgénicas generadas con el vector pUAST) inducidos por el driver *Sgs3-GAL4* en las glándulas salivales. Los oligos utilizados amplifican los ORFs de cada transgen a partir de la secuencia que codifica las etiquetas. Como control interno se usó *rp49*. En todos los casos, los números entre paréntesis indican el código de la línea transgénica seleccionada.

V. Otros análisis genéticos relacionados con *Dmp8* y *Dmp18*.

a) Análisis de los efectos de RNAi dirigidos contra *Dmp8* y/o *Dmp18*.

Debido a que *Dmp8* y *Dmp18* están codificados en un mismo transcrito y se desconoce el mecanismo a través del cual se regula la traducción de este transcrito bicistrónico, se planeó una estrategia para analizar los efectos de la ausencia sólo de *Dmp8* o sólo de *Dmp18* mediante RNA de interferencia (RNAi). Para ello, además del análisis que se llevó a cabo con la línea transgénica *dsDmp18* (Stock v25909 de la colección VDRC de Vienna) que ya se describió ampliamente en este trabajo, también se caracterizaron líneas de moscas transgénicas, previamente generadas en el laboratorio (Dr. Mario Zurita y Dra. Viviana Valadez Graham), capaces de expresar un RNA de doble cadena (dsRNA), que puede funcionar como precursor del RNAi contra *Dmp8*, *Dmp18* o el RNA que codifica el bicistrón completo *Dmp8-Dmp18*. La inducción de la expresión del RNAi se encuentra bajo la regulación del sistema UAS-GAL4.

La caracterización de estas líneas inició determinando el cromosoma en el que quedó insertada la construcción que codifica para cada dsRNA. Una vez que se mapeó el sitio de inserción, líneas de los distintos RNAi se cruzaron con el driver *MS1096* (que expresa GAL4 en el disco imagal de ala) para evaluar si la falta de *Dmp8* y/o *Dmp18* generaban fenotipos en las alas. En el Cuadro IV se resumen los resultados observados en las líneas analizadas una vez que se indujo el RNAi.

Al observarse que las líneas del RNAi contra *Dmp18* mostraban variegación, lo cual puede significar que la región del DNA en la que se insertó cada transgen podía estar silenciando, se decidió descartar su uso en este ensayo. Del resto de las líneas de RNAi, sólo la No. 214 que lleva un RNAi contra *Dmp8* mostró defectos en las alas cuando se indujo su expresión con el driver *MS1096*. Se encontró un fenotipo semi-rizado (“curly-like”) y en algunos individuos una de las alas estaba torcida (Figura S5) o se generó una ampolla en la parte más distal del ala (datos no mostrados). Debido a que algunos de estos fenotipos son similares a aquéllos previamente observados en las moscas que expresan el RNAi *dsDmp18* (Stock v25909, de la Colección VDRC) donde se determinó que

se redujo el nivel de *Dmp8* y *Dmp18*, es posible que el RNAi 214 contra *Dmp18* (214-*Dmp18i*) también provoque la supresión parcial tanto de *Dmp8* como *Dmp18*. Por ello, sería importante analizar los niveles de expresión de ambos, a nivel de transcrito y de proteína. Asimismo, será necesario determinar si los efectos de este RNAi pueden suprimirse con la sobre-expresión de *Dmp8* y/o *Dmp18*, como se hizo con el RNAi *dsDmp18* (Figura 13 de la sección de Resultados), y evaluar si aparecen nuevos fenotipos, como la extensión de alas.

Cuadro IV. Efectos de la inducción del RNAi contra *Dmp8*, *Dmp18* y el bicistrón *Dmp8-Dmp18* en el ala de las moscas mediante el driver *MS1096*.

RNAi	No. Línea	Comentarios	Fenotipo del RNAi en el ala
Contra <i>Dmp8</i>	204	Homóciga semi-viables. Inserción en cromosoma 3.	Silvestre
	214	Homóciga semi-viables. Inserción en cromosoma 3.	Algunas de las alas presentan arrugas o están torcidas
Contra <i>Dmp8-Dmp18</i>	702	Homóciga viable. Inserción en cromosoma 2.	Silvestre
	708	Homóciga viable. Inserción en cromosoma 2.	Silvestre
Contra <i>Dmp18</i>	603	Muestra variegación. Inserción en cromosoma 3.	(línea descartada)
	608	Muestra variegación. Inserción en cromosoma 3.	(línea descartada)

Este sencillo análisis genético aporta una herramienta complementaria para evaluar la importancia que, como se ha sugerido, tiene la co-regulación de *Dmp8* y *Dmp18* en el adecuado desarrollo del ala de la mosca.

b) Análisis de las posibles interacciones entre *Dmp8-Dmp18* y componentes del complejo TIP60.

En el transcurso de la caracterización de la línea *I(2)SH1279* (la cual lleva una inserción de un elemento P dentro de la secuencia que codifica a *Dmp8*), con la finalidad de determinar si existían interacciones genéticas entre *Dmp8-Dmp18* y otros componentes del complejo TIP60, se llevaron a cabo cruces sencillas entre el alelo

I(2)SH1279 y distintos alelos de *domino* (gen que codifica para la subunidad ATPasa del complejo), distintos alelos de la histona H2Av (única variante de la histona H2A en la mosca) y un alelo de la subunidad YL-1 del complejo TIP60. En el cuadro V se describen el genotipo y otras características de estas líneas, y en el Cuadro VI se resumen los resultados de cada combinación heteroalélica y trans-heteróciga obtenida.

En este análisis genético se corroboró que todas las líneas son inviables como homócigas, excepto la línea *I(2)SH1279* como se mostró previamente en este trabajo. Asimismo, se observó que las combinaciones heteroalélicas de *His2Av*, así como de cualquiera de los alelos *His2Av* con la deficiencia *Df(3R)TI-I*, fueron inviables. Por otro lado, se encontró que los organismos que llevan una copia de *dom*⁹ con una de cualquiera de los otros dos alelos, *dom*³ o *dom*^{k08108}, pueden sobrevivir hasta adulto pero en un porcentaje mucho menor al esperado, y son incapaces de tener prole cuando los adultos de la misma combinación se cruzan entre sí. En el caso de las combinaciones entre el alelo de *dom*⁹ con alelos de *His2Av* o *YL-1*, no se observó ninguna alteración ni en la viabilidad ni en la fertilidad a pesar de que las proteínas codificados por todos ellos son subunidades de un mismo complejo, TIP60. Finalmente, sólo se probó una combinación entre un alelo de *domino* (*dom*⁹) y el de la inserción *I(2)SH1279*, pero no se observó ningún defecto en el desarrollo, viabilidad o fertilidad de los organismos trans-heterócigos adultos. Tampoco se encontró que la inducción ubicua del EP que está insertado en el 5'UTR del bicistrón *Dmp8-Dmp18* ocasionara fenotipo visible alguno, ni alteración en la fertilidad de las moscas.

En resumen, los resultados preliminares de este análisis genético sientan las bases para continuar estudiando la existencia de posibles interacciones genéticas entre componentes del complejo TIP60 y TFIIH, que podrá abordarse desarrollando nuevas estrategias genéticas para recombinar las mutantes de componentes de TIP60 con la inserción *I(2)SH1279* y las mutantes de TFIIH ya caracterizadas en el laboratorio (de las subunidades Dmp52 y DmXPB).

Cuadro V. Líneas de moscas utilizadas para analizar la posible interacción de Dmp8 y Dmp18 con algunos componentes del complejo TIP60.

Colección	Stock	Genotipo	Genes afectados	Descripción
Szeged	SH1279	P{lacW}l(2)SH1279 ^{SH1279} /CyO	<i>Dmp8-Dmp18</i>	Inserción del elemento P en el 2º exón de <i>Dmp8</i>
BDSC	26915	y ¹ w [*] ; P{EP}CG31917 ^{G5894} Tfb5 ^{G5894}		Inserción del elemento P en región 5'-UTR de bicistrón <i>Dmp8-Dmp18</i>
BDSC	9261	y ¹ w [*] ; dom ⁹ /CyO, y ⁺	<i>domino</i>	Alelo hipomorfo de <i>domino</i>
BDSC	9260	y ¹ w [*] ; dom ³ /SM6a		Alelo hipomorfo de <i>domino</i>
BDSC	10767	y ¹ w ^{67c23} ; P{lacW}dom ^{k08108} /CyO		Inserción del elemento P en el límite 3' del 1º exón
Szeged	SH047	P{lacW}l(3)SH047 ^{SH047} /MKRS	<i>His2Av</i>	Inserción del elemento P en región 5'-UTR del gen de <i>His2Av</i>
BDSC	9264	w [*] ; His2Av ⁸¹⁰ /TM3, Sb ¹		Alelo amorfo de <i>His2Av</i>
BDSC	11650	ry ⁵⁰⁶ P{PZ}His2Av ⁰⁵¹⁴⁶ /TM3, ry ^{RK} Sb ¹		Inserción del elemento P en región 5'-UTR del gen de <i>His2Av</i>
BDSC	1911	Df(3R)TI-I, e ¹ /TM3, Ser ¹	<i>His2Av</i> (y otros)	Deficiencia de una región grande del brazo R del cromosoma 3 (Bandas 97B-97E11) que incluye a <i>His2Av</i>
Szeged	SH1685	P{lacW}l(2)SH1685 ^{SH1685} /CyO	<i>YL-1</i>	Inserción del elemento P en el 1º exón

Cuadro VI. Análisis de la supervivencia de diferentes combinaciones entre alelos de *Dmp8-Dmp18*, *domino*, *His2Av* y *YL-1*.

Genotipo	Viabilidad (%)	Fenotipo
<i>dom</i> ⁹ / +	100	Silvestre
<i>dom</i> ³ / +	100	Silvestre
<i>dom</i> ^{k08108} / +	100	Silvestre
<i>His2Av</i> ⁸¹⁰ / +	100	Silvestre
<i>His2Av</i> ⁰⁵¹⁴⁶ / +	100	Silvestre
<i>Df(3R)TI-I, e</i> ¹ / +	100	Silvestre
<i>l(3)SH047</i> / +	100	Silvestre
<i>l(2)SH1685</i> / +	100	Silvestre
<i>l(2)SH1279</i> / +	100	Silvestre
<i>dom</i> ⁹ / <i>dom</i> ³	12	Estériles
<i>dom</i> ⁹ / <i>dom</i> ^{k08108}	36	Estériles
<i>dom</i> ³ / <i>dom</i> ^{k08108}	0	Embrinario letal
<i>l(3)SH047</i> / <i>Df(3R)TI-I, e</i> ¹	0	Embrinario letal
<i>His2Av</i> ⁸¹⁰ / <i>Df(3R)TI-I, e</i> ¹	0	Embrinario letal
<i>His2Av</i> ⁰⁵¹⁴⁶ / <i>Df(3R)TI-I, e</i> ¹	0	Embrinario letal
<i>His2Av</i> ⁸¹⁰ / <i>His2Av</i> ⁰⁵¹⁴⁶	0	Embrinario letal
<i>dom</i> ⁹ / <i>l(2)SH1279</i>	97	Silvestre *
<i>dom</i> ⁹ / <i>l(2)SH1685</i>	85	Silvestre *
<i>dom</i> ⁹ / + ; <i>l(2)SH047</i> / +	74	Silvestre *
<i>P{EP}CG31917</i> ^{G5894} / <i>Act5C-GAL4</i>	100 ¹	Silvestre
<i>P{EP}CG31917</i> ^{G5894} / <i>tubP-GAL4</i>	100 ¹	Silvestre

Todas las cruza se llevaron a cabo a 25°C excepto (¹), las cuales se dejaron a 18°C. Silvestre se refiere a un fenotipo 100% fértil y sin ninguna diferencia física aparente con organismos de línea silvestre *OreR*. (*) indica los genotipos que involucran la presencia de alelos de distintos genes.