



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

TNAa, UNA PROTEÍNA DEL TRXG, INTERACCIONA CON OSA Y CON LA VÍA DE SUMOILACIÓN

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
M. EN C. JUAN LUIS MONRIBOT VILLANUEVA

TUTOR:
DRA. MARTHA VERÓNICA VÁZQUEZ LASLOP
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

COMITÉ TUTOR:
DRA. ROSARIO VERA ESTRELLA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
Dr. JUAN RAFAEL RIESGO-ESCOVAR
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

CUERNAVACA, MORELOS. AGOSTO 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos institucionales

Este trabajo fue realizado en el Instituto de Biotecnología, Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, en el laboratorio 15 del edificio Norte, bajo la tutoría de la Dra. Martha Verónica Vázquez Laslop.

Este trabajo recibió apoyos de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) no. IN208808 e IN202613-3 y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) no. 99654.

Mis estudios doctorales fueron apoyados por una Beca otorgada por el CONACyT no. 18260.

El comité tutorial que asesoró el desarrollo del presente trabajo, estuvo conformado por:

Dra. Martha Verónica Vázquez Laslop

Instituto de Biotecnología, UNAM

Dra. Rosario Vera Estrella

Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. Juan Rafael Riesgo-Escovar

Instituto de Neurobiología, UNAM

Durante el desarrollo de esta tesis, se recibió asesoría por parte del Dr. James A. Kennison, del Dr. Mario Enrique Zurita Ortega y de la Dra. Viviana Valadez Graham.

Durante el desarrollo experimental de esta tesis, se recibió apoyo por parte de la laboratorista María del Carmen Muñoz García.

Agradecimientos

A mi esposa Alma Rosa Altúzar Molina por los momentos compartidos, por el apoyo que siempre me has dado y por la paciencia que me has tenido. Gracias por ser la alegría de mis ojos.

A mi hijo Rafael, gracias por ser y estar con nosotros. Gracias por ser la luz de nuestras vidas.

A mi madre, gracias por que siempre has estado con nosotros, apoyándonos y echándonos porras en los momentos más difíciles.

A la Dra. Martha por todo el apoyo que me dio y por considerarme como un hijo.

Al Dr. Mario por brindarme las facilidades para trabajar en su laboratorio.

A todos los integrantes del laboratorio, los que están y los que estuvieron. Gracias por la amistad y el apoyo que me dieron.

Índice

Resumen	5
Summary	6
Introducción	7
Antecedentes	12
Hipótesis y Objetivo general	18
Resultados	
Publicación en PLoS One: TnaA, an SP-RING protein, interacts with Osa, a subunit of the chromatin remodeling complex BRAHMA and with the SUMOylation pathway in <i>Drosophila melanogaster</i>	19
Búsqueda de proteínas que interaccionen con TnaA por:	
Ensayos tipo “Far Western”	33
Ensayos de doble híbrido de levadura	36
Interacciones genéticas entre <i>tna</i> , <i>osa</i> y genes de la vía de SUMOilación	40
¿TnaA es una E3 ligasa de SUMO?	45
Evaluación de la SUMOilación de Osa _{C2} en presencia de TnaA <i>in vitro</i>	45
Evaluación de la SUMOilación de Osa _{C2} en presencia de TnaA <i>in vivo</i>	51
Evaluación de la SUMOilación de la proteína Scm en fondos mutantes de <i>tna</i>	52
Discusión	55
Conclusiones	62
Perspectivas	63
Bibliografía	64
Anexo I	70
Anexo II	71
Anexo III	76

Resumen

Los genes del grupo trithorax se requieren para mantener en un estado activo la expresión de los genes homeóticos en *Drosophila melanogaster*. A este grupo pertenecen, *tonalli* (*tna*), *brahma* (*brm*) y *osa*. *tna* fue identificado por su interacción genética con *brm* que codifica a la subunidad ATPasa de los complejos remodeladores de la cromatina del tipo BRAHMA (BRM) y con *osa* que codifica a una subunidad exclusiva de uno de los dos tipos de complejos BRM de *D. melanogaster*. Previamente se describió que existen al menos dos isoformas de Tna, TnaA y TnaB. TnaA tiene el dominio XSPRING que contiene un dedo de zinc tipo SP-RING. El SP-RING se ha encontrado exclusivamente en proteínas con actividad de E3 ligasa de SUMO. La SUMOilación es una modificación postraduccional de proteínas que causa cambios en la localización y/o función de las proteínas modificadas. Los datos obtenidos durante mi proyecto de Doctorado muestran la existencia de por lo menos dos proteínas TnaA (TnaA₁₃₀ y TnaA₁₂₃) que se expresan de manera diferencial durante el desarrollo de *D. melanogaster*. Encontramos que TnaA₁₂₃ se localiza en el núcleo mientras que TnaA₁₃₀ está tanto en el núcleo como en el citoplasma de embriones de 3-21 h. Además, más tarde en el desarrollo, en larvas de tercer instar, encontramos que las proteínas TnaA están en los núcleos de las glándulas salivales y de las glándulas protorácicas. En estas últimas se sintetiza la ecdisona que es la hormona clave para la metamorfosis. Las larvas de tercer instar mutantes con niveles disminuidos de TnaA, presentan diferencias en algunas proteínas del perfil soluble total con respecto al presente en larvas silvestres. Además, estas larvas mutantes mueren mayoritariamente en esta etapa con una extensión de vida de este periodo, sin sufrir metamorfosis. De manera interesante encontramos que TnaA se localiza en sitios discretos de la cromatina en los cromosomas politénicos de glándulas salivales de larvas de tercer instar y que en algunos casos colocaliza con Osa. Además demostramos que TnaA interacciona físicamente con Ubc9 que es la enzima E2 conjugante de SUMO y con Osa. Los ensayos de interacción genética en los que se evaluó un fenotipo asociado a la expresión incorrecta del gen homeótico *Antp* nos permitieron demostrar que *tna* y *osa* interaccionan con genes que codifican a componentes de la vía de SUMOilación. También se muestran algunos datos que sugieren la actividad de TnaA como una E3 ligasa de SUMO. En conclusión demostramos que por lo menos hay dos formas de TnaA que debido a su localización y tamaño diferencial podrían tener funciones distintas. Demostramos que las proteínas TnaA están asociadas a la cromatina y que física y funcionalmente interaccionan con componentes de la vía de SUMOilación. Los datos obtenidos nos permiten sugerir que TnaA a través de su posible actividad de E3 ligasa de SUMO podría afectar directa o indirectamente las funciones de las proteínas involucradas en la expresión de los genes homeóticos.

Summary

The trithorax group genes are required to maintain homeotic gene expression in *Drosophila melanogaster*. *tonalli* (*tna*), *brahma* (*brm*) and *osa* belong to this group. *tna* was identified by its genetic interaction with *brm* which encodes the ATPase subunit of the BRAHMA (BRM) chromatin-remodeling complexes and with *osa* which encodes a subunit that is exclusively found in one of the two types of BRM complexes in *D. melanogaster*. Previously it was described that there are at least two Tna isoforms, TnaA and TnaB. TnaA harbors an XSPRING domain, which contains an SP-RING zinc finger. The SP-RING finger has been exclusively found in proteins with SUMO E3 ligase activity. SUMOylation is a posttranslational modification that changes the location and/or the function of the modified proteins. Data obtained during my PhD project show the existence of at least two TnaA proteins (TnaA₁₃₀ and TnaA₁₂₃) that are differentially expressed along *D. melanogaster* development. We found that TnaA₁₂₃ is located in the nucleus while TnaA₁₃₀ is in the nucleus and in the cytoplasm of 3-21 h embryos. Later in development, in third instar larvae, we found that TnaA proteins are also nuclear in salivary and prothoracic glands. In the latter ones, ecdysone is synthesized which is a key hormone for metamorphosis. Mutant third instar larvae with low TnaA levels have differences in some proteins of the total soluble profile with respect to the one found in wild type larvae. Besides, most of these mutant larvae die at this stage with an extension of the life span in this period without suffering metamorphosis. Interestingly we found that TnaA is chromatin-associated at discrete sites on polytene salivary gland chromosomes of third instar larvae and in some cases it colocalizes with Osa. We demonstrated that TnaA physically interacts with Ubc9 which is the SUMO E2 conjugating enzyme and with Osa. Through genetic interaction assays, where we evaluated a phenotype associated to the misexpression of the homeotic gene *Antp*, we show that *tna* and *osa* genetically interacts with genes that encode proteins involved in the SUMOylation pathway. We also show some data suggesting TnaA SUMO E3 ligase activity. In conclusion we demonstrate that there are at least two TnaA proteins that due their differential location and size could be involved in different functions. We demonstrated that the TnaA proteins are chromatin-associated and that they interact physically and functionally with SUMO pathway components. The data suggest that TnaA through its putative SUMO E3 ligase activity could be affecting directly or indirectly the functions of proteins involved in homeotic gene expression.

Introducción

Los genes homeóticos

Durante la embriogénesis, el embrión de *Drosophila melanogaster* se divide en 14 parasegmentos, los cuales formarán los tres segmentos de la cabeza, los tres segmentos torácicos y los ocho segmentos abdominales de una mosca adulta (Figura 1). La identidad diferencial de cada segmento del cuerpo de *D. melanogaster* se determina por los genes homeóticos también llamados “selectores”, los cuales se encuentran en dos complejos. El complejo Antennapedia está formado por cinco genes [*labial (lab)*, *proboscipedia (pb)*, *Deformed (Dfd)*, *Sex combs reduced (Scr)* y *Antennapedia (Antp)*] que se encuentran ordenados en tándem en el cromosoma 3. Estos genes son necesarios para el desarrollo de la cabeza y de los dos primeros segmentos torácicos (Figura 1) (Kaufman *et al.*, 1980). El complejo bithorax está formado por tres genes [*Ultrabithorax (Ubx)*, *abdominal-A (abd-A)* y *Abdominal-B (Abd-B)*] ordenados en tándem en el cromosoma 3, los cuales están comprometidos con el desarrollo del tercer segmento torácico y de todos los segmentos abdominales (Lewis, 1978). Los genes homeóticos codifican factores transcripcionales que regulan la transcripción de otro grupo de genes llamados “realizadores”, que pueden ser: a) genes que codifican proteínas efectoras que están directamente involucradas en procesos como la morfogénesis, la mitosis y la adhesión célula a célula, entre otros, b) genes que codifican factores transcripcionales que regulan la expresión de otros genes y c) genes que codifican proteínas involucradas en las vías de transducción de señales (revisado en Graba *et al.*, 1997).

Regulación de la expresión de los genes homeóticos

En un principio se pensó que varias mutaciones que resultaban en distintos fenotipos homeóticos correspondían a lesiones en diferentes genes homeóticos. Estudios moleculares posteriores demostraron que muchas de esas mutaciones correspondían a lesiones en elementos que regulan la expresión de los genes homeóticos en el espacio y el tiempo. Funcionalmente, los elementos regulatorios que se conocen más, son los iniciadores y los de mantenimiento. A los elementos iniciadores se unen factores involucrados en la expresión inicial de los genes homeóticos, los cuales

son codificados por los genes de herencia materna y por los genes de segmentación (revisado en Maeda y Karch, 2006). Los genes de segmentación se dividen en genes “gap”, genes “pair-rule” y genes “segment-polarity”. Básicamente, las proteínas codificadas por los genes de herencia materna establecen los ejes antero-posterior y dorso-ventral del embrión. Posteriormente, las proteínas codificadas por el grupo de genes “gap” subdividen al embrión en regiones mientras que las codificadas por el grupo de genes “pair-rule” especifican el número de segmentos. Después, las proteínas codificadas por el grupo de genes “segment-polarity” determinan la polaridad antero-posterior de cada segmento y finalmente los genes homeóticos establecen la identidad de cada segmento (revisado en Akam, 1987). Muchas de las proteínas antes mencionadas son factores transcripcionales que van a establecer los dominios de expresión de los genes homeóticos.

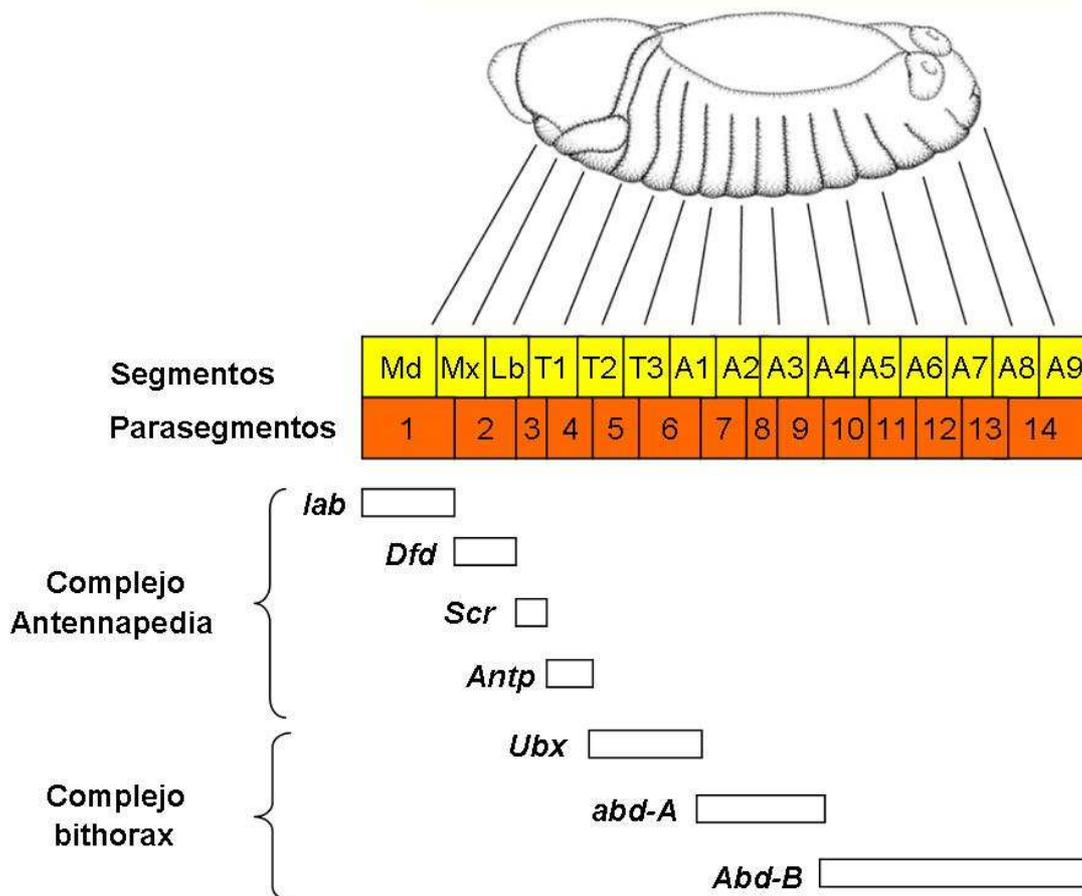


Figura 1: Expresión de genes homeóticos en el embrión de *D. melanogaster*. En la parte superior se indican los segmentos Mandibular (Md), Maxilar (Mx), Labial (Lb), los segmentos torácicos T1, T2 y T3 y los segmentos abdominales (A1 a A9) así como los parasegmentos (1-14) en los que se divide un embrión con aproximadamente 320 min de desarrollo. En la parte inferior se muestran los genes homeóticos de los complejos Antennapedia y bithorax que determinan la identidad de cada parasegmento (imagen modificada de Maeda y Karch, 2006).

Dentro de los elementos de mantenimiento están los llamados PREs/TREs (“Polycomb Response Elements/trithorax Response Elements”) a los que se les unen factores involucrados en mantener en un estado reprimido o activo la expresión de los genes homeóticos (revisado en Maeda y Karch, 2006). Las proteínas del PcG (“Polycomb Group”) mantienen en un estado reprimido la expresión de los genes homeóticos y de otros genes durante el desarrollo. Muchas de las proteínas del PcG son subunidades de complejos multiméricos que regulan la expresión génica a través del control de la estructura de la cromatina, principalmente mediante la modificación postraduccional de las histonas (revisado en Müller y Verrijzer, 2009). Algunos miembros del PcG están asociados a los PREs, que son sitios para el ensamblaje de los complejos Polycomb (revisado en Müller y Kassis, 2006). Por otro lado, las proteínas del trxG (“trithorax Group”) se requieren para mantener en un estado activo la expresión de los genes homeóticos y de otros genes durante el desarrollo. Las proteínas del trxG tienen funciones heterogéneas y algunos miembros del grupo se encuentran asociados en complejos multiméricos que controlan la transcripción de los genes mediante la regulación de la estructura de la cromatina, como es el caso de algunas subunidades de los complejos BRAHMA y COMPASS (revisado en Kennison, 2004 y en Shilatifard, 2012). En *D. melanogaster*, algunas proteínas del trxG están asociadas a los TREs, pero muchas otras no, lo cual es de esperarse si se toma en cuenta las distintas funciones en las que participan los miembros del trxG (ver más adelante). Los TREs, a diferencia de los PREs, se han estudiado menos y aun está en debate la existencia de los mismos. Los TREs identificados al momento coinciden frecuentemente con los PREs (revisado en Schuettengruber *et al.*, 2011).

Otros elementos regulatorios que también se han identificado son: a) aquellos que actúan como “enhancers” (elementos que aumentan la expresión de genes) específicos de células o tejidos que permiten la expresión diferencial de los genes homeóticos en grupos de células o tejidos dentro de un parasegmento, b) aquellos que participan como “insulators” (elementos que modulan la función de un “enhancer”) y que sirven como límites entre los elementos regulatorios adyacentes, d) los llamados PTS (“Promoter-Targeting Sequence”) los cuales son regiones que permiten que ciertos “enhancers” localizados lejos del promotor puedan ejercer su función a pesar de haber regiones regulatorias intermedias (revisado en Maeda y Karch, 2006) y e) los MES (“Maintenance Elements for Silencing”) los cuales al parecer son importantes para mantener las interacciones entre PREs adyacentes (Southworth y Kennison, 2002).

Los elementos regulatorios más estudiados son aquellos que regulan la expresión de los genes homeóticos del complejo bithorax (Figura 1). En el gen *Ubx*, los elementos *abx/bx* se encuentran dentro de un intrón y regulan la expresión de este gen homeótico en el parasegmento 5, mientras que los elementos *pbx/bxd* se localizan río arriba del inicio de la transcripción y regulan la expresión de *Ubx* en el parasegmento 6 (revisado en Maeda y Karch, 2006). La expresión de *abd-A* en los parasegmentos 7, 8 y 9 es regulada por los elementos *iab-2*, *iab-3* y *iab-4*, respectivamente (revisado en Maeda y Karch, 2006). El elemento *iab-2* se encuentra dentro del cuerpo del gen mientras que *iab-3* y *iab-4* se localizan río arriba del inicio de la transcripción (revisado en Maeda y Karch, 2006). Los elementos *iab-5*, *iab-6*, *iab-7* y *iab-8* regulan la expresión de *Abd-B* en los parasegmentos 10, 11, 12, 13 y 14, respectivamente (revisado en Maeda y Karch, 2006). *iab-5*, *iab-6*, *iab-7* se encuentran río abajo de *Abd-B*. *iab-8* se localiza antes del inicio de la transcripción hasta el final del cuerpo del gen (revisado en Maeda y Karch, 2006). También se han identificado elementos regulatorios de la expresión de los genes homeóticos del complejo Antennapedia pero éstos han sido menos estudiados (*Scr*, Gorman y Kaufman, 1995, Southworth y Kennison, 2002; *lab*, Chouinard y Kaufman, 1991; *pb*, Kapoun y Kaufman, 1995; *Dfd*, Bergson y McGinnis, 1990; *Antp*, Boulet y Scott, 1988).

La expresión de los genes homeóticos, además de los factores y elementos antes mencionados, también requiere de la maquinaria de transcripción y de remodeladores y modificadores de la cromatina, las cuales son maquinarias que a través de alterar la conformación de los nucleosomas, favorecen o impiden el acceso de las proteínas correspondientes a sus secuencias blanco. Estas pueden ser los elementos regulatorios mencionados con anterioridad o los promotores por ejemplo. Algunos complejos remodeladores de la cromatina están involucrados en facilitar el avance de la ARN Pol II durante la fase de elongación en la transcripción de los genes homeóticos (Armstrong *et al.*, 2002). La transcripción de genes en general es un proceso altamente regulado en sus distintas etapas. El inicio de la transcripción de genes, por la ARN Pol II, requiere de varios complejos de proteínas como los factores basales de la transcripción TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF y TFIIH, cuya función es importante en la formación del complejo de preiniciación y en el inicio de la transcripción en cada promotor (revisado en Sikorski y Buratowski, 2009). TFIID y TFIIB tienen un papel importante, ya que a través de las interacciones entre sus subunidades con el ADN permiten el reconocimiento de los promotores y participan en el reclutamiento de la ARN pol II. TFIIA promueve la unión de TFIID al ADN, mientras que TFIIE, TFIIF y TFIIH participan en el desenrollamiento del ADN y en los primeros pasos del inicio de la transcripción del ADN (revisado en Sikorski y Buratowski, 2009). El complejo de

proteínas MEDIADOR sirve como puente entre la maquinaria basal de la transcripción y distintos factores regulatorios (revisado en Taatjes, 2010). Una vez iniciada la transcripción, la ARN pol II es detenida cerca del sitio de inicio de la transcripción por la acción de factores negativos de la elongación como NELF (“NEgative Elongation Factor”) y se requiere de otros factores como P-TEFb (“Positive-Transcription Elongation Factor b”) para liberar a la ARN Pol II de su estado pausado y permitir que se lleve a cabo la etapa de elongación. En la formación de un ARN mensajero procesado se requiere de varios factores más, involucrados en el “capping” del extremo 5’, en el “splicing” diferencial y en la poliadenilación del extremo 3’ (revisado en Zhou *et al.*, 2012).

Durante la formación del complejo de preiniciación, los elementos regulatorios contenidos en los promotores tienen un papel importante en la regulación de la expresión de los genes. Todos los promotores de los genes homeóticos carecen de la caja TATA, el cual es un elemento localizado entre las posiciones -30 a -31 respecto al sitio de inicio de la transcripción. La caja TATA en *D. melanogaster* corresponde a la secuencia TATAWAAR y es reconocida por TBP (“TATA Binding Protein”), que es una subunidad de TFIID (revisado en Juven-Gershon y Kadonaga, 2010). Con excepción de *Ubx* y *abd-A*, todos los promotores de los genes homeóticos presentan un elemento localizado entre las posiciones +28 a +33 respecto al sitio de inicio de la transcripción llamado DPE (“Downstream core Promoter Element”) (revisado en Juven-Gershon y Kadonaga, 2010). En *D. melanogaster* el elemento DPE, cuya secuencia consenso es RGWYV (Gershenzon *et al.*, 2006), consiste en un sitio de unión para dos subunidades del factor TFIID, TAF_{II}60/TAF6 y TAF_{II}40/TAF9 (Burke y Kadonaga, 1997).

Entre las proteínas que regulan la expresión de genes con promotores con caja DPE en *D. melanogaster* se encuentra un circuito formado por TBP, NC2 y Mot1, en donde TBP activa la transcripción a partir de promotores con caja TATA y reprime la transcripción a partir de promotores con DPE (Hsu *et al.*, 2008). Para que ocurra la transcripción a partir de promotores con DPE, se requiere de la acción de Mot1 y NC2, ya que entre ambas bloquean la función de TBP (Hsu *et al.*, 2008). Caudal es una proteína de herencia materna que participa en el establecimiento del eje antero-posterior en etapas tempranas del embrión de la mosca (revisado en Akam, 1987) y favorece la transcripción de genes homeóticos que tienen el elemento DPE en sus promotores (Juven-Gershon *et al.*, 2008). Caudal también se requiere para la regulación de la expresión de los genes homeóticos en el ratón (Charité *et al.*, 1998) y en el pez cebra (Davidson y Zon, 2006).

Antecedentes

Diversos grupos de investigación a través de análisis genéticos, han encontrado que subunidades de los complejos remodeladores del tipo BRAHMA (BRM) juegan un papel esencial para contener con el bloqueo de la transcripción y la regulación de la expresión de los genes homeóticos impuesta por los nucleosomas en *D. melanogaster* (Kennison y Tamkun, 1988; Papoulas *et al.*, 1998; Armstrong *et al.*, 2002; Chalkley *et al.*, 2008). En 1990, Vázquez y Kennison llevaron a cabo un tamizaje genético para buscar genes cuyos productos influyeran en la acción de la ATPasa Brahma (Brm) para facilitar la transcripción de los genes homeóticos. En este tamizaje se identificó a *tonalli* (*tna*) que es el gen que codifica a las proteínas Tna, objeto de este trabajo. A continuación se resume lo que hoy sabemos de los complejos BRM, de las proteínas Tna y de la SUMOilación, que es la modificación enzimática en la que podría estar participando algunas de las proteínas Tna.

Los complejos BRAHMA

En *D. melanogaster* Brm, Moira (Mor) y Snf5-related 1 (Snr1) son miembros del *trxG* (Kennison y Tamkun, 1988; Papoulas *et al.*, 1998) que forman parte de los complejos remodeladores de la cromatina del tipo SWI/SNF llamados BAP (“Brahma Associated Proteins”) y PBAP (“Polybromo-associated BAP”) (Chalkley *et al.*, 2008). Osa también pertenece al *trxG* (Kennison y Tamkun, 1988) y es una subunidad exclusiva de BAP (Mohrmann *et al.*, 2004). Los complejos del tipo SWI/SNF en *D. melanogaster* contienen de 8 a 11 subunidades (Figura 2). El ortólogo en humano de Brm, la subunidad con actividad de ATPasa, puede remodelar la cromatina *in vitro* por sí misma (Phelan *et al.*, 1999). La adición de las subunidades ortólogas humanas de Mor y Snr1 resulta en una actividad remodeladora *in vitro* comparable a la observada cuando está presente todo el complejo (Phelan *et al.*, 1999). Esto último sugiere que las otras subunidades son requeridas para mantener la estabilidad del complejo y/o participan en la identificación de los promotores (ver: Vázquez *et al.*, 1999; Marena *et al.*, 2004). Los complejos remodeladores de la cromatina del tipo SWI/SNF pueden remodelar la cromatina mediante: a) el deslizamiento de nucleosomas, en el cual la posición del nucleosoma en el ADN cambia, b) la disociación completa entre las histonas y el ADN, c) la formación de dinucleosomas y d) la formación de un estado remodelado del nucleosoma en el cual el ADN está más accesible a pesar de la presencia de histonas (revisado en Martens y Winston, 2003).



Figura 2: Complejos PBAP y BAP de *D. melanogaster*. Esquema de los complejos PBAP y BAP. Las subunidades comunes se muestran en color azul, mientras que las subunidades específicas de PBAP y BAP se muestran en color rojo y verde, respectivamente (revisado en Chalkley *et al.*, 2008).

Los complejos BAP/PBAP en *D. melanogaster* están asociados a sitios de la cromatina que son transcripcionalmente activos y su función es necesaria para la asociación de la ARN pol II a los cromosomas (Armstrong *et al.*, 2002), en la elongación de la transcripción (Zraly y Dingwall, 2012) y tanto en la mosca como en humano, en la regulación del “splicing” alternativo del ARNm (Batsché *et al.*, 2005; Tyagi *et al.*, 2009; Zraly y Dingwall, 2012). En contraste también se ha observado que BAP se requiere en algunos casos para la represión de la expresión de algunos genes (Collins y Treisman, 2000). El hecho de que los complejos BRAHMA y SWI/SNF participan en la activación y la represión de la transcripción se puede deber a la asociación temporal de proteínas al complejo remodelador, pero al parecer el principio común es que la remodelación de la cromatina permite o no, el acceso de otros complejos enzimáticos al ADN (revisado en Martens y Winston, 2003).

Tonalli

Como se mencionó, *tna* se identificó como un gen que interacciona con *brm* que codifica a la ATPasa Brm de los complejos BRM (Gutiérrez *et al.*, 2003). *tna*, como miembro del *trxG*, se requiere para la expresión correcta de los genes homeóticos *Antp*, *Ubx*, *Scr* (Gutiérrez *et al.*, 2003) y *Abd-B* (comunicación personal del Dr. J. A. Kennison) y la falta de función de *tna* suprime la falta de función del PcG (Gutiérrez *et al.*, 2003). El análisis de los transcritos de *tna* durante el desarrollo indicó que *tna* codifica al menos dos isoformas, una grande llamada TnaA y una pequeña llamada TnaB (Figura

3A) (Gutiérrez *et al.*, 2003). TnaA se obtiene a partir de la traducción de diez exones del ARN mensajero. Ambas proteínas (TnaA y TnaB) comparten el extremo amino y el carboxilo. En la isoforma pequeña (TnaB) no están presentes los exones 5-8. Por otro lado, los análisis de predicciones bioinformáticas y de las secuencias EST (“Expressed Sequence Tags”) realizadas por el análisis de los genes codificados por el genoma de *D. melanogaster* y que están depositados en la base de datos del Flybase, indican que podría haber por lo menos tres isoformas de TnaA nombradas isoformas A, B y D (B y D con mayor probabilidad que A) (Figura 3B) (McQuilton *et al.*, 2012). Las isoformas A y B de TnaA tienen aminoácidos extra en el extremo amino. La isoforma D de TnaA es la isoforma cuya secuencia fue reportada previamente por nuestro laboratorio (Gutiérrez *et al.*, 2003) y en esta tesis siempre que se mencione TnaA nos estaremos refiriendo a esta isoforma.

Al evaluar la expresión de los ARN mensajeros (ARNm) de las isoformas codificadas por *tna* durante las fases de desarrollo se encontró que *tnaA* está presente desde las fases embrionarias, pasando por los estadios larvarios (primer, segundo y tercer instar) hasta las etapas de pupa y adulto. Sin embargo, la expresión del ARNm que codifica para TnaA no es constante sino que se observó un aumento continuo, alcanzando los niveles más altos en las etapas de pupa y adulto (Gutiérrez *et al.*, 2003). Por otro lado, el ARNm que codifica para TnaB se detecta a partir de la etapa larvaria del tercer instar y presenta niveles de expresión más altos en las etapas de pupa y adulto (Gutiérrez *et al.*, 2003). Los estudios en etapas embrionarias muestran que la expresión de *tna* se induce en las últimas etapas de la celularización (Pilot *et al.*, 2006) y que se expresa de manera diferencial en la cabeza embrionaria (Brody *et al.*, 2002). Los individuos con alelos mutantes de *tna* se mueren en estadios postembrionarios (Deak *et al.*, 1997; Gutiérrez *et al.*, 2003).

TnaA y TnaB presentan en el extremo amino dos dominios ricos en glutaminas (Figura 3A). TnaA tiene en la parte central un dominio de 300 aminoácidos denominado XSPRING (eXtended SP-RING) (Figura 3A) que está presente en algunas proteínas de organismos eucariontes multicelulares, entre las cuales se encuentran las proteínas humanas hZimp7 y hZimp10 (Sharma *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2005a). Dentro del XSPRING, TnaA contiene una señal bipartita de localización nuclear y un dedo de zinc característico de un tipo de E3 ligasas de SUMO (Small Ubiquitin-related MODifier) conocido como SP-RING {Siz/PIAS (Protein Inhibitors of Activated STAT [Signal Transducers and Activator of Transcription])–RING (Really Interesting New Gene)}. El SP-RING consta de 40 aminoácidos y está conservado desde levadura hasta plantas angiospermas y mamíferos (revisado en Geiss-Friedlander y

vertebrados hay más de un gen (revisado en Geiss-Friedlander y Melchior, 2007). La SUMOilación está conservada entre los eucariontes y tiene un papel importante durante el desarrollo (revisado en Lomelí y Vázquez, 2011). El mecanismo de modificación postraducciona l de proteínas y las consecuencias a nivel molecular se explican en la Figura 4.

La vía de SUMOilación se ha relacionado con diferentes procesos celulares que tienen lugar en el núcleo y/o en el citoplasma. Ejemplos de estos procesos son la muerte celular programada, el mantenimiento de la integridad y la estructura del genoma, la fusión y la fisión de mitocondrias, la progresión en el ciclo celular, la expresión génica, la transducción de señales, el metabolismo y el transporte de iones (revisado en Geiss-Friedlander y Melchior, 2007). La mosca tiene la maquinaria de SUMOilación y en este organismo se ha demostrado que esta modificación postraducciona l es importante durante la embriogénesis, en el desarrollo del sistema nervioso, en la respuesta inmune, en la metamorfosis, en la regulación transcripcional de genes, entre otros (revisado en Talamillo *et al.*, 2008a y en Lomelí y Vázquez, 2011). La presencia del dominio SP-RING en TnaA sugería fuertemente que podría estar relacionada con la vía de SUMOilación como una E3 ligasa de SUMO.

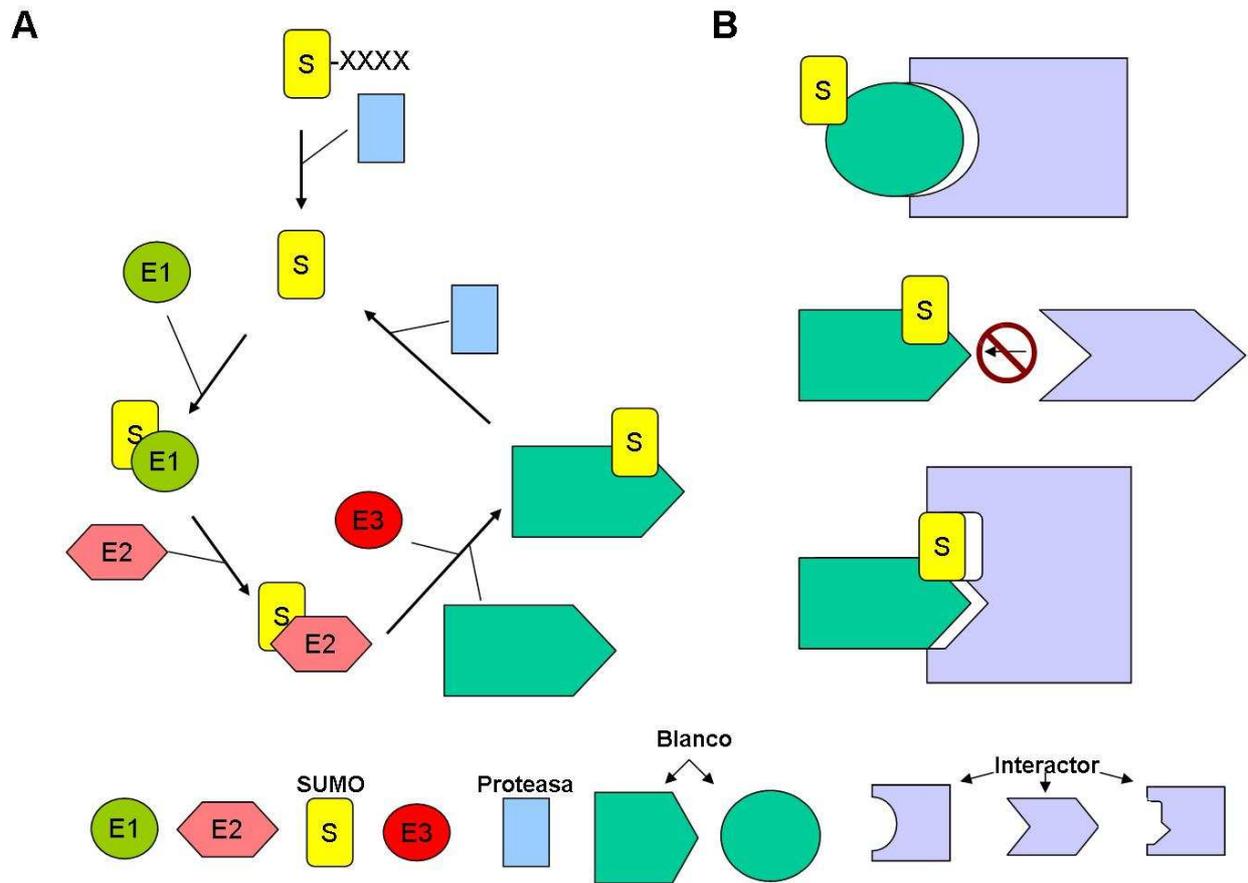


Figura 4: La vía de SUMOilación y sus consecuencias moleculares. **A.** La SUMOilación requiere de la participación concertada de varias proteínas: SUMO inmaduro se procesa por una proteasa de la familia Ulp/SENp (“Ubiquitin-Like Processing enzymes/SENtrin-specific Proteases). Después, la enzima activadora denominada E1 (heterodímero Aos1-Uba2), genera un SUMO maduro adenilado y cataliza la formación de un enlace tioéster entre SUMO y E1. Posteriormente SUMO se transfiere a la enzima conjugante E2 (también llamada Ubc9), la cual es la que propiamente realiza la transferencia de SUMO a las proteínas blanco. En muchos casos aunque no siempre, una E3 ligasa de SUMO favorece el proceso, ya sea al estimular la actividad de E2 o al facilitar la formación del complejo E2-proteína blanco. Finalmente, las proteasas de la familia Ulp/SENp hacen el proceso reversible (revisado en Geiss-Fiedlander y Melchior, 2007). **B.** De manera general, la SUMOilación de proteínas puede cambiar la estructura de una proteína (panel superior), bloquear un sitio de interacción (panel medio) o crear uno nuevo (panel inferior) (revisado en Geiss-Fiedlander y Melchior, 2007).

Hipótesis

La proteína TnaA es una E3 ligasa de SUMO encargada de promover la SUMOilación de algunas proteínas codificadas por los genes con los que interacciona genéticamente u otros y dicha actividad se requiere en la regulación de la expresión de los genes homeóticos.

Objetivo

Encontrar proteínas que interaccionan físicamente con los diferentes dominios de TnaA, investigar si TnaA es una E3 ligasa de SUMO y determinar si interacciona genéticamente con la vía de SUMOilación.

Resultados

Como primer resultado de este trabajo se incluye el artículo publicado en la revista PLoS One que se anexa a continuación.

Monribot-Villanueva J, Juárez-Uribe RA, Palomera-Sánchez Z, Gutiérrez-Aguiar L, Zurita M, Kennison JA, Vázquez M. 2013. TnaA, an SP-RING protein, interacts with Osa, a subunit of the chromatin remodeling complex BRAHMA and with the SUMOylation pathway in *Drosophila melanogaster*. PLoS One 8:p. e62251.

TnaA, an SP-RING Protein, Interacts with Osa, a Subunit of the Chromatin Remodeling Complex BRAHMA and with the SUMOylation Pathway in *Drosophila melanogaster*

Juan Monribot-Villanueva¹, R. Alejandro Juárez-Uribe¹, Zoraya Palomera-Sánchez¹, Lucía Gutiérrez-Aguiar¹, Mario Zurita¹, James A. Kennison², Martha Vázquez^{1*}

1 Departamento de Fisiología Molecular y Genética del Desarrollo, Instituto de Biotecnología-Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México, **2** Program in Genomics of Differentiation, Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, United States of America

Abstract

Tonalli A (TnaA) is a *Drosophila melanogaster* protein with an XSPRING domain. The XSPRING domain harbors an SP-RING zinc-finger, which is characteristic of proteins with SUMO E3 ligase activity. TnaA is required for homeotic gene expression and is presumably involved in the SUMOylation pathway. Here we analyzed some aspects of the TnaA location in embryo and larval stages and its genetic and biochemical interaction with SUMOylation pathway proteins. We describe that there are at least two TnaA proteins (TnaA₁₃₀ and TnaA₁₂₃) differentially expressed throughout development. We show that TnaA is chromatin-associated at discrete sites on polytene salivary gland chromosomes of third instar larvae and that *tna* mutant individuals do not survive to adulthood, with most dying as third instar larvae or pupae. The *tna* mutants that ultimately die as third instar larvae have an extended life span of at least 4 to 15 days as other SUMOylation pathway mutants. We show that TnaA physically interacts with the SUMO E2 conjugating enzyme Ubc9, and with the BRM complex subunit Osa. Furthermore, we show that *tna* and *osa* interact genetically with SUMOylation pathway components and individuals carrying mutations for these genes show a phenotype that can be the consequence of misexpression of developmental-related genes.

Citation: Monribot-Villanueva J, Juárez-Uribe RA, Palomera-Sánchez Z, Gutiérrez-Aguiar L, Zurita M, et al. (2013) TnaA, an SP-RING Protein, Interacts with Osa, a Subunit of the Chromatin Remodeling Complex BRAHMA and with the SUMOylation Pathway in *Drosophila melanogaster*. PLoS ONE 8(4): e62251. doi:10.1371/journal.pone.0062251

Editor: Sue Cotterill, St. Georges University of London, United Kingdom

Received: December 13, 2012; **Accepted:** March 19, 2013; **Published:** April 19, 2013

This is an open-access article, free of all copyright, and may be freely reproduced, distributed, transmitted, modified, built upon, or otherwise used by anyone for any lawful purpose. The work is made available under the Creative Commons CC0 public domain dedication.

Funding: This work was supported by funds from Dirección General Asuntos del Personal Académico (DGAPA) grant IN208808 (<http://dgapa.unam.mx/html/papiit/papit.html>), and Consejo Nacional Ciencia y Tecnología (CONACYT) grant 99654 (<http://www.conacyt.gob.mx>) to M. V. and in part by the Intramural Research Program of the United States National Institutes of Health, National Institute of Child Health and Human Development (NICHD) (<http://dir.nichd.nih.gov/dirweb/home.html>). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: mvazquez@ibt.unam.mx

Introduction

SUMOylation is a post-translational protein modification that can change the location, stability, activity or the interactions of the protein targets involved in many cellular processes, including cell death, cell cycle, signal transduction, and gene expression [1]. SUMOylation is the addition of SUMO (Small Ubiquitin-related MOdifier) to lysine residues of the target protein in the consensus amino acid sequence ΨKxE (Ψ represents a hydrophobic amino acid) [2]. Hundreds of proteins are SUMOylated in *Drosophila* [3]. The SUMOylation pathway starts with processing of an immature SUMO protein by the Ulp/SENp family of proteases. Next, the activating enzyme E1 (an Aos1/Uba2 heterodimer) generates a mature SUMO-adenylate intermediary which then forms a thioester bond between the catalytic cysteine of Uba2 and SUMO. SUMO is next transferred to the E2 conjugating enzyme (Ubc9), which transfers SUMO to the target proteins. The SUMO E3 ligases function by stimulating the activity of Ubc9 or by facilitating the formation of an Ubc9-substrate complex. Finally,

proteins of the Ulp/SENp family proteases make this whole process reversible [4].

The *tna* gene was identified in a genetic screen designed to find *brahma* (*brm*)-interacting genes [5]. *brm* encodes the SNF2 type-ATPase of the BRM chromatin remodeling complexes [6,7]. The *osa* gene encodes an exclusive subunit of one type of BRM complexes [6,8,9]. Besides interacting with *brm*, *tna* interacts even stronger with *osa*. All three genes (*brm*, *osa*, and *tna*) are required for proper expressions of the homeotic genes [5]. Homeotic genes determine the identity of body segments in *Drosophila* [10,11].

The role of various components of the SUMOylation pathway have been studied in *Drosophila* development [12,13]. *tna* is involved in homeotic gene expression but little is known about the proteins encoded by this locus. *tna* expresses a at least one putative isoform called TnaA [5]. This isoform has an XSPRING (eXtended SP-RING) domain that harbors a zinc finger of the SP-RING type {Siz/PIAS (Protein Inhibitors of Activated STAT [Signal Transducers and Activator of Transcription])–RING (Really Interesting New Gene)}. This zinc finger is present in

one of the four major groups of proteins that have SUMO E3 ligase activity [1]. The only SP-RING finger proteins with putative SUMO E3 ligase activity that have been identified in the *Drosophila* proteome are Su(var)2–10 [14] and TnaA [5].

Here we show that TnaA physically interacts with both Ubc9 (the SUMO E2 conjugating enzyme) and with Osa (a putative *in vivo* target). We determined the dynamics of different TnaA species throughout development and showed that TnaA is an embryonic nuclear protein and is also present at discrete bands on polytene salivary gland chromosomes of third instar larvae. We also found that defects in *tna* cause larval lethality, abnormalities in the whole protein profile and an extension of the lifespan at this stage. Finally, we found genetic interactions between *tna* and *osa* and genes encoding the SUMOylation pathway components.

Materials and Methods

Ethics Statement

All animal handling was approved by the Instituto de Biotecnología Bioethics Committee, Permit Number 226 (2009/12/04), which follows NOM-062 animal welfare mexican law. All efforts were made to minimize animal suffering. Animals were sacrificed by CO₂ euthanasia.

Protein Extraction and Analyses

Soluble protein extracts for the developmental Western were obtained from 1 g of Ore-R individuals from each developmental stage with Trizol (Invitrogen). For cellular localization of the TnaA proteins, soluble nuclear (SNF) and cytoplasmic fractions were obtained from Ore-R embryo collections of 3–21 hour postfertilization [15]. The SNF was also used for the TnaA coimmunoprecipitation (Co-IP) assays. For Osa Co-IP assays, a total soluble protein fraction was obtained from Ore-R embryo collections of 3–21 hour postfertilization [16]. Protein extracts from salivary glands of third instar larvae were obtained by collecting the glands in PBS buffer plus Complete protease inhibitors [EDTA-free protease inhibitor tablet (ROCHE)], and boiling them for 5 minutes in sample loading buffer. The proteins were separated by SDS-PAGE and electrotransferred to nitrocellulose membranes for Western blot analyses. Immunoblots were done according to standard procedures and proteins of interest were detected with specific antibodies using different chemoluminescence kits (Super-signal West Pico Chemiluminescent Substrate from Thermo scientific, ECL Plus Western Blotting Detection System or ECL Advanced Western Blotting Detection kit from Amersham, GE Healthcare, USA), according to manufacturers instructions.

Affinity-purified primary TnaA^{NH2} and TnaA^{XSPRING} antibodies were used at a 1:100 dilution. Anti-β-tubulin (E7, Developmental Studies Hybridoma Bank) and anti-Osa (Developmental Studies Hybridoma Bank) were used at 1:3000 and 1:1000 dilutions, respectively. The antibodies anti-Cdk7 (ds17, Santa Cruz), anti-RNA Pol II (8WG16, Covance) and anti-Hsp70 (ab2787, ABCAM) were used at 1:1000, 1:500 and 1:600, respectively.

Production and Affinity Purification of TnaA Antibodies

To generate antibodies against different TnaA regions, we used the TnaA cDNA that contains the TnaA translated exons from the ZAP1 clone [5] that represent the TnaA RD transcript [17]. The TnaA cDNA clone was digested with *Bam*HI and two fragments were independently subcloned into the pGEX2T vector to generate glutathione S-transferase (GST) fusion proteins harboring the TnaA amino-termini (amino acids 159–432, GST-TnaA^{NH2-1}) and the XSPRING domain (amino acids 433–856, GST-TnaA^X).

(SPRING¹). GST-fusion proteins were expressed and purified [18] to inject Wistar rats to raise polyclonal antibodies [19]. The antibodies from total sera were affinity-purified [20].

Pull-down and Immunoprecipitation Assays

All the clones used in this work were nucleotide-sequenced. The *Drosophila* Ubc9 cDNA (BDGP Gold collection of *Drosophila* Genomics Resource Center) was amplified with the Forward: 5'-AGTTCCGAGAATTCTCCGGCATTGCTATTACAG-3' and Reverse: 5'-CGGAATCCTCGAGGCGCTTCTCGTACTCCAG-3' primers, and cloned in the *Eco*RI and *Xho*I sites of the pGEX-4T vector. Pull-down assays were done as described previously [21]. Immunoprecipitations were done on SNF or total protein extracts from 3–21 hour postfertilization Ore-R embryos [22]. In these assays we made two preclearings steps and we used the Buffer PD (20 mM HEPES, pH 7.9, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 4 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.1% NP-40, 10% glycerol and 0.2 mM PMSF).

Yeast Two-hybrid Assays

Drosophila TnaA and Ubc9 cDNAs were cloned in the *Eco*RI and *Sa*I, and *Eco*RI and *Xho*I sites of the pGBKT7 and pGADT7 vectors, respectively. pGBKT7-TnaA was digested with *Bam*HI and religated to obtain the TnaA^{NH2-2} fragment (1–432 aa). TnaA^{XSPRING2} (379–927 aa) and TnaA^{COO} (929–1073 aa) were obtained after the digestion of the full-length pGBKT7-TnaA with *Nco*I and each fragment was cloned separately in *Nco*I-digested pGBKT7. TnaA^{QLess} (306–696 aa) and TnaA^{SP-COO QLess} (711–999 aa) were obtained by cloning in pGBKT7 digested with *Nde*I and *Eco*RI, PCR fragments obtained from the TnaA cDNA clone [5] using the primers: a) TnaA^{QLess} Forward 5'-GGAATTCCA-TATGCGACGAATGGC. CCCATATC-3' and Reverse 5'-CGAGAATTCATCTG-GCCCGGCATTC-3', b) TnaA^{SP-COO QLess} Forward 5'-GGACAGGCTCATATGGCCAAGATCT-CATTGAAGTGC-3' and Reverse 5'-GCAGAATTCGGTTT. GGGGCGAGTTGTG-3'. Osa_{C2} cDNA harbouring aminoacids 1951–2600 from the Osa protein was synthesized from polyA⁺ RNA from Ore-R embryos 3–21 hour postfertilization, according to [23]. The Osa_{C2} PCR fragment was synthesized with the Forward: 5'-GGAATTCCTCCATATGAACTACACGATGGT. CACG-3' and Reverse: 5'-CGTGAATTCGGTACCG-CAGCTGTTGCTGTTG-3' primers and cloned in pGADT7 with *Nde*I and *Eco*RI. Yeast two-hybrid assay was performed using the BD Matchmaker library construction and screening kit (Biosciences-Clontech). The interaction between baits and preys were tested evaluating the reporter genes *ADE2* and *HIS3* using the media QDO (SD-Trp/–Leu/–Ade/–His) supplemented with 3 mM 3-AT (3-amino-1,2,4-triazole).

Fly Strains, Genetic Procedures, and Larval Staging

Unless otherwise noted, all mutations are described in Flybase [17]. Briefly, *tna*¹, *tna*⁵, *osa*¹ and *osa*² are EMS-induced mutations. In *tna*¹ Gln 566 changed to a stop codon [5]. *tna*⁵ was recovered after EMS mutagenesis in a genetic screen to identify *brm*-interacting mutations (J. A. K., unpublished results). The lesion in the *lwr*² allele (Arg 104 to His) is located in a region that has been involved in the interaction between ubiquitin-conjugating enzymes with the HECT or RING ubiquitin E3 ligases [24]. The *lwr*⁴⁻³ and *lwr*¹³ were both derived from imprecise excision of P-elements inserted in the 5' regulatory zone [25,26]. *smt3*⁰⁴⁴⁹³ is a P-element insertion 10 bp upstream of the first exon of *smt3* [27]. Fly cultures and crosses were performed according to standard procedures. Flies were raised on cornmeal-molasses media at 25°C unless otherwise noted. Media were supplemented with 0.05% of

bromophenol blue to stage third instar larvae according to the gut dye clearance [28].

Immunostaining of Ring Glands, Salivary Glands, and Polytene Chromosomes of Third Instar Larvae

Immunostaining of ring and salivary glands were done as described by [29], and the immunostaining of polytene salivary gland chromosomes was done as reported by [30]. For immunostaining of polytene salivary gland chromosomes, the TnaA_{XSPRING} antibodies were preabsorbed with fixed 0–3 hour embryos [31]. Polytene chromosomes and salivary and ring glands images were captured on a Leitz DMIRB inverted photomicroscope equipped with a Leica TCS Nt laser confocal imaging system, a Zeiss Inverted Axiovert fluorescent microscope, a Leica Aristaplan fluorescent microscope or an Olympus Inverted confocal FV1000 microscope. Images were processed using Image J.

Results

TnaA₁₃₀ and TnaA₁₂₃ in Space and Time throughout Development

The *tna* gene produces several large transcripts that are differentially expressed from embryo through adult stages [5,17]. The main large transcript is 6.1 kb and it peaks at the pupal stage [5]. Translation of this transcript predicts a protein product of 127 kDa that we named TnaA [5]. To study TnaA, we prepared two affinity-purified antibodies: TnaA_{NH2} that was raised against the amino-terminal region and TnaA_{XSPRING} that was raised against the XSPRING domain (Fig. 1 and Material and Methods). Both antibodies recognize the same proteins on adult male soluble extracts and they were used indistinctly along this work (Fig. 2A).

Two main TnaA protein products, one of 130 kDa (TnaA₁₃₀) and another one of 123 kDa (TnaA₁₂₃) are present in varying abundance throughout development (Fig. 2B). The abundance does not correspond to the *tna* mRNA expression pattern [5] suggesting postranscriptional regulation. We sometimes observe another product heavier than TnaA₁₃₀ in embryos of 3–21 h (Fig. 2B). These three Tna species we found, are consistent with the three Tna polypeptides described in Flybase [17]. Nevertheless we cannot discard the possibility that TnaA could be postranslationally modified. For example, we determined using the SUMOsp 2.0 program [32] that TnaA has two putative SUMOylation sites and one putative SUMO Interacting Motif (SIM) [33] (data not shown). In extracts isolated from 0–3 hour embryos, we detected very low levels of TnaA₁₃₀, while TnaA₁₂₃ was not detected. In extracts isolated from 3–21 hour embryos, we detected a TnaA form larger than TnaA₁₃₀, and the levels of both TnaA₁₃₀ and TnaA₁₂₃ increased, reaching maximums in the first larval instar. Decreases in the abundances of both proteins were observed in second and third instar larvae, with the levels of TnaA₁₂₃ higher than those of TnaA₁₃₀. Both forms abundance decreased substantially in pupae and TnaA₁₃₀ was observed again at the pharate stage meanwhile TnaA₁₂₃ is not detected. In adult flies of both sexes, TnaA₁₃₀ and TnaA₁₂₃ were both highly abundant at about equal levels. The appearance of TnaA₁₂₃ was always preceded by the presence of TnaA₁₃₀.

Next, we investigated the subcellular location of the TnaA proteins in nuclear and cytoplasmic fractions from 3–21 hour embryos (Fig. 2C, upper panel). The largest subunit of RNA polymerase II and β -tubulin were used to test the purity of the fractions (Fig. 2C, middle and lower panels). We found that TnaA₁₂₃ was enriched in the nuclear fraction whereas TnaA₁₃₀ was enriched in the cytoplasmic fraction (Fig. 2C). It has been shown that SUMO is present in prothoracic gland nuclei [29] in

third instar larvae. *tna* mutant individuals arrest development at the larval-pupal transition which is where less TnaA protein is expressed (see ahead). This suggests that TnaA may be expressed in specific tissues relevant for metamorphosis. We immunostained salivary (Fig. 2D, upper panel) and ring glands (Fig. 2D, lower panel) from third instar larvae with the TnaA_{XSPRING} antibody and we found that TnaA was present most highly within the nucleus of the secretory cells of salivary glands and in prothoracic gland cells.

TnaA is Critical for Larval Development

While we can detect TnaA₁₃₀ and TnaA₁₂₃ in Ore-R and in *tna*^{1/+} or *tna*^{5/+} individuals, TnaA₁₃₀ is barely detectable and TnaA₁₂₃ decreases dramatically in *tna*^{1/tna}⁵ larvae (Fig. 3A, left panel). The *tna*¹ mutation changes Gln 566 to a stop codon, is recessive lethal [5] and behaves as a dominant negative. *tna*¹ is a much stronger dominant enhancer of *osa*¹ than is a deficiency of the *tna* region (Table 1). *tna*¹ would produce a truncated protein of 62 kDa that we have been able to observe in heterozygous *tna*^{1/+} salivary glands soluble extracts (Fig. 3A, right panel). The molecular lesion of *tna*⁵ has not been determined, but it behaves genetically as a hypomorphic allele and its product can be detected in *tna*^{1/tna}⁵ third instar larvae extracts (Fig. 3A, left panel).

To better understand *tna* function we studied the lethality of *tna*^{1/tna}⁵ animals. The *tna*^{1/tna}⁵ larvae (Fig. 3B) did not have melanotic tumors as observed in *lvr* or *aos1* mutant individuals [34,35,36], nor are they a larger size as observed for *smt3* knockdown larvae [29]. We found that 65% of *tna*^{1/tna}⁵ individuals reach the third instar larval stage (Fig. 3C), but only 41% pupated and only 8% of the expected individuals reached the pharate stage. No *tna*^{1/tna}⁵ individuals eclosed as adults (Fig. 3C). We also noticed that the *tna*^{1/tna}⁵ third instar larvae that did not pupate often survived long after their heterozygous *tna*^{1/+} or *tna*^{5/+} siblings larvae pupated. Some of these *tna*^{1/tna}⁵ larvae have an extended lifespan of at least two weeks (Fig. 3C). A similar extension of larval lifespan was previously observed in animals with reduced levels of SUMO [29], Aosl (one of the E1 subunits) [34] or Ubc9 (E2) [35,36].

Given the abnormal behavior of *tna*^{1/tna}⁵ larvae and knowing that the TnaA profile is altered (Fig. 3A), we characterized the protein profile of their salivary glands (Fig. 3D). We staged the larvae by feeding them with bromophenol blue [28] and divided them in early (blue) and late (white) larvae. All *tna*^{1/tna}⁵ larvae remained as early larvae (blue). They were collected 24 hours after they crawled from the food to obtain their salivary glands and we determined their protein profile (Fig. 3D). Although *tna*^{1/tna}⁵ larvae remained blue, the protein profile differed from both the early and late wild-type Ore-R salivary glands obtained under the same conditions. Differences in the quantity and quality of proteins present in *tna*^{1/tna}⁵ salivary glands fall mostly in the range over 72 kDa (Fig. 3D).

TnaA is Chromatin-associated at Discrete Sites on Polytene Salivary Gland Chromosomes

We have shown that TnaA₁₂₃ is nuclear in *Drosophila* embryos (Fig. 2C) and that TnaA (probably TnaA₁₂₃) is mainly nuclear in salivary and ring glands from third instar larvae (Fig. 2D). We immunostained polytene salivary gland chromosomes of third instar larvae and found that TnaA is associated with discrete sites (Fig. 4A). The number of TnaA sites suggests that TnaA might be required for the transcription of more than just the homeotic genes. Interestingly, most of the TnaA signals detected on polytene salivary gland chromosomes are located in interbands which are thought to have decondensed chromatin where transcription can

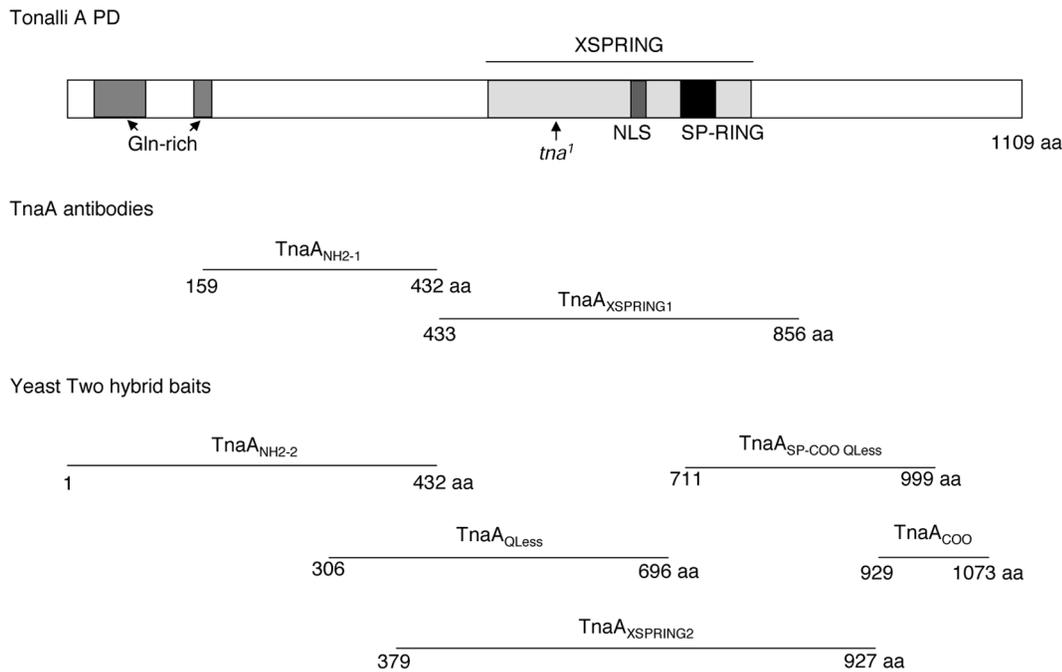


Figure 1. TnaA protein, domains and fragments. The TnaA protein (upper section). TnaA domains are indicated. Nuclear localization signal is NLS. The stop codon in the *tna*¹ allele [5] is indicated by an arrow. TnaA fragments used to produce TnaA antibodies from GST fusion proteins are shown (middle section). TnaA fragments fused to the yeast GAL4-binding domain to use as baits in two-hybrid assays (lower section). doi:10.1371/journal.pone.0062251.g001

occur (Fig. 4B). Because of the strong genetic interactions between *tna* and *osa* [5], we coimmunostained for TnaA and Osa on polytene salivary gland chromosomes. TnaA colocalizes with Osa at some sites, but not at others (Fig. 4C, upper and bottom panels). We do not know whether this is because TnaA is not required at all genes regulated by Osa, or whether it is due to an interaction between TnaA and Osa that is more transient than Osa localization.

TnaA Physically Interacts with Ubc9 and with Osa

SUMO E3 ligases function for selection of SUMOylation targets and/or for enhancement of the SUMO conjugation process. TnaA has an SP-RING zinc finger that is also present in a subclass of SUMO E3 ligases that includes the PIAS proteins in mammals [37] and Su(var)2-10 in *Drosophila* [14]. Since the SP-RING in the PIAS proteins physically interacts with Ubc9 [38,39], we explored whether TnaA physically interacts with *Drosophila* Ubc9, using yeast two-hybrid assays and pull-down assays.

For the yeast two-hybrid assays we first used the full-length TnaA protein (Fig. 1) fused to the yeast GAL4-DNA binding domain as “bait”, and the full-length *Drosophila* Ubc9 protein (Fig. 5A) fused to the GAL4-activation domain as “prey”. We found that the full-length TnaA protein was able to activate the transcription of at least two reporter genes in the absence of a “prey” (Fig. 5B), and as a consequence the full-length TnaA protein could not be used to test for the Ubc9 interaction in this assay. We then split the TnaA protein into five fragments that cover the whole TnaA protein (Fig. 1). Two out of the five fragments contain the SP-RING zinc finger (TnaA_{XSPRING2} and TnaA_{SP-COO QLess}). The other fragments have different TnaA regions that include the two glutamine-rich domains (TnaA_{NH2-2}), the bipartite nuclear location signal (TnaA_{QLess}) and the carboxy-ending (TnaA_{COO}). We found that the TnaA_{XSPRING2} fragment interacted with Ubc9 in the yeast two-hybrid assay while the other

fragments, including TnaA_{SP-COO QLess}, did not interact (Fig. 5B). These results show that the TnaA SP-RING zinc finger is necessary but not sufficient for the TnaA interaction with Ubc9 in this assay.

Osa is a subunit of some BRM complexes, and the *osa* gene strongly interacts with *tna* [5]. Since it was found that Osa is modified by SUMO in *Drosophila* embryos [3], we thought that TnaA might be involved in Osa SUMOylation. We searched for SUMOylation consensus sites (Ψ KxE) in the Osa protein sequence (2713 aa) using the SUMOsp 2.0 program [32] and found eight putative SUMOylation sites (Fig. 5A), six of them located within a segment located from amino acids 1951 to 2600 surrounding the C2 domain [40]. We will refer to the fragment with the six putative SUMOylation sites as Osa_{C2} in this work. We synthesized the Osa_{C2} cDNA from polyA⁺ RNA of 3–21 hour embryos and fused it to the GAL4-activation domain to use as “prey” in the yeast two-hybrid assay. We tested the six TnaA baits already described (including full-length TnaA), and found that baits harbouring the SP-RING (TnaA_{XSPRING2} or TnaA_{SP-COO QLess}) did not interact with the Osa_{C2} prey. Although TnaA_{NH2-2} (and to a lesser extent, full-length TnaA) interacted with Osa_{C2}, these baits also interacted with pGADT7 or pGADT7-SV40 negative control samples, preventing us from concluding whether the interactions with Osa_{C2} are bona fide. In contrast, we found that the TnaA_{QLess} bait clearly interacts physically with Osa_{C2} (Fig. 5B).

Although the TnaA_{XSPRING2} region interacted physically with Ubc9 in the yeast two-hybrid assays, we wanted to test for TnaA/Ubc9 physical interactions in *Drosophila* embryos. We performed pull-down assays using as bait a purified GST-Ubc9 fusion protein incubated with a nuclear protein extract from 3–21 hour embryos where we know TnaA is present (Fig. 2B). After extensive stringent washing, the presence of TnaA amongst the GST-Ubc9-interacting proteins was assessed by Western analyses with the TnaA_{XSPRING} antibody (Fig. 5C). As expected, we found that full-length

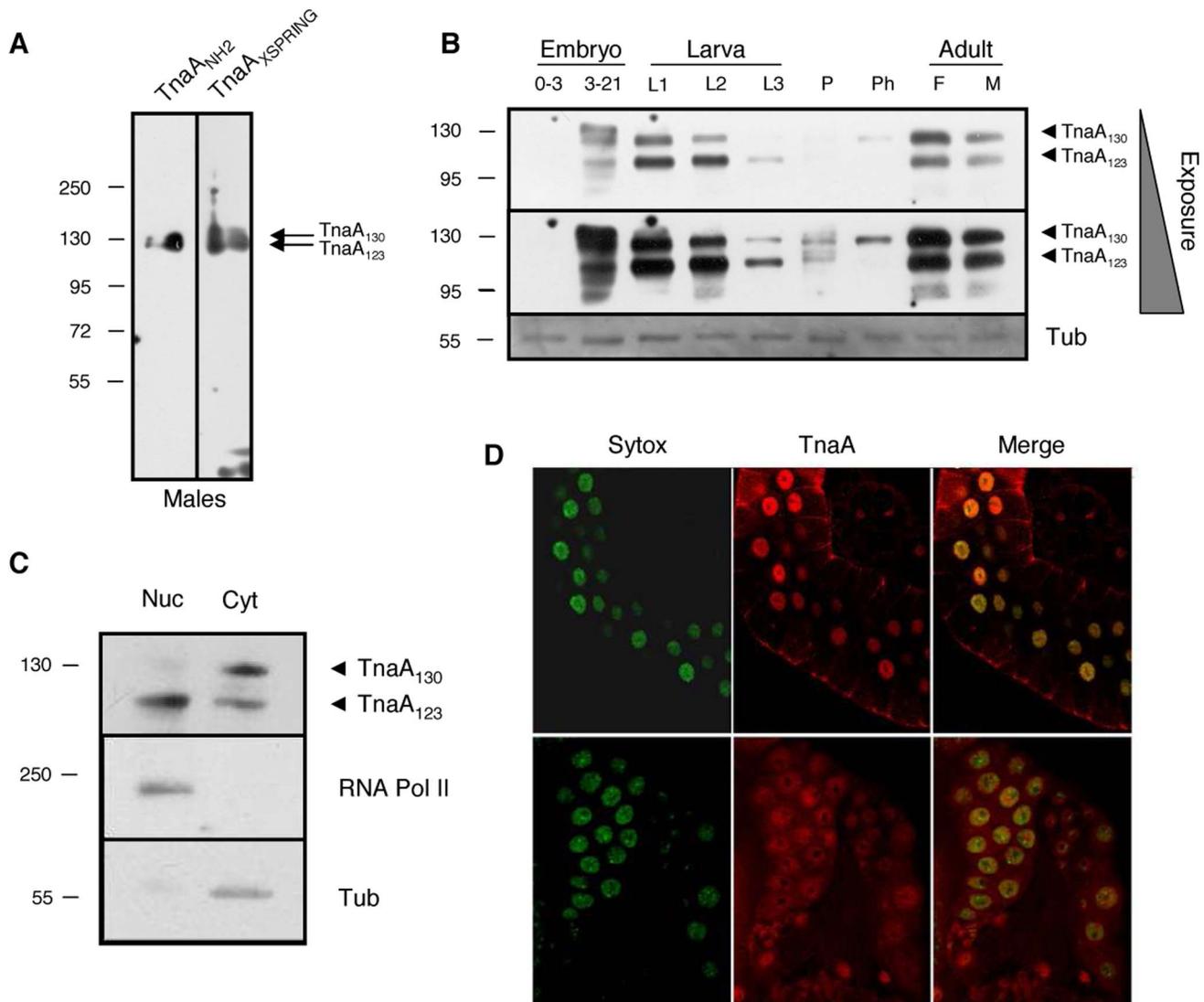


Figure 2. Expression and location of TnaA proteins throughout *Drosophila* development. (A) TnaA^{NH2} and TnaA^{XSPRING} antibodies detect the same proteins. TnaA proteins detected by full-range Western analysis in an adult male soluble protein extract with TnaA^{NH2} and TnaA^{XSPRING} antibodies (1:100 dilution). (B) TnaA developmental Western. Detection of TnaA₁₃₀ and TnaA₁₂₃ isoforms in soluble extracts isolated from embryos (0–3 and 3–21 hour), 1st, 2nd and 3rd instar larvae (L1, L2 and L3), pupae (P), pharate (Ph) and female and male adults (F and M). β -tubulin was used as a protein loading control (bottom). The TnaA^{XSPRING} and β -tubulin antibodies were used 1:100 and 1:1000, respectively. (C) TnaA₁₂₃ is mainly nuclear. Detection of TnaA proteins in nuclear (Nuc) and cytoplasmic (Cyt) soluble fractions isolated from embryos 3–21 hour. The largest RNA polymerase II subunit and β -tubulin were used as controls of nuclear and cytoplasmic fractions, respectively. TnaA^{NH2}, RNA polymerase II, and β -tubulin antibodies were used 1:120, 1:500, and 1:1000, respectively. (D) Immunostaining of TnaA in salivary (upper panel) and ring glands (lower panel) of Ore-R third instar larvae with TnaA^{XSPRING} (3:5, red), DNA (Sytox, green) and merge (yellow). We detected no signal when immunostaining was done with secondary antibody only (not shown). doi:10.1371/journal.pone.0062251.g002

TnaA from nuclei of *Drosophila* embryos interacts with full length GST-Ubc9, confirming the results that we obtained with the yeast two-hybrid assays using TnaA fragments and further suggesting that these proteins interact *in vivo*.

In all reported cases it is known that only a fraction of the whole pool of a SUMOylatable protein in a cell is SUMOylated, either because of spatial restrictions (the target protein should be located where the SUMO and the SUMOylation enzymes are) or because fine regulation constricts the amount of the SUMOylated protein [4]. We showed that Osa_{C2} interacts with a fragment of TnaA (TnaA_{QLess}) in a yeast two-hybrid assay (Fig. 5B). To test whether this interaction can be observed

with the full-length proteins in *Drosophila* embryos, we performed TnaA or Osa coimmunoprecipitation assays from total or nuclear protein extracts from 3–21 hour embryos. For this purpose, we first showed that the TnaA^{XSPRING} and Osa antibodies are able to immunoprecipitate TnaA and Osa, respectively (Fig. S1), and that the control proteins Hsp70 and Cdk7 do not coimmunoprecipitate with TnaA or with Osa, respectively (Fig. S2). Interestingly, we found that TnaA coimmunoprecipitates with a fraction of Osa found in nuclear protein extracts from 3–21 hour embryos (Fig. 5D), and that reciprocally, Osa coimmunoprecipitates with TnaA from a total protein extract of 3–21 hour embryos (Fig. 5E). Since we found

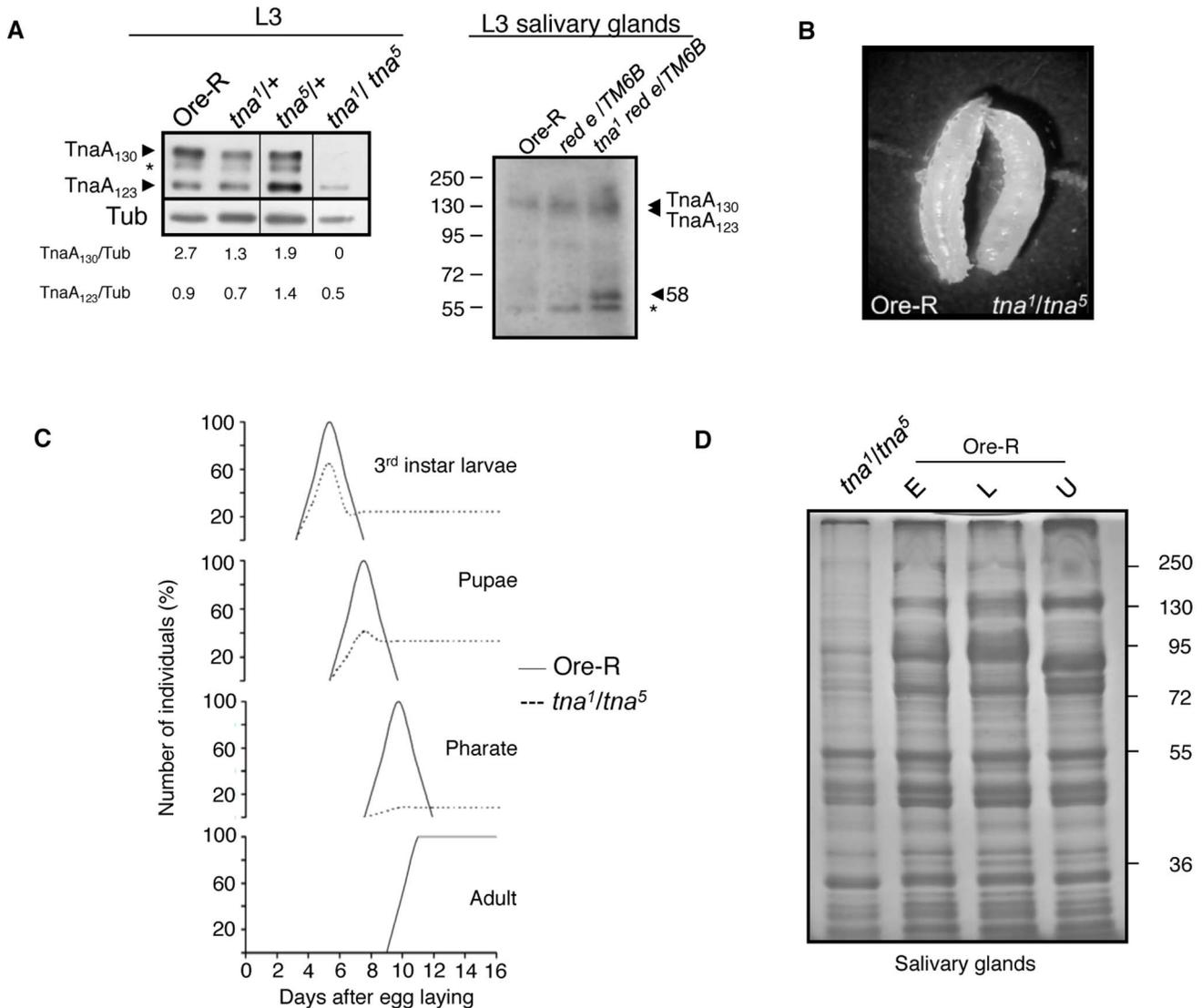


Figure 3. Characterization of *tna*^{1/tna}⁵ individuals. (A) TnaA proteins in *tna*^{1/tna}⁵ third instar larvae (left panel). Note the absence of TnaA₁₃₀ and the reduction of TnaA₁₂₃ levels. Western blot probed with the TnaA_{XSPRING} antibody (1:100) was done with similar amount of proteins from total third instar larvae extracts of the indicated genotype. The band marked with an asterisk (*) appears sometimes depending on extracts and running gel conditions and may represent a processed protein product. Narrow vertical lines indicate edition of lanes from the same film with samples from flies with other *tna* genotypes not relevant to this work. β -tubulin was used as loading control (antibody used 1:1000). The levels of TnaA₁₃₀ and TnaA₁₂₃ were compared with the level of β -tubulin using Image-J. Western blot of *tna*^{1 red e}/*TM6B* salivary gland extracts probed with TnaA_{NH2} antibody (right panel) detected TnaA₁₃₀, TnaA₁₂₃ (that comigrated in this gel) and a 58 kDa band close to the predicted size of a truncated Tna-1 protein (62 kDa). Salivary gland extracts from OreR individuals and from individuals harbouring the *tna*¹ parental (*red e*) and balancer (*TM6B*) chromosomes were used as controls. The asterisk indicates a crossreacting band present in all the genotypes tested. (B) *tna*^{1/tna}⁵ and Ore-R third instar larvae. (C) Survival percentage of *tna*^{1/tna}⁵ individuals at different stages of development. Ore-R (—) and *tna*^{1/tna}⁵ (---) survival percentages are indicated. More than 100 third instar larvae were counted for each genotype. Heterozygous *tna* individuals have survival rates similar to those for Ore-R. (D) Protein profile of *tna*^{1/tna}⁵ salivary glands. Note the differences between the *tna*^{1/tna}⁵ and the Ore-R total protein profiles. SDS-PAGE of soluble protein extracts from 10 pairs of larval salivary glands stained with Coomassie blue. Ore-R salivary glands extracts from early (E) and late (L) or unstagged (U) third instar larvae that were loaded as references. doi:10.1371/journal.pone.0062251.g003

that TnaA interacts physically with Osa and with Ubc9 (Fig. 5) we tried to test whether TnaA has SUMO E3 ligase activity on the Osa_{C2} fragment using a mammalian *in vitro* assay (Active Motif kit). Although Osa_{C2} is SUMOylated in this assay, we were not able to get convincing evidence that TnaA has SUMO E3 ligase activity under these conditions (data not shown).

tna and *osa* Genetically Interact with Components of the SUMOylation Pathway

tna genetically interacts with *brm* and *osa* [5]. Transheterozygous adult flies carrying mutations in combinations of any of these three genes have a strong held-out wing phenotype [5,8] (Fig. 6). This phenotype appears to result from reduced expression from the P2 promoter of the homeotic gene *Antp* [8]. The interactions with *tna* might be a consequence of reduced SUMOylation of Osa (and/or

Table 1. Genetic interactions of *tna* and *osa* with SUMOylation pathway genes.

Genotype	Number of flies with HWO ^a	Penetrance (%) ^a
+/ <i>osa</i> ¹	9/265	3
+/ <i>osa</i> ²	0/303	0
+/ <i>smt3</i> ⁰⁴⁴⁹³	0/389	0
+/ <i>lwr</i> ⁴⁻³	1/133	1
+/ <i>lwr</i> ⁵	0/297	0
+/ <i>lwr</i> ¹³	0/341	0
+/ <i>tna</i> ¹	116/624	19
<i>tna</i> ¹ / <i>osa</i> ¹	327/334	98
<i>Df(3L)lxd6/osa</i> ¹	16/115	14
<i>tna</i> ¹ / <i>osa</i> ²	140/334	42
^b <i>smt3</i> ⁰⁴⁴⁹³ /+; <i>tna</i> ¹ /+	44/249	18
^c <i>smt3</i> ⁰⁴⁴⁹³ /+; <i>tna</i> ¹ /+	66/118	56
<i>lwr</i> ⁴⁻³ /+; <i>tna</i> ¹ /+	69/150	46
<i>lwr</i> ⁵ /+; <i>tna</i> ¹ /+	71/282	25
<i>lwr</i> ¹³ /+; <i>tna</i> ¹ /+	177/343	52
<i>smt3</i> ⁰⁴⁴⁹³ /+; <i>osa</i> ¹ /+	57/264	22
<i>smt3</i> ⁰⁴⁴⁹³ /+; <i>osa</i> ² /+	0/216	0
<i>lwr</i> ⁵ /+; <i>osa</i> ¹ /+	1/147	1
<i>lwr</i> ¹³ /+; <i>osa</i> ¹ /+	0/124	0
<i>lwr</i> ⁵ /+; <i>osa</i> ² /+	0/212	0
<i>lwr</i> ¹³ /+; <i>osa</i> ² /+	0/256	0

^aFor expressivity of held-out wing phenotype (HWO) see Fig. 6.

^b, ^cReciprocal crosses were done in all cases with no observed differences except in the crosses with *tna*¹ males and *smt3*⁰⁴⁴⁹³ females^b, or with *smt3*⁰⁴⁴⁹³ males and *tna*¹ females^c. At least 100 flies were examined for each genotype. Flies that do not present the held-out wing phenotype include *tna*³, *tna*⁵, or *tna*⁻ deficiencies *Df(3L)vin2* and *Df(3L)lxd6*, *osa*², *lwr*⁵, *lwr*⁴⁻³, *lwr*¹³, *smt3*⁰⁴⁴⁹³ heterozygous individuals, *lwr*⁴⁻³/*osa*¹/+, *smt3*⁰⁴⁴⁹³/*osa*²/+ and all the transheterozygous combinations between *tna*³, *tna*⁵, or *Df(3L)vin2* and *Df(3L)lxd6* with *smt3* and *lwr* alleles.

doi:10.1371/journal.pone.0062251.t001

Brm) proteins. If so, mutations in other components of the SUMOylation pathway might also show genetic interactions. We generated transheterozygous flies carrying mutant alleles of either the SUMO E2 conjugating enzyme Ubc9 (*lwr*⁵, *lwr*⁴⁻³, and *lwr*¹³) [25,26] or SUMO (*smt3*⁰⁴⁴⁹³) [27] in combination with mutant alleles of *tna* (*tna*¹ and *tna*⁵) or *osa* (*osa*¹ and *osa*²). All of these individuals have at least one wild type copy of each gene to allow survival to the adult stage.

Individuals carrying *tna* alleles other than *tna*¹ (*tna*³ or *tna*⁵), or deficiencies uncovering the *tna* region [*Df(3L)vin2* or *Df(3L)lxd6*] do not show the held-out wing phenotype. This phenotype is also not shown by transheterozygous individuals carrying *tna* alleles other than *tna*¹ or the *tna* deficiencies in combination with *smt3* or *lwr* alleles. In contrast, we found that *smt3*⁰⁴⁴⁹³, *lwr*⁴⁻³ and *lwr*¹³ enhance both the penetrance and the expressivity of the held-out wing phenotype of *tna*¹ individuals (from 19% with weak expressivity to 56%, 46% and 52% with stronger expressivity, respectively, Fig. 6 and Table 1). Thus, we confirmed genetically that *tna* interacts with the SUMOylation pathway genes *smt3* and *lwr*. Interestingly, we found a maternal effect in the enhancement of the *tna*¹ held-out wings phenotype in double heterozygous *smt3*⁰⁴⁴⁹³/+; *tna*¹/+ individuals. The enhancement is only observed when there is not maternal contribution of *tna* (Table 1). We did

not observe this maternal effect with the other genes tested. Since we observed strong genetic interactions between *tna* and *osa* (Fig. 6) [5], therefore we tested whether the SUMOylation genes *lwr* and *smt3* also interact with *osa* (*osa*¹ and *osa*² in Table 1 and Fig. 6). We found that *smt3*⁰⁴⁴⁹³ augmented the penetrance and the expressivity of the weak held-out wing phenotype of *osa*¹ (Fig. 6, Table 1) but that it did not interact with the weaker *osa*² allele. None of the *lwr* alleles tested interacted with *osa*¹ or *osa*², suggesting that Ubc9 activity in these heterozygous individuals is sufficient to reach appropriate SUMOylation levels.

Discussion

The presence of the SP-RING, the physical interaction of the SUMO E2 conjugating enzyme Ubc9 with TnaA, and the genetic interaction of *tna* with genes encoding SUMOylation pathway proteins suggest that TnaA may be involved in the SUMOylation pathway to activate transcription. TnaA may also have other functions not directly related to SUMOylation. These other functions may or may not act together with SUMOylation to positively regulate gene expression.

TnaA Function in Gene Expression Involving the SUMOylation Pathway

Gene expression involves the integration of many regulatory mechanisms. Recently, many examples of SUMOylation and/or ubiquitylation during transcriptional regulation have been described [4]. These examples include the clearance of activators to favor transcription cycles in inducible genes [41] and the assembly of different proteins into a complex [42,43]. Most of the *tna* interacting genes (*osa*, *brahma*, *moira*, *kohtalo*, *skuld*, and *kismet*) [5] encode subunits of complexes involved in chromatin remodeling and transcription by RNA polymerase II, suggesting that SUMOylation may be important at multiple aspects of gene regulation in *Drosophila*. Typically, SUMO-tagged proteins are recognized by a binding partner that contains a SIM (SUMO Interacting Motif) [33]. All of the proteins encoded by the *tna* interacting genes listed above have more than one SIM and SUMOylation sites (data not shown) and could be either SUMOylation targets, readers of the SUMO mark, or proteins that help TnaA exert its function(s).

SUMO E3 ligases are required for the enhancement and/or for the specificity of the SUMOylation tagging on targets. In this work we utilized different approaches to show that TnaA is involved in the SUMOylation pathway possibly as a SUMO E3 ligase. We showed a TnaA physical interaction with Ubc9 and genetic interactions between *tna* and *osa* with SUMOylation pathway genes. SUMOylated Osa is found in early embryos (0–3 hour) [3] and embryonic TnaA and Osa coimmunoprecipitate reciprocally (this work). We also showed that a GST-Ubc9 fusion physically interacts with native nuclear TnaA from *Drosophila* embryos. Hence, we suggest that Osa is a good candidate to be a TnaA-SUMOylation target *in vivo*. Our data suggest that TnaA-dependent SUMOylation of Osa and/or of other target(s), particularly proteins associated with Osa (e.g. other BRM complex subunits, histones, or others, see ahead), may be required for correct gene expression including homeotic genes. Osa is a large protein of around 280 kDa with an ARID domain which binds AT-rich sequences, LXXLL domains [8] that could help it to interact with nuclear receptors and has eight putative SUMOylation target sequences, six of them in the Osa_{C2} fragment (Fig. 5A). In humans there are three proteins related to Osa, BAF250a, BAF250b and BAF200/ARID2 [44] and it was reported that

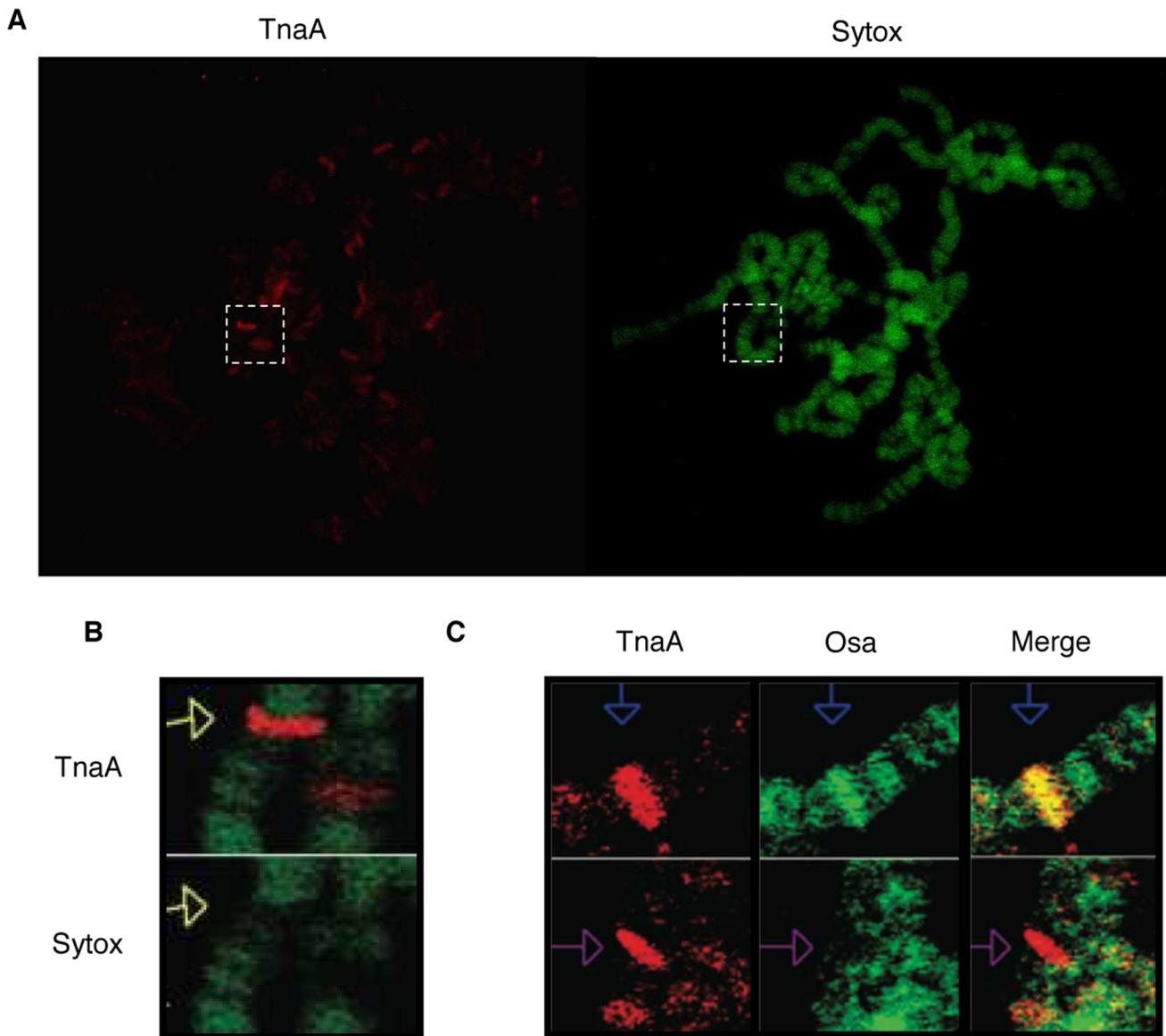


Figure 4. TnaA is located on polytene salivary gland chromosomes of third instar larvae and sometimes colocalizes with Osa. (A) Immunostaining of TnaA in Ore-R (wild type) polytene salivary gland chromosomes of third instar larvae. TnaA_{XSPRING} antibody (1:50, red) and DNA (Sytox, green). Amplification in B is indicated (pointed white rectangle). (B) TnaA is located in chromatin interbands. (C) TnaA and Osa colocalize in some sites on polytene salivary gland chromosomes of third instar larvae (blue arrows in the top panels) but in others do not (purple arrows in the bottom panels). TnaA_{XSPRING} antibody (1:50, red) and Osa (1:50, green). No signal was detected when no primary antibody was added (data not shown).

doi:10.1371/journal.pone.0062251.g004

BAF250b could be in a complex that has E3 ubiquitin ligase activity on histone H2B [45].

Originally *tna* was identified in a screen to find Brm-interacting proteins [5]. Although we did not study here whether Brm can be SUMOylated, it has been reported that mammalian SUMO-2 can be acetylated at K33 to inhibit some SUMO-SIM interactions [46]. Interestingly, these authors also show that the bromodomain of p300, besides recognizing acetylated histones [47], can bind the SUMO acetylated form, opening the question of whether other bromodomains, such as the one present in the Brahma protein, would be able to recognize a putative *Drosophila* acetylated SUMO when present in any of its interactor proteins.

TnaA may also be promoting homeotic gene expression by inactivation through SUMOylation of a PcG protein. Indeed,

SUMOylation of the PcG protein Scm (encoded by the *Sex comb on midleg* gene) decreases its levels at the PRE (Polycomb Response Element) located upstream the *Ubx* homeotic gene. SUMO compromised animals show a reduction of *Ubx* expression and it has been suggested that TnaA may be involved in Scm SUMOylation to promote homeotic gene expression [48].

Other TnaA Interactors and SUMO-independent Functions of TnaA

We found that TnaA₁₃₀ is mainly cytoplasmic and TnaA₁₂₃ is mainly nuclear. Although most studied SUMO enzymes and targets are in the nucleus, there are some examples of SUMOylation of proteins in the cytoplasm [49]. As TnaA₁₃₀ always precedes

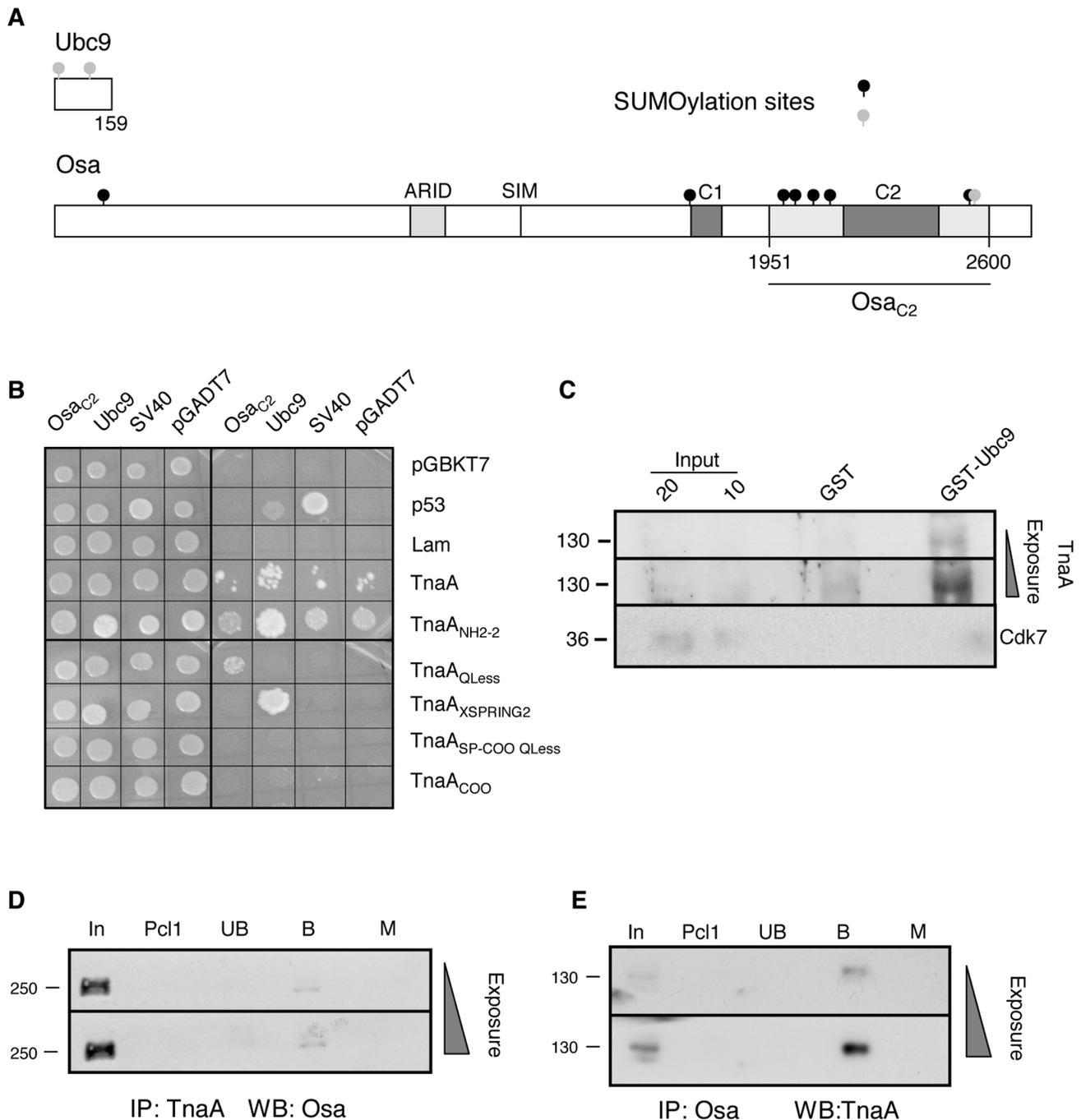


Figure 5. TnaA interacts with *Drosophila* Ubc9 and with Osa. (A) Schemes of *Drosophila* Ubc9 and Osa_{C2} used in biochemical assays. In the Osa protein, the ARID, the C1 and C2 domains (grey boxes), the SUMO interacting motif (SIM) and the Osa_{C2} fragment (dark line) are indicated. Forward (black circles) and inverted (gray circles) putative SUMOylation consensus sites in these proteins are indicated. For TnaA baits see Fig. 1. (B) TnaA interaction with Ubc9 and Osa_{C2} in yeast two-hybrid assays. Yeast colony complementation of growth controls in SD-Trp/–Leu media due to the presence of pGBKT7 (Trp⁺) and pGADT7, (Leu⁺) plasmids (left) in the same yeast cells. Interaction assay in QDO +3-AT (SD-Trp/–Leu/–Ade/–His +3-AT) media (right). Growth is observed when baits and preys interact, allowing GAL4 reconstitution with the consequent *ADE2* and *HIS3* reporter genes transcription. Baits were TnaA fragments (Fig. 1) fused to the DNA-binding domain of GAL4 in pGBKT7. Ubc9 and Osa_{C2} were preys fused to the GAL4 activation domain in pGADT7. Human p53 (p53) and Lamin C (Lam) interactions with SV40 are positive and negative controls, respectively. (C) TnaA interaction with Ubc9 by pull-down. The assays were done with 10 μg of each GST or GST-Ubc9 as baits and with 500 μg of soluble nuclear fraction from 3–21 hour embryos. 10 and 20% of the extract are shown as Input. TnaA was detected by Western analysis with TnaA_{XSPRING} antibody (1:100) when GST-Ubc9 was used as bait. The 130 kDa weight marker is indicated (left) and increasing exposures of the same membrane are shown. Cdk7 was detected only in the Input lanes (antibody dilution, 1:1000). (D) Coimmunoprecipitation of Osa with TnaA antibodies from nuclear extracts obtained from 3–21 hour embryos. TnaA_{XSPRING} antibodies (1 μg), and 3–21 hour embryos soluble nuclear fraction (500 μg) were used. The Western was revealed with the Osa antibody (1:1000). Input, (In), preclearing 1 (Pcl1), unbound (Ub), bound (B). Immunoprecipitation with the equivalent amount of a preimmune serum instead of TnaA_{XSPRING} antibody was used as Mock (M). Both panels show films with increasing exposure time of the same membrane. (E) Coimmunoprecipitation of TnaA with Osa antibodies from total extracts obtained from 3–21 hour embryos. Osa antibodies

(1 μ g), and 3–21 hour embryos soluble nuclear fraction (3.7 mg) were used. The Western was revealed with the TnaA_{NH2} antibody (1:120). Lanes are labeled as above. The equivalent amount of an irrelevant antibody was used as mock (M). Molecular weight markers are indicated (left).
doi:10.1371/journal.pone.0062251.g005

the appearance of TnaA₁₂₃ through development (developmental Western, Fig. 2B), we think that TnaA may be processed to enter the nucleus to SUMOylate its targets. Notably, SUMOylation pathway proteins with well known nuclear activities also SUMOylate targets in the cytoplasm [50]. Thus, with what we know at present, we cannot discard the possibility that TnaA₁₃₀ can also function in the cytoplasm. We also found that *tna* interacts with the γ Tub23C gene that encodes an isoform of γ -tubulin [51]

and with *taranis (tara)* [5]. The significance of the interaction of *tna* with *tara* and γ Tub23C is currently unknown.

It is possible that TnaA could be necessary for BRM complex(es) function(s) regardless of SUMOylation, and that independently, SUMOylation could be required for function of other BRM complex(es) components. We cannot neither rule out the possibility that TnaA may have other functions independent of its possible role in the SUMOylation pathway, as has been

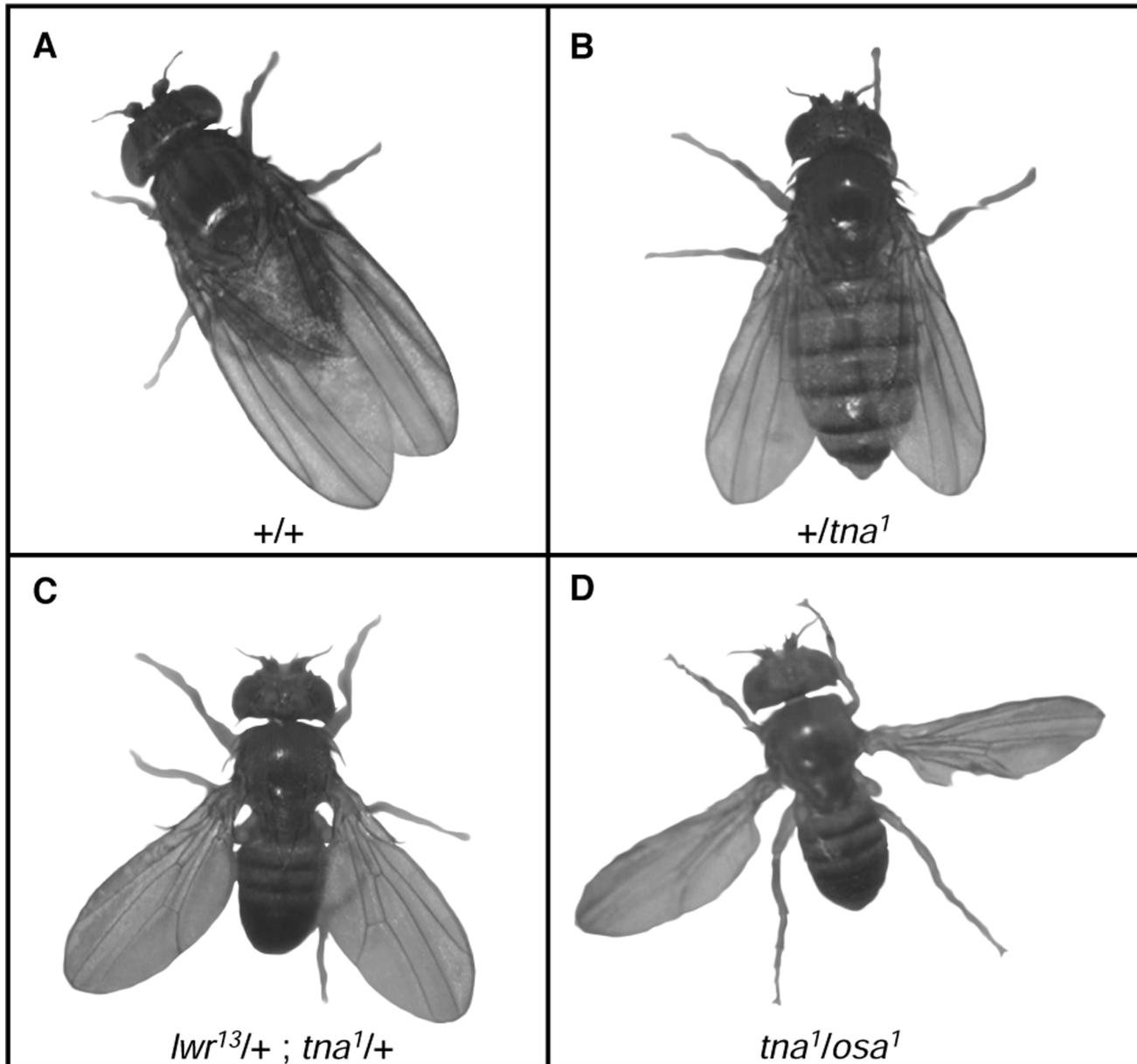


Figure 6. SUMOylation pathway mutations enhance held-out wing phenotype of *tna* and *osa* flies. Flies with different held-out wing phenotype expressivity. Fly genotype is indicated in each picture. Penetrance of the held-out wing phenotype in each genotype is in Table 1 (A) Wild type fly (B) Slight held-out wing phenotype of $+/tna^1$ flies. The same phenotype is presented by $+/osa^1$ individuals. (C) Stronger held-out wing phenotype of $smt3/+;tna^1/+$ individuals. The same phenotype is presented by $lwr^{13}/+;tna^1/+$ or $smt3^{04493}/+;osa^1/+$ individuals. (D) Strongest held-out wing phenotype of tna^1/osa^1 individuals. This phenotype is also presented by tna^1/osa^2 individuals.
doi:10.1371/journal.pone.0062251.g006

reported for the PIAS proteins, known SP-RING SUMO E3 ligases [52,53,54]. The SP-RING plays a key role in this PIAS activity. The TnaA SP-RING is immersed in a 300-aminoacid region that we called the XSPRING domain that is shared with the vertebrate proteins Zimp7 and Zimp10 [KIAA1886 and KIAA1224 respectively, 5]. Although TnaA is related to the PIAS proteins because it has an SP-RING, it does not have the SAP (Scaffold attachment factor-A/B, Acinus and PIAS domain) nor the PINT motifs that are PIAS signature domains.

The SAP and PINT motifs in the PIAS proteins confer functions related to structural anchoring and transcriptional regulation. In mammals it has been shown that PIAS1 promotes the transcriptional repressive activity of Msx1 through regulating its location in a SUMO-independent way [53], it controls the stability of Msx1 by preventing its ubiquitination [55] and it regulates the transcriptional activity of GATA4 [56]. Similarly, in *Xenopus*, XPIASy down-regulate XSmad2 transcriptional activity independently from XPIASy SUMO E3 ligase activity [57].

Although human Zimp7, human Zimp10, and *Drosophila* TnaA do not have these other PIAS signature motifs they have transcriptional activation domains [58,59] (Fig. 5B). The presence of a transcriptional activation domain could explain why we could not use the TnaA-Gal4 DNA-binding domain fusion in the yeast two-hybrid system (Fig. 5B). This suggests that TnaA, besides its possible role in the SUMOylation pathway, has other functions in *Drosophila* transcriptional activation.

TnaA in *Drosophila* Development

We described a genetic interaction between *tna*, *osa*, and SUMOylation pathway genes. TnaA interacts physically with Ubc9 through the SP-RING supporting the genetic interaction data. Animals derived from *osa* and *tna* mutant germline clones die at different stages of development. While the *osa* ones do not survive embryogenesis [8] the *tna* ones die mostly as third instar larvae [5]. A pool of Osa is found SUMOylated in embryos of 0–3 hour of development when zygotic expression has not started [3] and TnaA is barely detectable (overexposure of Fig. 2B, data not shown). Moreover, when we studied the *tna* and *smt3* interaction, we found a *tna* maternal effect. The held-out wings phenotype in *smt3/+; tna/+* adults is observed when the mother is *tna* defective, but we do not observe this when the mothers have low dosages of SUMO (Table 1). We think it is probable that SUMOylated Osa plays a role at early stages of development. SUMOylation of embryonic Osa can happen in the maternal germline or in the embryo with the help of the maternally-inherited SUMOylation pathway machinery. This machinery may include TnaA if TnaA is involved in SUMOylation or another protein with a SUMO-related function. It is also possible that *smt3/+; tna/+* embryos derived from *smt3* mothers do not present the held-out wings phenotype because the SUMOylation pathway can compensate even with low dosages of SUMO. On the other hand, if TnaA is related to SUMOylation, embryos derived from *tna* mothers would lack correct SUMOylation of specific targets (such as Osa) causing later the appearance of the held-out wings phenotype.

Why do *tna* mutant animals die at later stages of development? One possibility is that proteins other than TnaA can exert its function on particular targets, such as Osa, or that they could only

impact the TnaA targets in earlier stages of development, but not in later stages. SUMO is required for metamorphosis [29]. As the majority of *tna* mutant animals die as larvae or pupae and cannot proceed to metamorphosis (Fig. 3C) [5], and as TnaA is in prothoracic gland nuclei of third instar larvae (Fig. 2D) obvious candidates for regulation by *tna* would be the ecdysone-pathway, ecdysone-regulated or patterning genes.

The relevance of SUMOylation (and of genes like *tna*) in different developmental processes is just starting to emerge. The requirement of SUMOylation and of *tna* to maintain gene expression makes that the next challenges will be to find the SUMOylation and *tna* targets *in vivo* and to understand the consequences of this modification in proteins involved in chromatin dynamics and in gene expression.

Supporting Information

Figure S1 The TnaA_{XSPRING} and Osa antibodies immunoprecipitate TnaA and Osa proteins, respectively. (A) TnaA was immunoprecipitated from 3–21 hour embryo-soluble nuclear fraction (500 µg) using TnaA_{XSPRING} antibody (1 µg). The Western was revealed with TnaA_{XSPRING} (1:100). The three panels correspond to films with increasing exposure times. Input (In), Preclearing 1 (Pc1), Unbound (Ub), and Bound (B). Mock (M) where the immunoprecipitation was done with the equivalent amount of a preimmune serum instead of TnaA_{XSPRING}. (B) Osa protein was immunoprecipitated from 3–21 hour embryos soluble extract (3.7 mg) with the Osa antibody (1 µg). For Osa detection, the Western was revealed with Osa antibody (1:1000). Lanes are labeled as above. The equivalent amount of an irrelevant antibody was used as mock. Molecular weight markers are indicated (left). (TIF)

Figure S2 Negative controls of TnaA and Osa immunoprecipitations. (A) TnaA antibodies do not coimmunoprecipitate Hsp70 (Bound, lane B) from a 3–21 hour embryos soluble nuclear fraction (immunoprecipitation shown in Fig. S1A), meanwhile Hsp70 is present in the input (In) and unbound (Ub) samples. The other lanes are preclearing 1 (Pc1), and mock (M) samples. (B) The Osa antibody do not coimmunoprecipitate Cdk7 (immunoprecipitation shown in Fig. S1B). The assays were done as in (A). Lanes are labeled as above. (TIF)

Acknowledgments

We thank the Bloomington *Drosophila* Stock Center for providing stocks. We also thank Luis Gutiérrez for TnaA cDNA clones in pGEX vectors, J. Riesgo-Escovar for providing the Gold collection Ubc9 clone, V. Valadez-Graham for assistance in this work, Carmen Muñoz for technical assistance and R. Vera, and J. A. Kassis for critical reading of the manuscript. We thank the two anonymous reviewers for valuable suggestions.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JMV LGA JAK MV. Performed the experiments: JMV RAJU ZPS. Analyzed the data: JMV RAJU ZPS LGA MZ JAK MV. Contributed reagents/materials/analysis tools: MZ JAK MV. Wrote the paper: JMV JAK MV.

References

- Geiss-Friedlander R, Melchior F (2007) Concepts in SUMOylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 947–956.
- Rodríguez MS, Dargemont C, Hay RT (2001) SUMO-1 conjugation *in vivo* requires both a consensus modification motif and nuclear targeting. *J Biol Chem* 276: 12654–12659.
- Nie M, Xie Y, Loo JA, Courey AJ (2009) Genetic and proteomic evidence for roles of *Drosophila* SUMO in cell cycle control, Ras signaling, and early pattern formation. *PLoS One* 4: e5905.
- Gareau JR, Lima CD (2010) The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 861–871.

5. Gutiérrez L, Zurita M, Kennison JA, Vázquez M (2003) The *Drosophila* trithorax group gene *tonalli* (*tna*) interacts genetically with the Brahma remodeling complex and encodes an SP-RING finger protein. *Development* 130: 343–354.
6. Kennison JA, Tamkun JW (1988) Dosage-dependent modifiers of Polycomb and Antennapedia mutations in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 8136–8140.
7. Tamkun JW, Deuring R, Scott MP, Kissinger M, Pattatucci AM, et al. (1992) *brahma*: a regulator of *Drosophila* homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Cell* 68: 561–572.
8. Vázquez M, Moore L, Kennison JA (1999) The trithorax group gene *osa* encodes an ARID-domain protein that genetically interacts with the Brahma chromatin-remodeling factor to regulate transcription. *Development* 126: 733–742.
9. Mohrmann L, Langenberg K, Krijgsveld J, Kal AJ, Heck AJ, et al. (2004) Differential targeting of two distinct SWI/SNF-related *Drosophila* chromatin-remodeling complexes. *Mol Cell Biol* 24: 3077–3088.
10. Lawrence PA, Morata G (1994) Homeobox genes: their function in *Drosophila* segmentation and pattern formation. *Cell* 78: 181–189.
11. Maeda R, Karch F (2006) The ABC of the BX-C: the bithorax complex explained. *Development* 133: 1413–1444.
12. Talamillo A, Sanchez J, Barrio R (2008) Functional analysis of the SUMOylation pathway in *Drosophila*. *Biochem Soc Trans* 36: 868–873.
13. Lomeli H, Vázquez M (2011) Emerging roles of the SUMO pathway in development. *Cell Mol Life Sci* 68: 4045–4064.
14. Hari K L, Cook KR, Karpen GH (2001) The *Drosophila* *Su(var)2-10* locus regulates chromosome structure and function and encodes a member of the PIAS protein family. *Genes Dev* 15: 1334–1348.
15. Kamakaka RT, Tyree CM, Kadonaga JT (1991) Accurate and efficient RNA polymerase II transcription with a soluble nuclear fraction derived from *Drosophila* embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 1024–1028.
16. Elfiring IK, Daniel C, Papoulas O, Deuring R, Sarte M, et al. (1998) Genetic analysis of *brahma*: the *Drosophila* homolog of the yeast chromatin remodeling factor SWI2/SNF2. *Genetics* 148: 251–265.
17. McQuilton P, St Pierre SE, Thurmond J, Consortium F (2012) FlyBase 101-the basics of navigating FlyBase. *Nucleic Acids Res* 40: D706–D714.
18. Smith D, Corcoran L (2001) Expression and purification of glutathione-S-transferase fusion proteins. In: Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore D, Seidman J, Smith J, Struhl K, Editors. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley and Sons. 16.7.1–16.7.
19. Cooper H, Paterson Y (2004) Preparation of polyclonal antisera. In: Bonifacio J, Dasso M, Harford J, Lippincott-Schwartz J, Yamada K, Editors. *Current Protocols in Cell Biology*. New York: John Wiley and Sons. 16.2.1–16.2.8.
20. Koelle MR, Horvitz HR (1996) EGL-10 regulates G protein signaling in the *C. elegans* nervous system and shares a conserved domain with many mammalian proteins. *Cell* 84: 115–125.
21. Vikis HG, Guan KL (2004) Glutathione-S- based assays for studying protein-protein interactions. *Methods Mol Biol* 261: 175–186.
22. Leclerc V, Tassan JP, O'Farrell PH, Nigg EA, Leopold P (1996) *Drosophila* Cdk8, a kinase partner of Cyclin C that interacts with the large subunit of RNA polymerase II. *Mol Biol Cell* 7: 505–513.
23. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 7.26 p.
24. Tang Z, Hecker CM, Scheschonka A, Betz H (2008) Protein interactions in the SUMOylation cascade: lessons from X-ray structures. *FEBS J* 275: 3003–3015.
25. Apionishev S, Malhotra D, Raghavachari S, Tanda S, Rasooly RS (2001) The *Drosophila* Ubc9 homologue *lesswright* mediates the disjunction of homologues in meiosis I. *Genes Cells* 6: 215–224.
26. Sun X, Huang L, Van Doren MR, Tanda S (2003) Isolation of amorphic alleles of the *lesswright* gene by P element-mediated male recombination in *Drosophila melanogaster*. *Drosophila Information Service* 86: 79–83.
27. Schnorr JD, Holdcraft R, Chevalier B, Berg CA (2001) *Ras1* interacts with multiple new signaling and cytoskeletal loci in *Drosophila* eggshell patterning and morphogenesis. *Genetics* 159: 609–622.
28. Andres AJ, Thummel CS (1994) Methods for quantitative analysis of transcription in larvae and prepupae. *Methods Cell Biol* 44: 565–573.
29. Talamillo A, Sánchez J, Cantera R, Pérez C, Martín D, et al. (2008) Smt3 is required for *Drosophila melanogaster* metamorphosis. *Development* 135: 1659–1668.
30. Corona DF, Armstrong JA, Tamkun JW (2003) Genetic and cytological analysis of *Drosophila* chromatin-remodeling factors. *Methods Enzymol* 377: 70–85.
31. Rebay I, Fehon R (2000) Generating antibodies against *Drosophila* proteins. In: Sullivan W, Ashburner M, Hawley R, editors. *Drosophila Protocols*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 389–411.
32. Ren J, Gao X, Jin C, Zhu M, Wang X, et al. (2009) Systematic study of protein SUMOylation: development of a site-specific predictor of SUMOsp 2.0. *Proteomics* 9: 3409–3412.
33. Kerscher O (2007) SUMO junction-what's your function? New insights through SUMO-interacting motifs. *EMBO Rep* 8: 550–555.
34. Kanakousaki K, Gibson MC (2012) A differential requirement for SUMOylation in proliferating and non-proliferating cells during *Drosophila* development. *Development* 139: 2751–2762.
35. Huang L, Ohsako S, Tanda S (2005) The *lesswright* mutation activates Rel-related proteins, leading to overproduction of larval hemocytes in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 280: 407–420.
36. Chiu H, Ring BC, Sorrentino RP, Kalamaz M, Garza D, et al. (2005) *dubc9* negatively regulates the Toll-NF- κ B pathways in larval hematopoiesis and *drosomycin* activation in *Drosophila*. *Dev Biol* 288: 60–72.
37. Kahyo T, Nishida T, Yasuda H (2001) Involvement of PIAS1 in the SUMOylation of tumor suppressor p53. *Mol Cell* 8: 713–718.
38. Nishida T, Yasuda H (2002) PIAS1 and PIASx α function as SUMO E3 ligases toward androgen receptor and repress androgen receptor-dependent transcription. *J Biol Chem* 277: 41311–41317.
39. Takahashi Y, Kikuchi Y (2005) Yeast PIAS-type Ull1/Siz1 is composed of SUMO ligase and regulatory domains. *J Biol Chem* 280: 35822–35828.
40. Wu JI, Lessard J, Crabtree GR (2009) Understanding the words of chromatin regulation. *Cell* 136: 200–206.
41. Rosonina E, Duncan SM, Manley JL (2010) SUMO functions in constitutive transcription and during activation of inducible genes in yeast. *Genes Dev* 24: 1242–1252.
42. van Wijk SJ, Muller S, Dikic I (2011) Shared and unique properties of ubiquitin and SUMO interaction networks in DNA repair. *Genes Dev* 25: 1763–1769.
43. Iyengar S, Farnham PJ (2011) KAP1 protein: an enigmatic master regulator of the genome. *J Biol Chem* 286: 26267–26276.
44. Hargreaves DC, Crabtree GR (2011) ATP-dependent chromatin remodeling: genetics, genomics and mechanisms. *Cell Res* 21: 396–420.
45. Li XS, Trojer P, Matsumura T, Treisman JE, Tanese N (2010) Mammalian SWI/SNF-A subunit BAF250/ARID1 is an E3 ubiquitin ligase that targets histone H2B. *Mol Cell Biol* 30: 1673–1688.
46. Ullmann R, Chien CD, Avantaggiati ML, Muller S (2012) An acetylation switch regulates SUMO-dependent protein interaction networks. *Mol Cell* 46: 759–770.
47. Dhalluin C, Carlson JE, Zeng L, He C, Aggarwal AK, et al. (1999) Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* 399: 491–496.
48. Smith M, Mallin DR, Simon JA, Courey AJ (2011) Small ubiquitin-like modifier (SUMO) conjugation impedes transcriptional silencing by the Polycomb group repressor Sex Comb on Midleg. *J Biol Chem* 286: 11391–11400.
49. Takahashi Y, Iwase M, Strunnikov AV, Kikuchi Y (2008) Cytoplasmic SUMOylation by PIAS-type Siz1-SUMO ligase. *Cell Cycle* 7: 1738–1744.
50. Castillo-Lluya S, Tatham MH, Jones RC, Jaffray EG, Edmondson RD, et al. (2010) SUMOylation of the GTPase Rac1 is required for optimal cell migration. *Nat Cell Biol* 12: 1078–1085.
51. Vázquez M, Cooper MT, Zurita M, Kennison JA (2008) γ Tab23C interacts genetically with Brahma chromatin-remodeling complexes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 180: 835–843.
52. Sharrocks AD (2006) PIAS proteins and transcriptional regulation—more than just SUMO E3 ligases? *Genes Dev* 20: 754–758.
53. Lee H, Quinn JC, Prasanth KV, Swiss VA, Economides KD, et al. (2006) PIAS1 confers DNA-binding specificity on the Mx1 homeoprotein. *Genes Dev* 20: 784–794.
54. Rytinki MM, Kaikkonen S, Pehkonen P, Jaaskelainen T, Palmvo JJ (2009) PIAS proteins: pleiotropic interactors associated with SUMO. *Cell Mol Life Sci* 66: 3029–3041.
55. Song YJ, Lee H (2011) PIAS1 negatively regulates ubiquitination of Mx1 homeoprotein independent of its SUMO ligase activity. *Mol Cells* 32: 221–226.
56. Belaguli NS, Zhang M, García AH, Berger DH (2012) PIAS1 is a GATA4 SUMO ligase that regulates GATA4-dependent intestinal promoters independent of SUMO ligase activity and GATA4 SUMOylation. *PLoS One* 7: e35717.
57. Daniels M, Shimizu K, Zorn AM, Ohnuma S (2004) Negative regulation of Smad2 by PIASy is required for proper *Xenopus* mesoderm formation. *Development* 131: 5613–5626.
58. Huang CY, Beliakoff J, Li X, Lee J, Sharma M, et al. (2005) hZimp7, a novel PIAS-like protein, enhances androgen receptor-mediated transcription and interacts with SWI/SNF-like BAF complexes. *Mol Endocrinol* 19: 2915–2929.
59. Lee J, Beliakoff J, Sun Z (2007) The novel PIAS-like protein hZimp10 is a transcriptional co-activator of the p53 tumor suppressor. *Nucleic Acids Res* 35: 4523–4534.

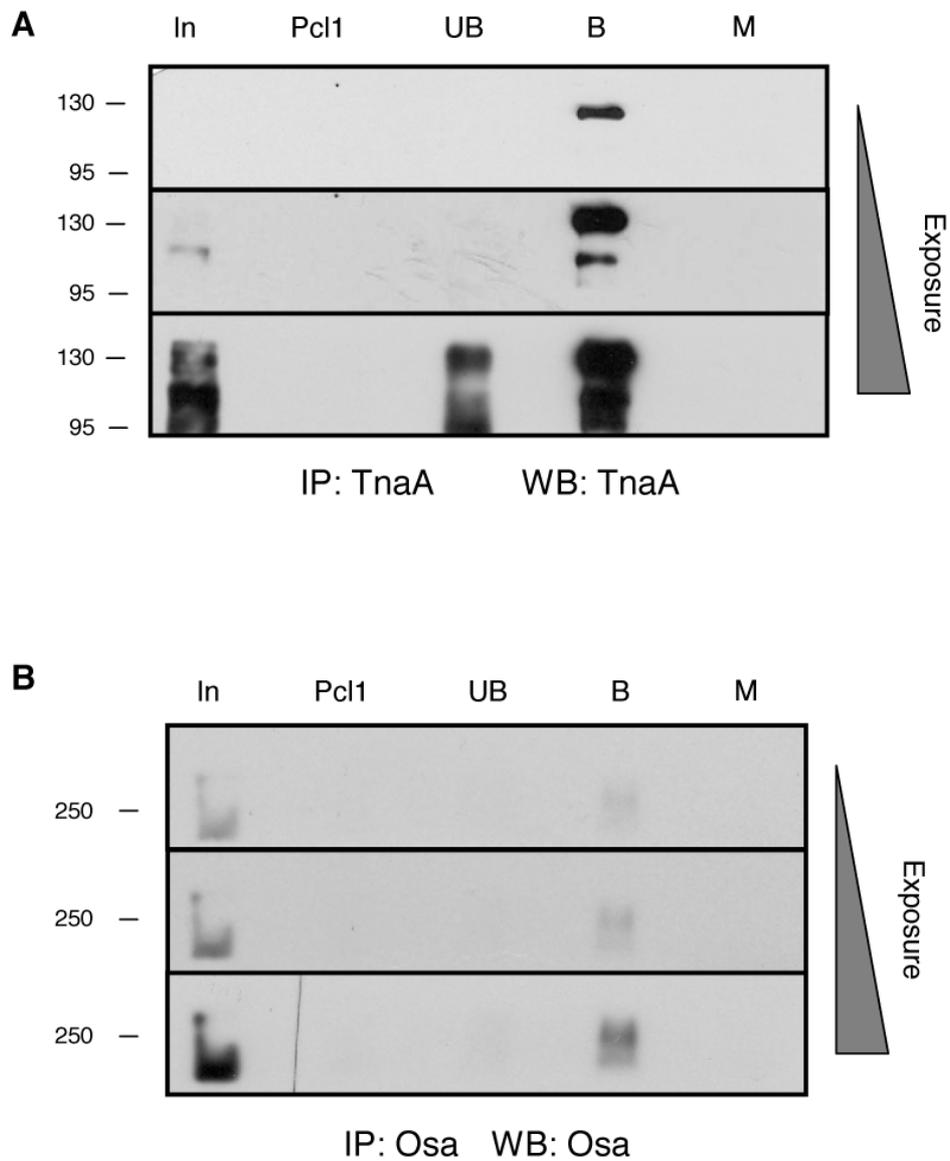


Fig. S1. The TnaA_{XSPRING} and Osa antibodies immunoprecipitate TnaA and Osa proteins, respectively. (A) TnaA was immunoprecipitated from 3-21 hour embryo-soluble nuclear fraction (500 µg) using TnaA_{XSPRING} antibody (1 µg). The Western was revealed with TnaA_{XSPRING} (1:100). The three panels correspond to films with increasing exposure times. Input (In), Preclearing 1 (Pcl1), Unbound (Ub), and Bound (B). Mock (M) where the immunoprecipitation was done with the equivalent amount of a preimmune serum instead of TnaA_{XSPRING}. (B) Osa protein was immunoprecipitated from 3-21 hour embryos soluble extract (3.7 mg) with the Osa antibody (1 µg). For Osa detection, the Western was revealed with Osa antibody (1:1000). Lanes are labeled as above. The equivalent amount of an irrelevant antibody was used as mock. Molecular weight markers are indicated (left).

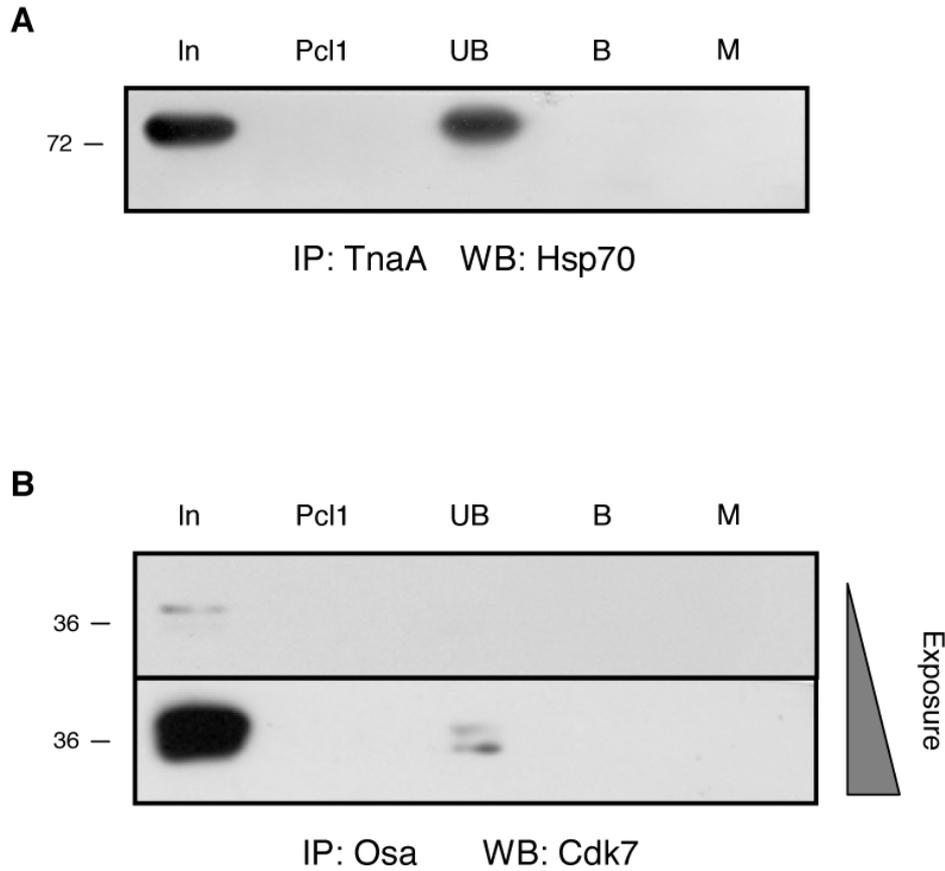


Fig. S2. Negative controls of TnaA and Osa immunoprecipitations. (A) TnaA antibodies do not coimmunoprecipitate Hsp70 (Bound, lane B) from a 3-21 hour embryos soluble nuclear fraction (immunoprecipitation shown in Fig. S1A), meanwhile Hsp70 is present in the input (In) and unbound (Ub) samples. The other lanes are preclearing 1 (Pcl1), and mock (M) samples. (B) The Osa antibody do not coimmunoprecipitate Cdk7 (immunoprecipitation shown in Fig. S1B). The assays were done as in (A). Lanes are labeled as above.

A continuación se detallan experimentos que no se incluyeron en el artículo que son el resultado de estrategias que abordamos pero que decidimos no continuar o que siguen en proceso.

Estrategias para identificar proteínas que interaccionan físicamente con dominios de TnaA.

Previamente en nuestro laboratorio se identificaron genes que interaccionan con *tna* (Guiérrez *et al.*, 2003). Sin embargo, las interacciones genéticas no necesariamente son el reflejo de las interacciones físicas. Por lo que uno de los objetivos principales de este trabajo era identificar proteínas que interaccionan físicamente con TnaA, lo cual nos permitiría conocer más en cuanto a su papel en la célula. Los ensayos de interacción física como el sistema de doble híbrido de levadura, “Pull-downs” y coimmunoprecipitaciones, nos permitieron demostrar que TnaA interacciona físicamente con Ubc9 (enzima E2 conjugante de SUMO) (Figura 5B y 5C del artículo) y con Osa (subunidad exclusiva del complejo BAP) (Figura 5B, 5D y 5E del artículo). Además de los ensayos de interacción física antes mencionados, se realizaron otros que a continuación se describen.

1. Detección de proteínas que interaccionan con TnaA_{NH2} por Far Western.

Al inicio de este trabajo, se realizaron ensayos de interacción física tipo Far Western como se describe en Wu *et al.* (2007) (ver detalles en el Anexo I). Con estos ensayos, nosotros esperábamos encontrar bandas cuyos pesos moleculares coincidieran con los de las proteínas codificadas por los genes identificados por Gutiérrez y colaboradores (2003), los cuales interaccionan genéticamente con *tna*. Los pesos moleculares (PM) predichos de algunas de las proteínas codificadas por los genes que interaccionan con *tna* se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Pesos moleculares predichos de las proteínas codificadas por los genes que interaccionan genéticamente con *tna* (Gutiérrez *et al.*, 2003).

Proteína	PM* (kDa)
Brahma	184.6 y 185.1
Osa	269, 284.1, 282.9,
Moirá	131.4
Taranis	96.2 y 95.7
Kismet	573.6, 224.7 y 593.4
Skuld	280 y 295.7

*PM: Peso molecular

La técnica de Far Western es una modificación de un ensayo tipo Western en donde se incubaba con una proteína carnada a las proteínas de un extracto proteico que han sido previamente separadas por electroforesis y transferidas a membranas de nitrocelulosa. Posteriormente, para detectar a las proteínas que interaccionaron con la carnada se realiza un ensayo tipo Western con un anticuerpo que reconozca a la carnada. Las carnadas GST-TnaA_{NH2-1} descrito en el artículo y GST (como control negativo) se incubaron con membranas que contenían las proteínas de 80 µg de un extracto nuclear de embriones de *D. melanogaster* de 3-21 h de desarrollo (detalles de la obtención de este extracto proteico en Materiales y Métodos del artículo). Esta etapa se eligió debido a que sabíamos que TnaA está presente en este momento del desarrollo (Figura 2B del artículo). Posteriormente, se realizó un ensayo tipo Western con el anticuerpo TnaA_{NH2-1} en las membranas incubadas con la carnada GST-TnaA_{NH2-1} ó con GST y se compararon los resultados.

En un Western de extracto nuclear de embriones de *D. melanogaster* de 3-21 h el anticuerpo TnaA_{NH2-1} detecta a TnaA₁₂₃ (Figura 2A del artículo) y es lo que se esperaría ver cuando la carnada utilizada es GST en el ensayo de Far-Western (Figura 5, izq.). En contraste, con la carnada GST-TnaA_{NH2-1} además de observar a TnaA₁₂₃, se observan bandas con las que interaccionó el dominio NH₂ de TnaA y que tienen un peso molecular (PM) de 216, 207, 167, 140, 129 y 118 kDa, (X1 a X6, respectivamente) (Figura 5, der.). Los pesos moleculares de algunas de estas bandas están en el rango de peso de algunas de las proteínas con las que *tna* interacciona genéticamente (Gutiérrez *et al.*, 2003) y que se muestran en la Tabla 1.

Para poder identificar a las proteínas que interaccionan con el dominio NH₂ de TnaA se decidió secuenciar por MALDI-TOF, para lo cual es necesario cambiar las membranas de nitrocelulosa por las de PVDF (Polyvinylidene difluoride). Lamentablemente, los ensayos de Far Western no se pudieron reproducir cuando se usaron las membranas de PVDF ya que se obtenía mucha señal de fondo y por lo tanto se continuó con la búsqueda de proteínas que interaccionan con TnaA mediante otras técnicas.

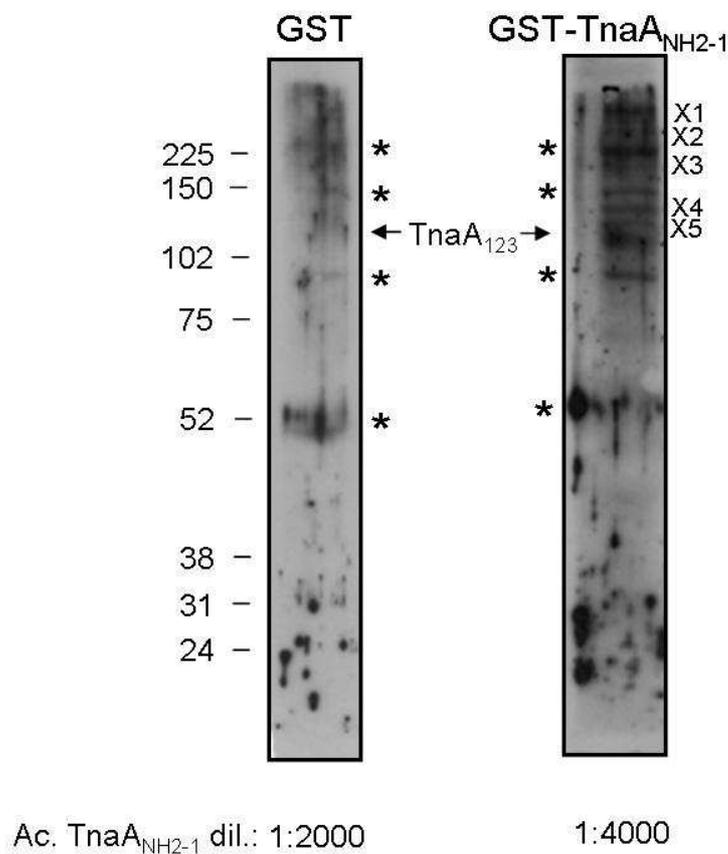


Figura 5. Detección de proteínas de un extracto nuclear de embriones que interaccionan con TnaA_{NH2-1} por Far Western. Este experimento es representativo de varios ensayos realizados en diferentes condiciones. Las proteínas de un extracto nuclear de embriones de 3-21 h (aprox. 80 µg) se separaron por SDS-PAGE y se electrotransferieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se incubaron con GST (3 µg) y con GST-TnaA_{NH2-1} (3 µg) y posteriormente se revelaron con el anticuerpo TnaA_{NH2-1} (1:2000 y 1:4000, respectivamente. Cuando se usó la carnada TnaA_{NH2-1} se tuvo que hacer el Western con una dilución mayor a cuando se usó a GST debido a que el anticuerpo reconoce fuertemente a la carnada y se obtenía mucha señal). Las bandas indicadas con asteriscos corresponde a señales inespecíficas del anticuerpo TnaA_{NH2-1} que se dejaron de ver cuando el anticuerpo se purificó por afinidad (ver Figura 2A del artículo).

2. Ensayos de interacción física por el sistema de doble híbrido de levadura.

Otra de las estrategias utilizadas para identificar proteínas que interaccionan con TnaA fueron los ensayos de doble híbrido de levadura (detalles en Materiales y Métodos del artículo y en el Anexo II). En el artículo se muestran los fragmentos de TnaA que interaccionan físicamente con Ubc9 y con el fragmento Osa_{C2} (fragmento correspondiente a los aminoácidos 1951 a 2600 de la proteína Osa. Figura 5A del artículo), por ensayos de interacción en el sistema de doble híbrido de levadura uno a uno, es decir cada carnada se probó contra cada presa (Figura 5B del artículo). Además de probar las interacciones físicas por doble híbrido de levadura uno a uno, en el transcurso de este trabajo se trató de identificar a proteínas que interaccionan con los dominios de TnaA a partir de una biblioteca de expresión de ADNc construida a partir de ARNm poliadenilado de embriones de 3-21 h (detalles metodológicos en el Anexo II). En esta búsqueda masiva, nosotros esperábamos encontrar proteínas codificadas por los genes identificados por Gutiérrez y colaboradores (2003) con los cuales *tna* interacciona. También nosotros esperábamos identificar proteínas que estuvieran relacionadas en la regulación transcripcional de genes debido a que *tna* y los genes con los que interacciona, se requieren para la expresión de los genes homeóticos (Gutiérrez *et al.*, 2003). Recordemos que TnaA tiene un dominio SP-RING que se ha visto que, en otras proteínas, interacciona físicamente con Ubc9 (Nishida y Yasuda, 2002; Takahashi y Kikuchi, 2005). Por lo que nosotros esperábamos identificar en esta búsqueda por lo menos a Ubc9.

La biblioteca de ADNc se hizo de la etapa del desarrollo mencionada debido a que en experimentos previos se determinó que TnaA está presente en esta etapa (Figura 2B del artículo). Como las proteínas cuyos genes interaccionan con *tna* (Gutiérrez *et al.*, 2003) son muy grandes (Tabla 1) se tuvo mucho cuidado en mantener la integridad de los ARNm y para la síntesis de ADNc se utilizaron cebadores aleatorios con la finalidad de que los extremos amino de los transcritos estuvieran representados en igual proporción que los extremos carboxilo de las proteínas de interés, lo cual no hubiera ocurrido si la biblioteca se hubiera construido con oligo-dT, ya que con este último cebador los extremos carboxilo de los transcritos se sobrerrepresentan. El título de la biblioteca fue de 159 000 000 UFC/ml cuando lo recomendado por el proveedor es de mayor o igual a 20 000 000 UFC/ml. Por el método de construcción de la biblioteca solo un tercio de las clonas contienen fragmentos clonados en el marco de lectura correcto y aunque el título es alto no sabemos cuántas UFC son clonas independientes y qué cobertura tiene la biblioteca con respecto al juego inicial de ARNm del que se partió.

En los experimentos piloto para rastrear la biblioteca encontramos que TnaA completa activa por sí misma (sin necesidad que haya una proteína interaccionante) la transcripción de dos genes reporteros (ver Anexo II) y no se puede utilizar como carnada (Figura 5B del artículo). Por esta razón, TnaA se dividió en diferentes fragmentos (Figura 1 del artículo). Nuevamente se comprobó cuáles de estas carnadas pueden activar por sí mismas a los reporteros (Figura 5B del artículo). De las que funcionan para el sistema de doble híbrido se escogió como carnada para analizar la biblioteca, la que contiene el fragmento denominado TnaA_{SP-COO QL_{ess}} debido a que contiene al dominio SP-RING. Con estos experimentos esperábamos identificar proteínas que interaccionen con el SP-RING, en particular a la E2 de la vía de SUMOilación, Ubc9 ya que se ha reportado que interacciona físicamente con el mencionado dominio (Nishida y Yasuda, 2002; Takahashi y Kikuchi, 2005). Además, nosotros esperábamos identificar otras proteínas que pudieran ser blancos de SUMOilación. En este ensayo de interacción física se decidió evaluar la expresión de dos genes reporteros (ver Anexo II) y en todos los casos donde se obtuvieron clonas positivas se corroboró por secuencia que el fragmento clonado expresara el marco de lectura correcto para las proteínas mencionadas. Las clonas positivas que no tenían fragmentos correspondientes a proteínas fueron descartadas (8%). En este ensayo encontramos varias proteínas (Tabla 2) pero ninguna fue de las esperadas por los ensayos de interacción genética (Tabla 1) o que pareciera estar involucrada en la transcripción de genes o por lo menos a Ubc9. Las proteínas identificadas con la carnada TnaA_{SP-COO QL_{ess}} corresponden a nuevas interacciones que pudieran ser el reflejo de la diversidad de las funciones de TnaA y por lo tanto resultan ser interesantes. En caso de querer profundizar en el estudio de TnaA y las proteínas que se identificaron con esta estrategia es necesario realizar experimentos complementarios como coimmunoprecipitaciones para validar dichas interacciones, tal y como se hizo para las interacciones TnaA-Ubc9 o TnaA-Osa (Figura 5C, 5D y 5E). La Figura 6 muestra la zona de cada proteína que interacciona con la carnada TnaA_{SP-COO QL_{ess}}.

Tabla 2. Proteínas que interactuaron físicamente con la carnada TnaA_{SP-COO QL_{ess}}. Estas proteínas se identificaron en ensayos de interacción física por doble híbrido de levadura. ^a Número de veces que apareció dicha proteína como interaccionante físico.

Proteína	# ^a	Descripción
DnaJ-1	29	Cochaperona molecular que regula la actividad de Hsp70 quien, junto con Hsp90, constituyen el FOLDOSOMA, complejo que se encarga del plegamiento correcto de las proteínas (revisado en Pratt y Toft, 2003).
Xrp1	4	Proteína del “High Mobility Group-I(Y)” involucrada en el mecanismo de respuesta a la radiación ionizante de manera dependiente a p53. Xrp1 está relacionada con mantener la estabilidad genómica además de que su inducción resulta en la interrupción del ciclo celular (Akdemir <i>et al.</i> , 2007).
TweedleC	3	La familia Tweedle, compuesta por 27 miembros en <i>D. melanogaster</i> , consiste en proteínas cuticulares que se encuentran conservadas en los insectos (Guan <i>et al.</i> , 2006).
Pde8	2	Fosfodiesterasa 8 que presenta un 30% de identidad con el ortólogo humano y un 60% de identidad en el dominio catalítico. Debido a la similitud se piensa que mantiene la especificidad hacia el AMPc y que participa en la transducción de señales, tal como lo hace el ortólogo humano (Day <i>et al.</i> , 2005).
Double parked (DUP)	1	La proteína DUP pertenece a una familia de proteínas involucradas en la replicación del ADN conservada en eucariontes. Las mutantes en <i>dup</i> presentan letalidad en etapas embrionarias y problemas en las fases S y M del ciclo celular (Whittaker <i>et al.</i> , 2000).
CG12065	1	Presenta un dominio por el cual se sugiere que está involucrado en el metabolismo de nucleótidos (McQuilton <i>et al.</i> , 2012).
CG17162	1	No hay datos disponibles.

En este tipo de ensayos de interacción, el éxito de lograr identificar una proteína determinada depende de la carnada. Debido a que ninguna de las proteínas interaccionantes obtenidas con la carnada TnaA_{SP-COO QL_{ess}} en este análisis pareciera estar involucrada en favorecer la transcripción de los genes homeóticos, se decidió probar directamente si TnaA completa o sus fragmentos interaccionaban con Ubc9 o con Osa_{C2} (Figura 5B del artículo). Los ensayos de interacción física uno a uno corroboraron que la carnada TnaA_{SP-COO QL_{ess}} no interacciona con Ubc9 pero sí la carnada TnaA_{XSPRING2} (Figura 5B del artículo). La carnada TnaA_{XSPRING2} contiene además del dominio SP-RING otra región localizada hacia el extremo amino que no está presente en la carnada TnaA_{SP-COO QL_{ess}} (Figura 1 del artículo). Este dato nos indica que en *D. melanogaster* el SP-RING no es suficiente para la interacción con Ubc9 sino que requiere de otras regiones de TnaA.

Debido a que la carnada TnaA_{XSPRING2} sí interacciona con Ubc9, se decidió utilizar esta carnada para buscar proteínas interaccionantes de TnaA en nuestra biblioteca con el mismo protocolo que el utilizado con la carnada TnaA_{SP-COO} _{QLess}. En este ensayo de interacción se utilizaron dos genes reporteros y se obtuvieron 55 colonias diploides y todas contenían un inserto del mismo tamaño. El ADN de *D. melanogaster* clonado en los plásmidos de tres de estas colonias se secuenció y se identificó la secuencia RVCPSCKCYMYSGIKLIYQNPD, la cual no está presente en ninguna de las proteínas de la mosca. Sin embargo, la secuencia nucleotídica corresponde al extremo carboxilo del gen *CtsB1* (*CG10992*) que codifica para la Catapsina B1 (peptidasa de cisteínas). Durante la construcción de la biblioteca se clonó este fragmento del gen *CtsB1* en un marco de expresión incorrecto, lo cual generó que se expresara el péptido antes mencionado.

Con la carnada TnaA_{SP-COO} _{QLess} se obtuvieron proteínas que interaccionan las cuales no parecieran estar involucradas en la regulación transcripcional de genes, mientras que con la carnada TnaA_{XSPRING2} se obtuvo un péptido que no está presente en ninguna de las proteínas de la mosca. Otra estrategia para identificar proteínas interaccionantes de TnaA por doble híbrido es la que se siguió en el artículo, en donde se realizaron ensayos de interacción física uno a uno. Para esto se requiere clonar fragmentos de proteínas de algunas subunidades del PcG o del trxG, o de alguna otra proteína que pudiera estar relacionada con TnaA y determinar si interacciona físicamente con TnaA. Una alternativa al Far Western es inmunoprecipitar a TnaA como se reportó en el artículo pero partiendo de una cantidad mucho mayor de extracto proteico. Las proteínas interaccionantes se podrían identificar por secuenciación por espectrometría de masas.

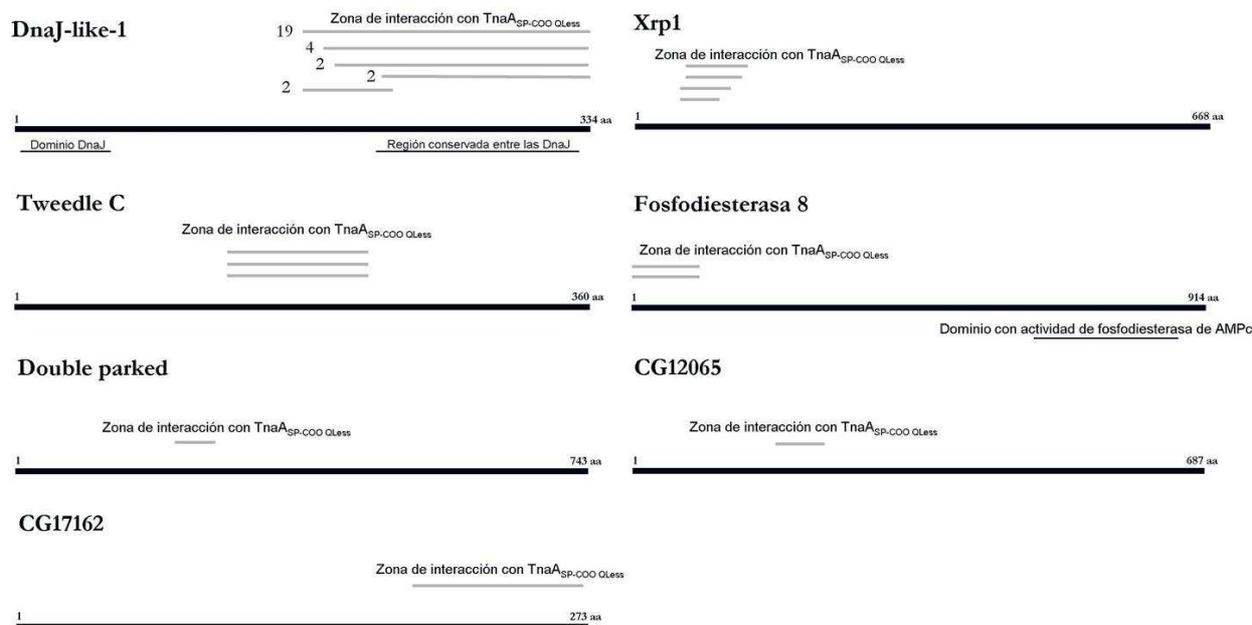


Figura 6. Zonas de interacción de las proteínas detectadas en la biblioteca. Esquema de las regiones de las proteínas que interaccionaron por ensayos de doble híbrido de levadura con la carnada $TnaA_{SP-COO}^{QLess}$. Las proteínas están indicadas por una raya horizontal gruesa y no están a escala. En la parte derecha de estas líneas se indica el número de aminoácidos de cada proteína. En la parte superior de cada proteína se indica con una raya horizontal delgada la zona de interacción con la carnada $TnaA_{SP-COO}^{QLess}$ y si es el caso, el número a la izquierda de estas líneas indica el número de veces que se obtuvo una clona determinada. La ausencia de número indica que el fragmento interaccionante se obtuvo una sola vez. En la parte inferior de algunas proteínas se muestran los dominios característicos.

Interacciones genéticas entre *tna*, *osa* y genes de la vía de SUMOilación

1. Detección de las proteínas TnaA en líneas con mutaciones en *tna*.

En el laboratorio contamos con diferentes alelos de *tna*. Las lesiones de cada uno de ellos nos hacían presumir que los individuos que los portaban podrían tener dosis menores de TnaA. En el artículo se muestra la caracterización fenotípica de los individuos con genotipo tna^1/tna^5 (Figura 3 del artículo) y ahí demostramos que tna^1 produce una proteína truncada de aproximadamente 58 kDa que actúa como dominante negativa. El alelo tna^1 se obtuvo por mutación inducida con EMS que causó el cambio de la glutamina 566 a un codón de paro (Gutiérrez *et al.*, 2003) mientras que el lado tna^5 no ha sido caracterizado a nivel molecular y no sabemos qué tipo de proteína(s) produce. Además también realizamos estudios preliminares con otros alelos que no incluimos en el artículo. Los alelos tna^2 y tna^3 son alelos correspondientes a inserciones del elemento P en la zona 5' del gen y los individuos con genotipo tna^1/tna^2 y tna^1/tna^3 mueren principalmente como larvas de tercer instar (Gutiérrez *et al.*,

2003). Como referencia, recordemos que los niveles de TnaA disminuyen en la transición de L1 a L3 en larvas silvestres (carriles 1 y 2 de la Figura 7 y Figura 2B del artículo).

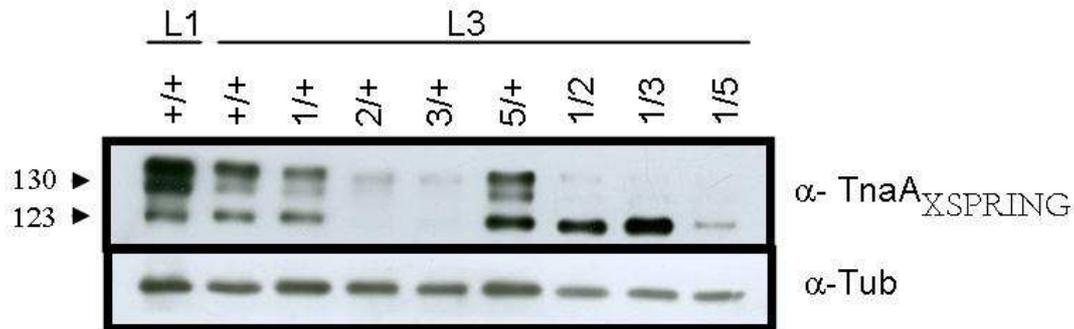


Figura 7. Detección de las proteínas TnaA en larvas de tercer instar mutantes de *tna*. Detección de TnaA₁₃₀ y TnaA₁₂₃ (TnaA_{XSPRING}, 1:100) en extractos proteicos de individuos en las etapas larvárias L1 y L3 de individuos silvestres (en los carriles L1 y L3 +/+) y L3 de individuos mutantes [+/*tna*¹ (1/+), +/*tna*² (2/+), +/*tna*³ (3/+), +/*tna*⁵ (5/+), *tna*¹/*tna*² (1/2), *tna*¹/*tna*³ (1/3) y *tna*¹/*tna*⁵ (1/5)]. El anticuerpo anti-tubulina se utilizó como control de carga a una dilución 1:1000.

En todos los casos analizados, los individuos heterocigos (+/alelo mutante) sobreviven normalmente. Es por esto que llamó nuestra atención que las larvas con genotipos +/*tna*² y +/*tna*³ (carriles 2/+ y 3/+) presentan niveles prácticamente no detectables de TnaA₁₂₃ y muy baja concentración de TnaA₁₃₀. En los individuos con las combinaciones heteroalélicas de *tna*¹ con *tna*² o con *tna*³ se observa la desaparición casi completa de TnaA₁₃₀ y el aumento de TnaA₁₂₃ en las larvas con genotipos *tna*¹/*tna*² y *tna*¹/*tna*³ (carriles 1/2 y 1/3, respectivamente). En el artículo mostramos que el alelo *tna*¹ genera un producto trunco (Figura 3A del artículo). La explicación de cómo el producto trunco del alelo *tna*¹ en combinación con los alelos *tna*² y *tna*³ puede influir tan dramáticamente en los niveles de TnaA₁₂₃ es aún una asignatura pendiente. *tna*¹ tiene intacta las zonas en las que se insertó el transposón en los alelos *tna*² y *tna*³ y una posible explicación es que esas zonas sean regiones regulatorias que pueden complementar en *trans*. En las larvas con genotipo *tna*¹/*tna*⁵ se disminuye drásticamente el nivel de TnaA₁₃₀ y ligeramente el nivel de TnaA₁₂₃ en comparación a las larvas heterocigas o del tipo silvestre. La expresión de las proteínas Tna durante el desarrollo (Figura 2B del artículo) sugiere que TnaA₁₃₀ quizás es la precursora de TnaA₁₂₃. Por otro lado, TnaA₁₂₃ se encuentra enriquecida en el núcleo mientras que TnaA₁₃₀ lo está en el citoplasma por lo que la mortalidad en las líneas *tna*¹/*tna*² y *tna*¹/*tna*³ en larvas, pupas o faratos se puede deber a la falta de la función de TnaA₁₃₀ en el citoplasma debido a un elevado procesamiento para dar lugar a TnaA₁₂₃ y su posterior exportación

al núcleo. Por otro lado, si TnaA₁₃₀ y TnaA₁₂₃ son dos isoformas independientes entonces la mortalidad se puede deber a dos factores: a) la falta de expresión de TnaA₁₃₀ y b) la sobreexpresión de TnaA₁₂₃ o c) un efecto debido a la combinación de a) y b). En el caso de los individuos con genotipo *tna¹/tna⁵*, la mortalidad se puede deber a la disminución de los niveles de las proteínas TnaA, especialmente de TnaA₁₃₀.

Interacciones genéticas entre *tna*, *osa* y genes de la vía de SUMOilación.

El fenotipo de extensión de alas (HWO) que presentan los individuos con combinaciones de alelos de *brm*, *osa* y *tna* tiene su base molecular en la expresión incorrecta de *Antp* desde el promotor P2 (Gutiérrez *et al.*, 2003). En el artículo se muestra que los individuos con una combinación de alelos mutantes de *tna* y *osa* con alelos mutantes de *lwr* y *smt3* (genes que en *D. melanogaster* codifican a la enzima conjugante Ubc9 y a SUMO, respectivamente) presentan un fenotipo HWO (Fig. 6 y Tabla 1 del artículo).

También quisimos probar si individuos sensibilizados para la expresión incorrecta del promotor P2 de *Antp* eran sensibles a la dosis de *lwr*. Los individuos sensibilizados para la expresión incorrecta del *Antp* desde el promotor P2 utilizados, poseen un cromosoma recombinante con las mutaciones *brm²* y *Antp¹* (Gutiérrez *et al.*, 2003). El alelo *brm²* es un alelo nulo para Brahma (Elfring *et al.*, 1998) mientras que en el alelo *Antp¹* se reduce la expresión del promotor P2 de *Antp* (Talbert y Garber, 1994; Boulet y Scott, 1988; Vázquez *et al.*, 1999). A diferencia de las interacciones observadas entre *tna¹* y los alelos de *lwr*: *lwr⁴⁻³* y *lwr¹³* (Tabla 1 del artículo), los individuos *lwr¹³/+*; *brm² Antp¹/+* y *lwr⁴⁻³/+*; *brm² Antp¹/+* no presentan el fenotipo HWO (Tabla 3), lo cual indica que la expresión del promotor P2 de *Antp* es más sensible a dosis bajas de la E3 ligasa de SUMO que de la enzima E2 conjugante de SUMO. Como control positivo del alelo *brm² Antp¹* se probó su interacción genética con el alelo *osa¹*. Los individuos con genotipo *osa¹/brm² Antp¹* sí presentan fenotipo HWO (Tabla 3).

Para obtener más evidencias genéticas de la importancia de la vía de SUMOilación en la regulación de la expresión correcta de *Antp* desde el promotor P2, se obtuvieron individuos que tuvieran alelos mutantes de *tna* u *osa* en combinación con un alelo de *ulp1* (gen que codifica a la proteasa que podría estar encargada tanto de madurar a SUMO como de quitar dicha marca postraduccional de las proteínas) (Talamillo *et al.*, 2008a). El posible alelo de *ulp1* denominado

ulp1^{f05808} tiene una inserción localizada río arriba de la región codificante del gen *ulp1*, sin embargo también podría estar afectando al gen adyacente (McQuilton *et al.*, 2012). Debido a que *ulp1* se localiza en el cromosoma X, en este experimento se contabilizaron únicamente individuos machos cuyo único cromosoma X contiene *ulp1^{f05808}*. *ulp1^{f05808}* no interaccionó genéticamente con ninguno de los dos alelos de *tna*, pero sí con *osa¹* (Tabla 3). El fenotipo HWO observado en los individuos con genotipo *ulp1^{f05808}; osa¹/+* refuerza la interacción genética observada entre *osa¹* y *smt3⁰⁴⁴⁹³* (Tabla 1 del artículo). Sin embargo, estos datos no están publicados debido a que no se sabe con exactitud qué gen(es) está(n) afectado(s) en los individuos que tienen el alelo *ulp1^{f05808}*. Como se mencionó previamente, en la vía de SUMOilación participan por lo menos dos proteasas, una involucrada en la maduración de SUMO al principio de la vía y otra encargada de deSUMOilar y así hacer reversible el proceso. Las interacciones genéticas entre alelos de *smt3* (SUMO), *lwr* (Ubc9) y *tna* indican que la falta de SUMOilación y no la falta de deSUMOilación, es importante para la expresión de los genes homeóticos. El fenotipo HWO observado en los individuos *ulp1^{f05808}; osa¹/+* está acorde a lo observado con las interacciones entre los alelos de *tna*, *smt3* (SUMO) y *lwr* (Ubc9) siempre y cuando el alelo *ulp1^{f05808}* esté involucrado en madurar a SUMO y no en deSUMOilar. Actualmente hay datos que sugieren que Ulp1 en *D. melanogaster* está involucrada en deSUMOilar más que en procesar al SUMO inmaduro (Bhaskar *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2004), por lo que los datos obtenidos señalan que Ulp1 podría estar participando en el procesamiento del SUMO inmaduro en ciertos momentos y que dicha actividad es importante para la expresión de los genes homeóticos.

Tabla 3. Interacciones genéticas entre alelos de *lwr* con *brm*² *Antp*¹ y de *tna* y *osa* con *ulpI*^{f05808}. ^a
 Los individuos heterocigotos con un cromosoma tipo silvestre y una copia de cada alelo no presentan fenotipo HWO, con excepción de los individuos que tienen a los alelos *tna*¹ y *osa*¹, cuyos resultados se muestran en el artículo.

Genotipo^a	HWO/ Total	Penetrancia (%)
Interacciones <i>lwr/brm</i>² <i>Antp</i>¹		
<i>lwr</i> ¹³ /+; <i>brm</i> ² <i>Antp</i> ¹ /+	0/133	0
<i>lwr</i> ⁴⁻³ /+; <i>brm</i> ² <i>Antp</i> ¹ /+	0/80	0
Interacciones <i>osa/brm</i>² <i>Antp</i>¹		
<i>brm</i> ² <i>Antp</i> ¹ / <i>osa</i> ¹	58/61	95
Interacciones <i>tna/ulpI</i>^{f05808}		
<i>ulpI</i> ^{f05808} ; <i>tna</i> ¹ /+	21/114	18
<i>ulpI</i> ^{f05808} ; <i>tna</i> ⁵ /+	0/136	0
Interacciones <i>osa/ulpI</i>^{f05808}		
<i>ulpI</i> ^{f05808} ; <i>osa</i> ¹ /+	23/135	17
<i>ulpI</i> ^{f05808} ; <i>osa</i> ² /+	6/183	3

La expresividad del fenotipo HWO en los individuos *ulpI*^{f05808}; *tna*¹/+ fue idéntico al observado en individuos heterocigotos de *tna*¹ (Figura 6 del artículo). La expresividad de los individuos *brm*² *Antp*¹/*osa*¹, *ulpI*^{f05808}; *osa*¹/+ y *ulpI*^{f05808}; *osa*²/+ fue idéntico al observado en individuos *tna*¹/*osa*¹ (Figura 6 del artículo). Para los ensayos de interacción genética con el alelo *ulpI*^{f05808} solo se utilizaron moscas machos y únicamente se contabilizaron a los machos de la progenie.

¿TnaA es una E3 ligasa de SUMO?

1. Evidencias de la actividad de E3 ligasa de SUMO de TnaA *in vitro*.

En el artículo mostramos que TnaA interacciona físicamente con Osa (Figura 5D y 5E del artículo), específicamente con el fragmento Osa_{C2} (Figura 5B del artículo) y con Ubc9 (Figura 5B y 5C del artículo). Previamente, se había reportado la presencia de un reservorio de la proteína Osa SUMOilada en etapas tempranas de la embriogénesis (Nie *et al.*, 2009). Para probar que TnaA es una E3 ligasa de SUMO y que Osa es una de sus proteínas blanco, primero debíamos encontrar un ensayo que nos permitiera evaluar la SUMOilación del fragmento Osa_{C2} *in vitro*. El fragmento Osa_{C2} contiene 6 de los 8 sitios consenso de SUMOilación de Osa completa (Figura 5A del artículo). Comercialmente se encuentran kits de SUMOilación y elegimos, con base en que otros grupos habían utilizado el kit SUMOlink-2/3 (Active-Motif). Este kit contiene a SUMO y a las enzimas de SUMOilación de mamíferos que tienen alta homología con las proteínas de la mosca. En *D. melanogaster* al igual que en otros invertebrados solamente hay una versión de SUMO, la cual corresponde a las isoformas SUMO 2/3 de vertebrados (revisado en Gareau y Lima, 2010). En los ensayos se añadieron la E1 (0.05 μM), la E2 (0.5 μM), SUMO-3 (0.25 μM) y el fragmento Osa_{C2} (5 μl de la reacción de ensayo de transcripción y traducción *in vitro* (PROMEGA) marcada radiactivamente con ³⁵S-metionina y lo que se buscó fue la aparición de bandas de un peso molecular más alto que la de Osa_{C2} (91 kDa) que corresponderían a las formas SUMOiladas de Osa_{C2}. En efecto, las proteínas de SUMOilación de mamífero son capaces de SUMOilar a Osa_{C2} (Figura 8). En estos experimentos pudimos detectar que la banda inmediata superior a Osa_{C2}, en el carril en donde se llevó a cabo la reacción de SUMOilación con SUMO-3 tiene un peso molecular de 126.5 kDa, lo cual podría corresponder a la adición de dos moléculas de SUMO. La siguiente banda tiene un peso molecular de 147 kDa y podría corresponder a la adición de tres moléculas de SUMO a Osa_{C2}. Cuando en vez de SUMO-3 se añade una versión mutante provista por el kit se observa que se disminuye el número de bandas correspondientes a las formas SUMOiladas de Osa_{C2} (comparar carril central con el derecho), lo cual indica que las bandas observadas efectivamente corresponden a las adiciones de SUMO a Osa_{C2}.

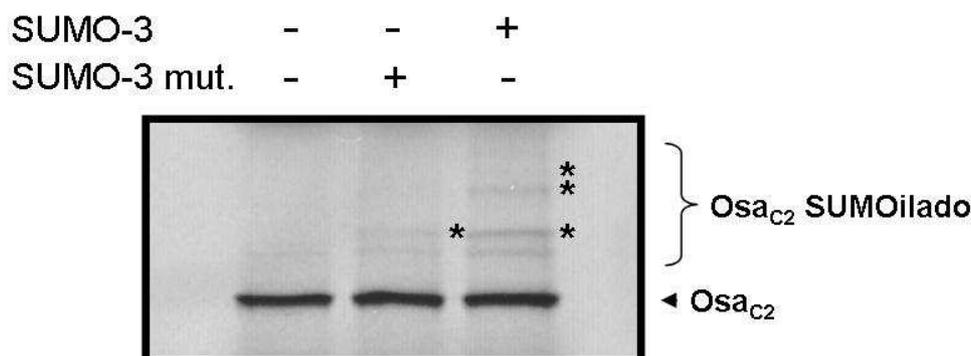


Figura 8: Ensayo de SUMOilación *in vitro* del fragmento Osa_{C2}. Los ensayos se realizaron conforme lo indica el proveedor, del kit SUMOlink-2/3. El ensayo básicamente consiste en añadir las enzimas E1 (SAE1 y SAE2), E2 (Ubc9), SUMO y la proteína a probar marcada radioactivamente utilizando el kit TNT Quick Coupled Transcription/Translation Systems (PROMEGA). SUMO-3 mut. corresponde a una forma mutante de SUMO provista en el kit, con la cual se disminuye la eficiencia de la reacción de SUMOilación. Las bandas correspondientes a las formas SUMOiladas de Osa_{C2} se señalan con asteriscos.

Una vez establecido el ensayo de SUMOilación de Osa_{C2} *in vitro*, quisimos determinar si TnaA favorece dicha modificación. Para esto se transcribieron y tradujeron *in vitro* las proteínas TnaA y p52 “frías” (en ausencia de ³⁵S-metionina) y por otro lado se transcribió y tradujo *in vitro* el fragmento Osa_{C2} en presencia de ³⁵S-metionina. La proteína p52 fue utilizada como “Mock”. Los ensayos de SUMOilación *in vitro* se realizaron con las concentraciones de E1, E2 y SUMO-3 antes mencionadas. En algunos de los ensayos realizados obtuvimos datos que sugieren que TnaA favorece la SUMOilación *in vitro* del fragmento Osa_{C2} (Figura 9). Al comparar los dos primeros carriles de izquierda a derecha se aprecia que el fragmento Osa_{C2} se puede SUMOilar aun en ausencia de TnaA, tal y como se observó en la Figura 8. Cuando se compara el segundo y tercer carril se aprecia que cuando se añade a TnaA, la intensidad y el número de bandas correspondientes a las formas SUMOiladas del fragmento Osa_{C2} aumentan (en la Figura las bandas correspondientes a las formas SUMOiladas de Osa_{C2} se señalan con un asterisco y podrían corresponder a la adición de 1, 2, 3 y 4 moléculas de SUMO).

El efecto de TnaA en la SUMOilación del fragmento Osa_{C2} es perceptible en lo que podría ser la tercera y cuarta SUMOilación (Figura 9), por lo que se procedió a obtener las condiciones experimentales necesarias para observar un efecto en las primeras SUMOilaciones. Para esto se disminuyó 10 veces la concentración de las enzimas E1 y E2 y el tiempo de reacción de 3 h a 15 min. En estas condiciones, se observa que en presencia de TnaA aparecen bandas que podrían corresponder

a la primera y segunda SUMOilación de Osa_{C2}. Estas bandas no se encuentran cuando TnaA no está presente (comparar directamente los carriles de la extrema izquierda y derecha de la Figura 9).

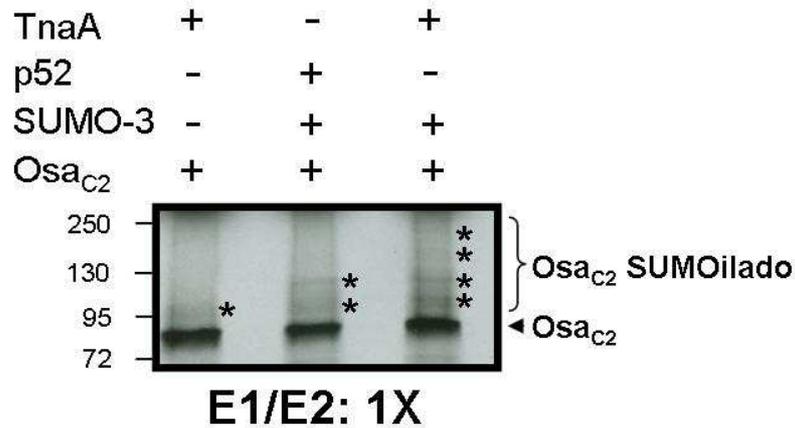


Figura 9: TnaA favorece la SUMOilación del fragmento Osa_{C2} *in vitro*. TnaA, p52 y el fragmento Osa_{C2} se transcribieron y tradujeron *in vitro* utilizando el kit TNT Quick Coupled Transcription/Translation Systems (PROMEGA) y los ensayos de SUMOilación *in vitro* se realizaron añadiendo 5 µl de Osa_{C2}, TnaA y p52. En los ensayos se añadieron las proteínas E1 (0.05 µM), E2 (0.5 µM), SUMO-3 (0.25 µM) que se obtuvieron del kit SUMOlink SUMO-2/3 (Active-Motif).

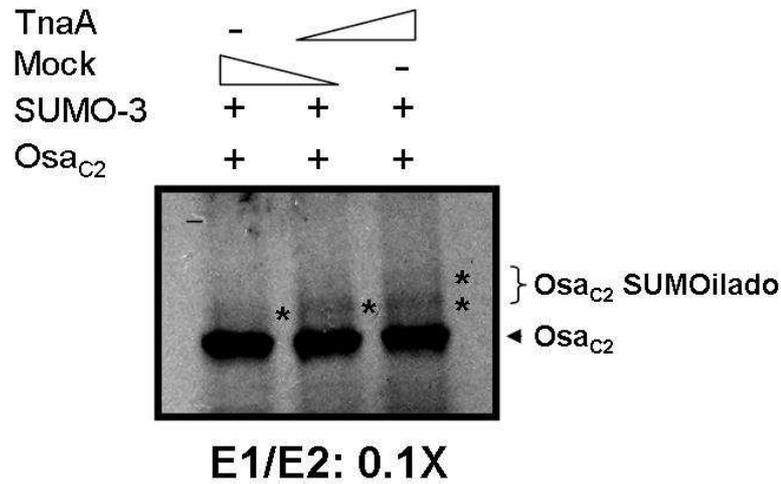


Figura 10: TnaA favorece la SUMOilación del fragmento Osa_{C2} *in vitro*. El fragmento Osa_{C2} y TnaA se transcribieron y tradujeron *in vitro* utilizando el kit TNT Quick Coupled Transcription/Translation Systems (PROMEGA). Los ensayos de SUMOilación *in vitro* se realizaron añadiendo 2 µl de Osa_{C2}, 2 µl (carril medio) y 8 µl (carril derecho) de TnaA y 8 µl (carril izquierdo) y 6 µl (carril medio) de "Mock". En este caso como "Mock" se utilizó una mezcla en la cual se añadieron las enzimas necesarias para transcribir y traducir *in vitro* a TnaA pero inmediatamente se agregó la enzima nucleasa micrococcal que al degradar el templado es una condición donde se impide la síntesis de la proteína de interés. En los ensayos se añadieron las proteínas E1 (0.005 µM), E2 (0.05 µM), SUMO 3 (0.25 µM) del kit SUMOlink SUMO-2/3 (Active-Motif).

Si bien estos experimentos sugieren que TnaA tiene actividad de E3 ligasa de SUMO *in vitro*, el efecto es muy sutil. Una posibilidad por la cual no se pudo obtener un efecto mayor en los ensayos de SUMOilación *in vitro* es porque las proteínas SUMO, E1 y E2 son de mamíferos mientras que la E3 y la proteína blanco son de *D. melanogaster*. Otra posibilidad es la cantidad limitante de TnaA que se puede obtener a partir de un ensayo de transcripción-traducción *in vitro*. Para solventar este problema, intentamos mejorar la cantidad de TnaA a través de su obtención como proteína de fusión GST-TnaA. Con la finalidad de realizar ensayos enzimáticos requeríamos que GST-TnaA estuviera en condiciones nativas para lo cual nos asesoró el Dr. José Fernando Lledias Martínez. El protocolo empleado para obtener a GST-TnaA está descrito en Vikis y Guan (2004) con la única modificación de que no se utilizaron detergentes. El extracto obtenido fue concentrado con dispositivos tipo Centricon (Millipore), con tamaños de poro de 30 y 100 kDa y las proteínas separadas por electroforesis en condiciones nativas (sin SDS) y electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa. La zona de migración de GST-TnaA en condiciones nativas se determinó en ensayos tipo Western. Para purificar GST-TnaA nativa, se corrieron geles en condiciones idénticas a las que se utilizaron para hacer el Western, y se cortaron las zonas del gel en donde GST-TnaA estaba enriquecida. GST-TnaA junto con las proteínas que comigraran con ella se electroeluyeron de las tiras de geles. Paralelamente se hizo lo mismo pero con un cultivo que expresó a GST como control negativo.

Los ensayos de SUMOilación *in vitro* con la fracción purificada que contenía GST-TnaA nativa, se realizaron en las mismas condiciones con las que se obtuvieron los datos mostrados en la Figura 9. Estos ensayos tampoco mostraron un efecto mayor de TnaA en la SUMOilación de Osa_{C2} (Figura 11). Lo que llama la atención es que en los carriles en donde se añadió la fracción enriquecida de GST-TnaA, las bandas correspondientes a las primeras SUMOilaciones de Osa_{C2} desaparecen y aparece una banda de un tamaño aproximado de 72 kDa además de un barrido en la parte inferior de cada carril. Como se mencionó, la fracción que contiene a GST-TnaA es semipura pues otras proteínas bacterianas del mismo peso pueden estar presentes en esta fracción. Por esta razón, en paralelo se llevó a cabo la inducción de la producción de GST en vez de GST-TnaA y de está se purificó una fracción de proteínas del mismo rango de peso molecular que la fracción que contiene a GST-TnaA. La banda de 72 kDa no está presente en los carriles correspondientes a esta fracción “Mock” y por lo tanto no son derivadas de actividades de enzimas bacterianas. Estos datos sugerían que quizás TnaA promueve la degradación de Osa_{C2} indirectamente a través de la SUMOilación. En la literatura se han reportado

casos en los que la SUMOilación de proteínas favorece su ubiquitinación y consecuente degradación (revisado en Praefcke *et al.*, 2012).

Para poder determinar si esta última hipótesis era correcta se realizaron nuevos experimentos como el anterior pero ahora en presencia de inhibidores de proteasas y del inhibidor específico del proteasoma MG132. La adición de inhibidores afecta las reacciones de SUMOilación *in vitro*. En el carril 6 se alcanzan a ver bandas de bajo peso molecular que corresponden a las primeras SUMOilaciones de Osa_{C2}, mientras que en el carril 4, en donde se añadió a los inhibidores, se dejan de ver dichas bandas y se observa de manera tenue una banda ligeramente mayor a 130 kDa. La banda de 130 kDa se enriquece en el carril en donde se añadió “Mock” en lugar de GST-TnaA (carril 3) y disminuye cuando no se añade SUMO (carril 1 y 5), lo cual sugiere que se trata de una forma SUMOilada de Osa_{C2}. En experimentos previos se ha mostrado que Osa_{C2} se SUMOíla en presencia de SUMO y de las enzimas E1, E2, sin embargo en presencia de los inhibidores esto no sucede (comparar los carriles 2 de las Figuras 11 y 12). En estas condiciones (presencia de inhibidores) no se ve el enriquecimiento de la banda de 72 kDa en los carriles en donde se añadió GST-TnaA, aunque sí el barrido incluso cuando no se añadió SUMO (carril 5) lo cual indica que su presencia es independiente a la vía de SUMOilación.

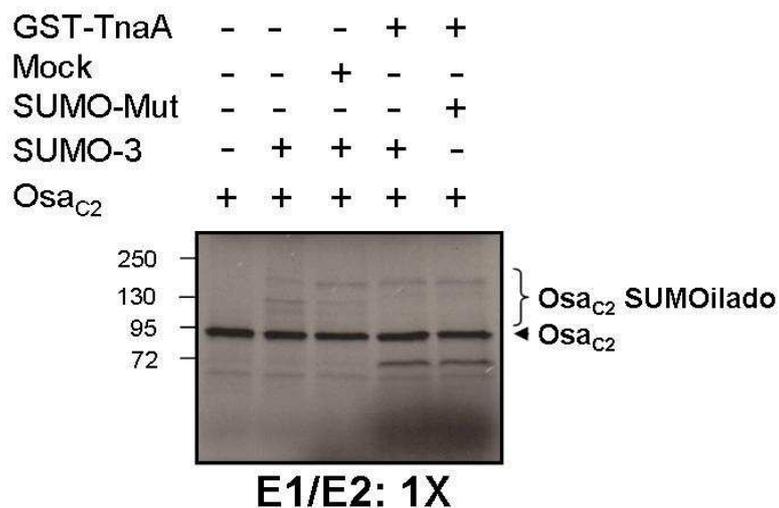


Figura 11: Ensayo de SUMOilación de Osa_{C2} *in vitro* con GST-TnaA. El fragmento Osa_{C2} se transcribió y tradujo *in vitro* y los ensayos de SUMOilación *in vitro* se realizaron añadiendo 5 µl de Osa_{C2} como se ha descrito. Se añadieron 19 µl de la fracción enriquecida de GST-TnaA (carril GST-TnaA) y 19 µl de una fracción obtenida de la misma región del gel donde se obtuvo a GST-TnaA a partir de un cultivo que expresa a GST (carril “Mock”). Las concentraciones de E1, E2 y SUMO-3 fueron las mismas que las detalladas para la Figura 6. El tiempo de reacción fue de 30 min.

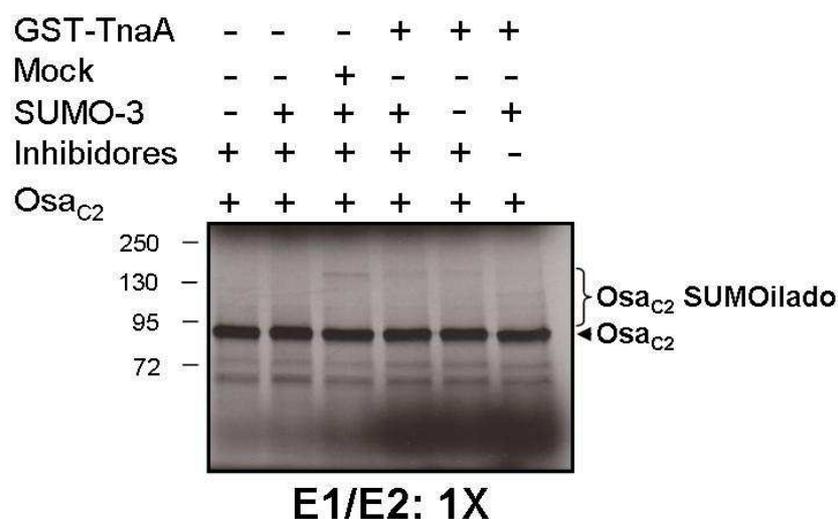


Figura 12: Ensayo de SUMOilación de Osa_{C2} *in vitro* con GST-TnaA más inhibidores de proteasas. El fragmento Osa_{C2} se transcribió y tradujo *in vitro* y los ensayos de SUMOilación *in vitro* se realizaron añadiendo 5 µl de Osa_{C2}. Se añadieron 17 µl de la fracción enriquecida de GST-TnaA (carril GST-TnaA) y 17 µl de una fracción que comigra en la misma región que GST-TnaA obtenida a partir de un cultivo que expresa a GST (carril “Mock”). Las concentraciones de E1, E2 y SUMO-3 fueron las mismas que las detalladas para la Figura 6. El tiempo de reacción fue de 30 min. Como inhibidores de proteasas se usó N-etilmaleimida (20 mM), PMSF (“PhenylMethylSulfonyl Fluoride”; 0.2 mM), Complete (ROCHE; 1X) y MG132 (50 µM).

Estos datos (Figura 9 y 10) muestran que TnaA sí favorece la SUMOilación de Osa_{C2} y que bajo este criterio sí presenta actividad de E3 ligasa de SUMO. También con esto demostramos que Osa_{C2} es sustrato de SUMOilación. Hasta el momento no hemos logrado obtener las condiciones necesarias en donde se pueda observar la actividad de E3 ligasa de SUMO de TnaA de una forma más clara. Nosotros pensamos que la cantidad limitada de TnaA completo y quizás la presencia de otras proteínas en la fracción enriquecida de GST-TnaA no nos permiten observar un efecto claro en la SUMOilación de Osa_{C2}. Para experimentos futuros se deben emplear nuevas estrategias de purificación de proteínas que permitan obtener a TnaA en mayor cantidad y pureza.

2. Evidencias de la actividad de E3 ligasa de SUMO de TnaA *in vivo*.

a) Evaluación de la SUMOilación de Osa_{C2} por TnaA en células S2R+ de *D. melanogaster*.

Para complementar los datos *in vitro*, se diseñaron experimentos que nos permitieran encontrar evidencias *in vivo* de la actividad de E3 ligasa de SUMO de TnaA. Con la transfección transitoria de TnaA y Osa_{C2}, nosotros esperábamos encontrar el enriquecimiento de formas SUMOiladas de Osa_{C2}, tal y como se observó *in vitro* (Figuras 9 y 10). Para estos experimentos se escogió a las células S2R+, las cuales se derivan de la línea S2 que proviene de un cultivo primario de embriones tardíos de *D. melanogaster*. Esta línea celular se usó debido a que expresa la maquinaria de SUMOilación (McQuilton *et al.*, 2012) y porque su cultivo fue montado previamente en el laboratorio.

En un primer intento se clonó el ADNc que codifica a la forma completa de TnaA en los sitios *EcoRI* y *XbaI* del vector pAc5.1/V5-His A (Invitrogen; ver Anexo III), el cual permite la expresión constitutiva y fuerte, a partir del promotor del gen *Actina 5C* de *D. melanogaster*. Adicionalmente, la proteína de interés se genera fusionada al epítipo V5 más una cola de histidinas en el extremo carboxilo. Esta construcción fue transfectada en células S2R+ de *D. melanogaster*. El vector pAc5.1/V5-His A fue modificado por la M. en C. Claudia Villicaña Torres para que en lugar de V5 y la cola de histidinas tuviera Flag con el objeto de poder realizar coimmunoprecipitaciones de dos proteínas transfectadas (ver Anexo III). A este vector modificado se le llamó pAc5.1/CT-Flag. El fragmento Osa_{C2} (Figura 5A del artículo) se clonó en los sitios *EcoRI* y *XbaI* del vector pAc5.1/CT-Flag para que quedara en el marco de lectura correcto para expresar el péptido correspondiente.

Las construcciones TnaA-V5 y Osa_{C2}-Flag se mandaron a secuenciar y únicamente se logró corroborar que el fragmento Osa_{C2} estuviera clonado en el vector pAc5.1/CT-Flag. Los resultados de la secuenciación de la construcción TnaA-V5 consistieron en fondo, pero se checó por ensayos de digestión. Los oligonucleótidos utilizados para las construcciones TnaA-V5 y Osa_{C2}-Flag se diseñaron de tal forma que permitieran clonar en el marco de lectura correcto, sin embargo esto no se corroboró por secuenciación ya que se requería de otros oligonucleótidos que aparearan con los vectores que estuvieran alejados de los sitios de clonación. Las construcciones TnaA-V5 y Osa_{C2}-Flag fueron transfectadas y cotransfectadas conforme al manual de Invitrogen en células S2R+. En ninguna ocasión, tras varios intentos, se logró observar la expresión de las proteínas de fusión TnaA-V5 y Osa_{C2}-Flag. Como control positivo se transfectaron construcciones que se han probado en el laboratorio y sí se observó la expresión de las proteínas utilizadas como control. Estos experimentos quedaron

inconclusos y faltó corroborar que las construcciones estuvieran bien hechas. Otra estrategia aun por explorar es construir nuevas fusiones de fragmentos de TnaA y de Osa y probar si estas sí son expresadas en las células.

b) Evaluación de la SUMOilación de Scm en fondos mutantes de *tna*.

La proteína del PcG Sex Comb on Midleg (Scm) se SUMOíla y consecuentemente pierde su localización en el PRE del gen homeótico *Ubx*. Este hecho favorece la expresión de *Ubx* (Smith *et al.*, 2011). Smith *et al.* (2011) sugirieron que TnaA podría ser la E3 ligasa de SUMO requerida para SUMOílar a Scm. Por esta razón, se decidió evaluar la SUMOilación de Scm en fondos mutantes de *tna*. Para poder realizar estos experimentos, primero se probaron dos anticuerpos que reconocen a SUMO, con los cuales se observó el mismo patrón de proteínas SUMOiladas presentes en un extracto total de embriones de 3-21 h de desarrollo de *D. melanogaster* (Figura 13).

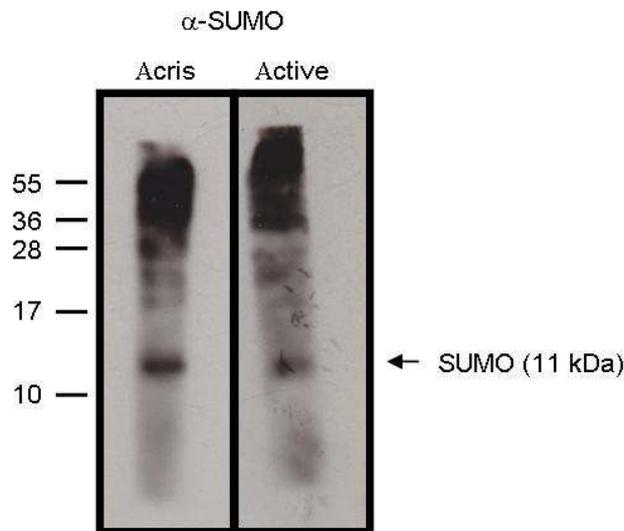


Figura 13. Evaluación del patrón de proteínas SUMOiladas con dos anticuerpos anti-SUMO. En cada carril se cargaron 100 µg de un extracto proteico total de embriones de 3-21 h de desarrollo de *D. melanogaster*. Los anticuerpos anti-SUMO de las casas comerciales Acris y Active-Motif se usaron en una dilución de 1:1000 y 1:4000, respectivamente.

Nosotros determinamos que los individuos con el genotipo *tna¹/tna⁵* mueren principalmente como larvas de tercer instar (Figura 3C del artículo) y que presentan niveles reducidos de TnaA (Figura 3A del artículo), por lo que nos pareció un fondo ideal para evaluar la SUMOilación de Scm. Para esto, obtuvimos de la Dra. J. Kassis (NIH) una línea de mosca que permite la expresión de Scm

etiquetada con Flag en el extremo amino (Flag-Scm). La proteína de fusión Flag-Scm se expresa a partir de un promotor mínimo formado por secuencias UAS y por la presencia del activador transcripcional Gal4 de levadura. Para la expresión ubicua suave de Flag-Scm se utilizó la línea “driver” *armadillo* (*arm-Gal4*; donada por el Dr. Juan Riesgo-Escovar) que expresa a Gal4 en la etapa larvaria y permite la expresión de la proteína de interés en las glándulas salivales. Con esta finalidad, construimos líneas de moscas que contenían los elementos necesarios para expresar Flag-Scm en el patrón de expresión de *arm* en los fondos mutantes de *tna* que hemos mencionado.

La SUMOilación de Flag-Scm se evaluó en extractos proteicos obtenidos de glándulas salivales de larvas de tercer instar de los siguientes genotipos: 1) *Flag-Scm/arm-Gal4*; +/+, 2) *Flag-Scm/arm-Gal4*; *tna*¹ o *tna*⁵/+ y 3) *Flag-Scm/arm-Gal4*; *tna*¹/*tna*⁵ donde esperábamos que: a) la proteína Flag-Scm se SUMOilara en los fondos silvestres para *tna* y b) que dicha modificación postraduccional disminuyera en los fondos mutantes de *tna*. Flag-Scm se inmunoprecipitó de estos extractos con el anticuerpo anti-Flag (detalles del protocolo de inmunoprecipitación en la sección de Materiales y Métodos del artículo) y posteriormente se evaluó si había un cambio en los niveles de SUMOilación de Flag-Scm.

Flag-Scm se expresa tanto en el fondo silvestre como en los fondos mutantes de *tna* (Figura 14A, carril “In” por ejemplo) y se observan bandas que podrían corresponder a formas SUMOiladas de Flag-Scm (Figura 14B). De forma interesante observamos en las glándulas del genotipo *tna*¹/*tna*⁵, la disminución de la intensidad de una banda localizada ligeramente arriba de Flag-Scm en un fondo heteroalélico de *tna* (Figura 14B). En estos experimentos se debe considerar como control de carga a la cantidad de Flag-Scm inmunoprecipitada (carriles B de la Figura 14A). La diferencia en tamaño entre las bandas correspondientes a Flag-Scm (Figura 14A) y la banda que disminuye en fondos mutantes de *tna* (Figura 14B) es de 17 kDa, lo cual podría corresponder al incremento debido a la adición de un SUMO, cuyo peso molecular teórico es de 10.1 kDa. El hecho de que en la Figura 14A no se observa claramente una banda cuyo tamaño corresponda con la que disminuye en la Figura 14B se puede deber a que la SUMOilación de Flag-Scm es muy limitada y solo se detecta con un anticuerpo anti-SUMO.

En estos experimentos no llevamos a cabo una inmunoprecipitación con un anticuerpo irrelevante como control negativo. En experimentos posteriores en donde sí se realizó este control, se pudo observar que hay bandas de peso molecular mayor a Flag-Scm que inmunoprecipitan de manera inespecífica y que son reconocidas con el anticuerpo anti-SUMO por lo que no podemos concluir que

la SUMOilación de Flag-Scm disminuye en fondos mutantes de *tna*. Para poder resolver este pegado inespecífico y obtener un dato claro acerca de la SUMOilación de Scm, se probaron distintas perlas de proteína-G acoplada a agarosa de las marcas comerciales Invitrogen, Santa Cruz y ZYMED (con las que se obtuvo mejores resultados fue con las de Invitrogen). También se realizaron inmunoprecipitaciones con distintas cantidades del anticuerpo anti-Flag, así como inmunoprecipitaciones secuenciales, en donde primero se inmunoprecipitó con anti-Flag y luego con anti-SUMO. Todas las inmunoprecipitaciones subsecuentes con las diferentes condiciones antes mencionadas produjeron información igualmente confusa.

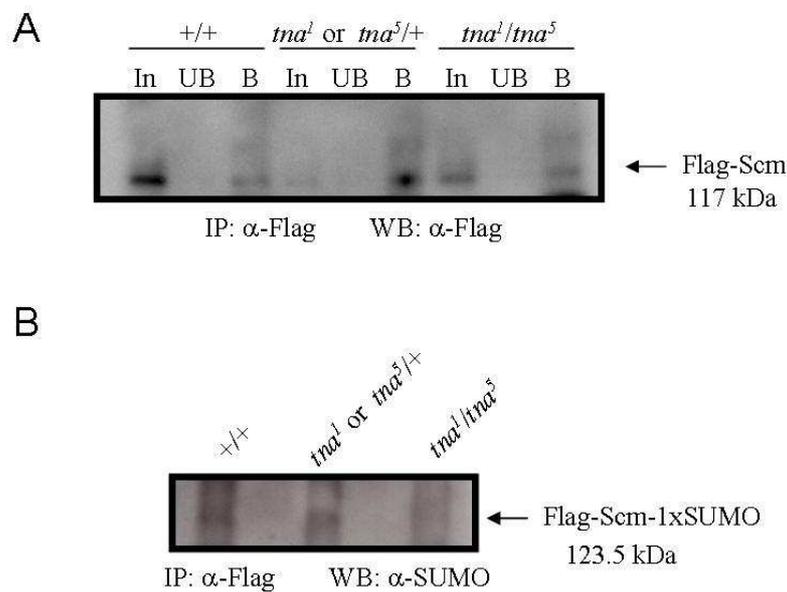


Figura 14. Evaluación de la SUMOilación de Flag-Scm en extractos proteicos de glándulas salivales de larvas de tercer instar con fondos mutantes de *tna*. En todos los individuos analizados, el genotipo del cromosoma 2 fue *Flag-Scm/arm-Gal4* y el genotipo de *tna* está indicado en cada caso (A) Inmunoprecipitación de Flag-Scm. En el carril In (Input) se cargó el 10% de la cantidad de proteínas que se usó en las inmunoprecipitaciones. El carril UB (Unbound) corresponde a las proteínas que no inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-Flag. En el carril B (Bound) se cargaron las proteínas que inmunoprecipitan con el anti-Flag. Se usaron 2 µg de anti-Flag para realizar las inmunoprecipitaciones y una dilución 1:10 000 para los análisis tipo “Western”. (B) Inmunodetección de proteínas SUMOiladas que inmunoprecipitaron con el anti-Flag. El anticuerpo anti-SUMO (Acris) se usó en una dilución 1:1000.

Discusión

Durante el desarrollo de este proyecto se obtuvieron evidencias que sugieren que TnaA es una E3 ligasa de SUMO. Previamente se había identificado que TnaA tiene un dominio SP-RING que es característico de enzimas con actividad de E3 ligasa de SUMO, presente en el grupo de las proteínas PIAS (Hochstrasser, 2001). El SP-RING en las proteínas PIAS interacciona con Ubc9, la enzima conjugante de SUMO. En este trabajo mostramos que una región de TnaA que incluye al dominio SP-RING, interacciona físicamente con Ubc9. Además, los ensayos de interacción genética, en donde se evaluó un fenotipo asociado a la expresión incorrecta del gen homeótico *Antp*, demostraron que *tna* interacciona con *lwr* (gen que codifica a Ubc9, E2 de la vía de SUMOilación) y con *smt3* (gen que codifica a SUMO). Este último dato es muy importante ya que señala que la expresión de los genes homeóticos requiere de las funciones de TnaA y de la vía de SUMOilación. ¿Cuáles proteínas podrían ser blancos de TnaA? *tna* interacciona fuertemente con *osa*, gen que codifica a la subunidad exclusiva del complejo remodelador de la cromatina BAP (Mohrmann *et al.*, 2004). Se ha demostrado que hay un “pool” de Osa SUMOilado en etapas embrionarias tempranas (Nie *et al.*, 2009). En el presente trabajo encontramos que *osa* interacciona con *smt3* y que la proteína Osa interacciona físicamente con TnaA. Además identificamos que Osa tiene por lo menos ocho sitios consenso de SUMOilación y que el fragmento Osa_{C2} puede SUMOilarse *in vitro*. Por último, tenemos evidencia que sugiere que esta modificación postraduccional es favorecida por TnaA. La repercusión de la SUMOilación de Osa, las funciones de TnaA independientes a la vía de SUMOilación así como su papel durante el desarrollo de la mosca se discuten en el artículo. A continuación se mencionaran otros posibles blancos de TnaA y su posible papel en la metamorfosis.

TnaA, SUMO y factores involucrados en la transcripción

Además de Osa, otros posibles blancos de TnaA pueden ser las proteínas codificadas por los genes con los que interacciona. *tna* interacciona genéticamente con los miembros del *trxG* *brm*, *mor* y *snr1* (Gutiérrez *et al.*, 2003) que codifican para subunidades de los complejos PBAP/BAP. En la levadura, los ortólogos de Brm, Mor y Snr1 se SUMOilan (Wohlschlegel *et al.*, 2004; Denison *et al.*, 2005; Hannich *et al.*, 2005). Los ortólogos de humano de las subunidades, Brm, Mor y Snr1 son suficientes para llevar a cabo la actividad remodeladora de nucleosomas *in vitro*, comparable a la observada cuando está presente todo el complejo SWI/SNF (Phelan *et al.*, 1999). Por lo que es interesante proponer que la SUMOilación de estas subunidades mediada por TnaA, podría regular

directamente la actividad remodeladora del complejo *in vivo*. Otras subunidades de los complejos SWI/SNF que no se consideran parte del trxB pero que también se SUMOÍlan son las proteínas relacionadas a actina Arp7 y Arp9 en levadura (Wohlschlegel *et al.*, 2004) y uno de sus ortólogos en la mosca, BAP47 (Nie *et al.*, 2009) Estas proteínas no pueden ser polimerizadas ni tienen actividad de ATPasa (revisado en Hargreaves y Crabtree, 2011). El hecho de que tanto en la levadura como en la mosca se SUMOÍlen las mismas proteínas sugiere que esta modificación tiene un papel importante en la función de estos complejos. Otra subunidad de estos complejos, Swp73 de levadura ortóloga de BAP60 de mosca, también se SUMOÍla (Wohlschlegel *et al.*, 2004). BAP60, como Brm y Osa, se requiere para la expresión de *Antp* a partir del P2 y como se une al ADN, puede ser la o una de las subunidades que dirige al complejo a los distintos promotores (Möller *et al.*, 2005). Un punto crítico para entender la consecuencia de la SUMOilación de cualquiera de estas subunidades es contar con ensayos que nos permitan evaluar las funciones en las que participan.

Otros genes que interactúan con *tna* son *skuld* y *kohtalo* que codifican las subunidades Med12 y Med13 del MEDIADOR (Gutiérrez *et al.*, 2003). Ambas proteínas forman parte del módulo Cdk8/CycC que tiene funciones de regulación positiva y negativa en la expresión de diferentes grupos de genes en *D. melanogaster* (Loncle *et al.*, 2007; Gaytán de Ayala *et al.*, 2007; Gobert *et al.*, 2010; Janody y Treisman, 2011). *tna* interactúa genéticamente con *kismet* (Gutiérrez *et al.*, 2003). Kismet es una proteína con actividad de ATPasa de la subfamilia remodeladora de la cromatina CHD. Kismet está involucrada en la etapa de elongación de la transcripción catalizada por la ARN pol II (Srinivasan *et al.*, 2008). Otro gen que interactúa con *tna* es *taranis* (Gutiérrez *et al.*, 2003). Las proteínas Taranis están relacionadas con la proteína TRIP-Br1/p34^{SEI-1} de mamíferos (Calgaro *et al.*, 2002) que está implicada en el ciclo celular (Sugimoto *et al.*, 1999; Hsu *et al.*, 2001), en la activación transcripcional dependiente de p53 (Watanabe-Fukunaga *et al.*, 2005) y en el mantenimiento de la estabilidad genómica (Sim *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2005). Finalmente, *tna* interactúa genéticamente con *γTub23C* (Vázquez *et al.*, 2008) que codifica para una de las dos isoformas de γ Tubulina en *D. melanogaster*. γ Tubulina participa en el inicio de la nucleación y en el establecimiento de la polaridad de los microtúbulos (revisado en Luders y Stearns, 2007) y por sus interacciones genéticas con algunas subunidades del complejo Brahma (Vázquez *et al.*, 2008) podría estar participando en el remodelamiento de la cromatina y/o en la transcripción de genes.

Para facilitar la expresión de los genes homeóticos, TnaA también podría promover la SUMOilación de otras proteínas de los *trxG* y/o a otras que también estén involucradas en la estructura de la cromatina, como por ejemplo las histonas que son los blancos de las maquinarias remodeladoras y modificadoras. En la levadura se ha encontrado que las histonas y algunas subunidades de la ARN pol II, algunas subunidades del complejo MEDIADOR, algunas subunidades de los factores basales de la transcripción como TFIIA, TFIID, TFIIE y TFIIIF se SUMOílan (Panse *et al.*, 2004; Wohlschlegel *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2004; Denison *et al.*, 2005; Hannich *et al.*, 2005; Wykoff *et al.*, 2005; Nathan *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2009). La SUMOilación es importante para el reclutamiento de la ARN pol II a los promotores en la levadura (Rosonina *et al.*, 2010). Debido a que la SUMOilación de proteínas puede afectar sus interacciones, entre otros efectos, es posible que tenga un papel importante en la regulación de la maquinaria de transcripción de los genes homeóticos a través de favorecer el ensamblaje de complejos. Un ejemplo de este tipo de regulación se observó con la maquinaria de procesamiento del extremo 3' del ARN, en donde la SUMOilación de proteínas permite que se formen los complejos involucrados en la poliadenilación del ARN (Vethantham *et al.*, 2007).

Otros posibles blancos de TnaA podrían ser miembros del PcG. En *D. melanogaster*, la proteína del PcG Scm se SUMOíla (Smith *et al.*, 2011). La reducción de los niveles de SUMO resulta en la transformación parcial del halterio a ala. Esta transformación se debe a la disminución de la expresión de *Ubx*, lo que apunta a que SUMO podría influir en la actividad represora de Scm al inhibir su reclutamiento a la principal secuencia (PRE) responsable del silenciamiento de *Ubx*. Consistente con esta interpretación, Smith *et al.*, (2011) muestran que Scm SUMOilado se recluta menos al PRE. De manera interesante, las moscas adultas con niveles reducidos de *tna* también presentan una transformación del halterio a ala (Gutiérrez *et al.*, 2003). Por lo tanto Smith *et al.*, (2011) sugieren que TnaA podría ser la E3 ligasa de SUMO involucrada en la modificación postraduccional de Scm. En contraste a lo que sucede en *D. melanogaster*, la SUMOilación de SOP-2, la cual es el ortólogo de Scm en *C. elegans*, se requiere para la represión de la transcripción de los genes homeóticos (Zhang *et al.*, 2004). En la Figura 15 se muestran algunos escenarios posibles de cómo la SUMOilación, a través de modificar las interacciones proteína-proteína, podría estar regulando la expresión de genes.

TnaA, SUMO y el FOLDOSOMA

Existe también la posibilidad de que TnaA SUMOíle a proteínas que están relacionadas a transcripción pero de una manera más indirecta. De las proteínas encontradas en el ensayo de doble híbrido de levadura (Tabla 2), la que resulta más interesante y la que se obtuvo el mayor número de veces es DnaJ-1 que es el ortólogo en *D. melanogaster* de Hsp40 humana. En los ensayos de interacción por doble híbrido de levadura es frecuente que proteínas que son inducidas por choque térmico aparezcan como falsos positivos y esto se debe a que muchas de ellas son chaperonas. Sin embargo este no parece ser el caso para DnaJ-1, ya que no es una chaperona, no activa los genes reporteros por sí misma y tampoco interacciona físicamente de manera inespecífica. De manera interesante, el Dr. J. A. Kennison, identificó una mutación que se comporta como un “enhancer” débil de *brm* al cual denominó $E(brm)^{22}$ (comunicación personal). Los individuos con combinaciones transheteroalélicas de $E(brm)^{22}$ con alelos de *brm* o *tna* presentan un fenotipo HWO, lo cual sugiere que su función se requiere para la expresión de *Antp* a partir del promotor P2. El mapeo inicial para determinar en qué gen se encuentra la lesión de la mutación $E(brm)^{22}$ indica que muy probablemente se encuentra en *DnaJ-1*. Sin embargo, la secuencia nucleotídica del alelo $E(brm)^{22}$ no presenta cambios en la región codificante de DNAJ-1. Es posible que la mutación de $E(brm)^{22}$ se encuentre localizada en alguna zona regulatoria (comunicación personal de J. A. Kennison).

DNAJ-1 en mamíferos funciona principalmente como una cochaperona molecular que regula la actividad de Hsp70, que junto con Hsp90, constituyen las encargadas del plegamiento correcto de las proteínas en un complejo al que se ha llamado FOLDOSOMA (revisado en Pratt y Toft, 2003). Además de las proteínas ya mencionadas, otros componentes del complejo son las proteínas Hop, Hip y p23 que de manera general tienen la función de darle estabilidad a la unión del FOLDOSOMA con el sustrato (revisado en Pratt y Toft, 2003). TnaA podría estar regulando las funciones del FOLDOSOMA a través de la SUMOilación de DnaJ-1 o de alguna otra subunidad o también es posible que el FOLDOSOMA regule las funciones de TnaA.

Las subunidades del FOLDOSOMA están relacionadas tanto en la activación como en la represión de la transcripción. En *D. melanogaster* se encontró que las mutaciones en *hsc4* (que codifica a la forma constitutiva de Hsp70, llamada Hsc4) aumentan los fenotipos (por ejemplo la aparición de peines sexuales en el segundo y tercer par de patas de moscas machos) que se presentan debido a la falta de función de genes del PcG (Mollaaghbababa *et al.*, 2001). Posiblemente Hsc4 participa ayudando

al plegamiento correcto de alguna subunidad o en el ensamblaje de los complejos represores Polycomb (Mollaaghababa *et al.*, 2001). En mamíferos se observó que los componentes del FOLDOSOMA, p23 y Hsp90 inhiben la transcripción de ciertos genes quizás a través del desensamblaje de la maquinaria transcripcional (Freeman y Yamamoto, 2002). Por otro lado, se sabe que Hsp90 interacciona físicamente con las histonas (H1, H2A, H2B, H3 y H4) (Schneider *et al.*, 1999) y que a través de las interacciones antes mencionadas, induce la condensación *in vitro* de la cromatina en mamíferos (Csermely *et al.*, 1994). Actualmente hay datos que involucran a Hsp90 en el ensamblaje de complejos como la ARN pol II, RISC (“RNA induced silencing complexes”), entre otros (revisado en Makhnevych y Houry, 2012). Por lo que es posible que Hsp90, junto con el FOLDOSOMA, participe en el ensamblaje de los complejos necesarios para la formación del nucleosoma (revisados en Akey y Luger, 2003) o en el ensamblaje de la maquinaria necesaria para la condensación de la cromatina (revisado en Beisel y Paro, 2011).

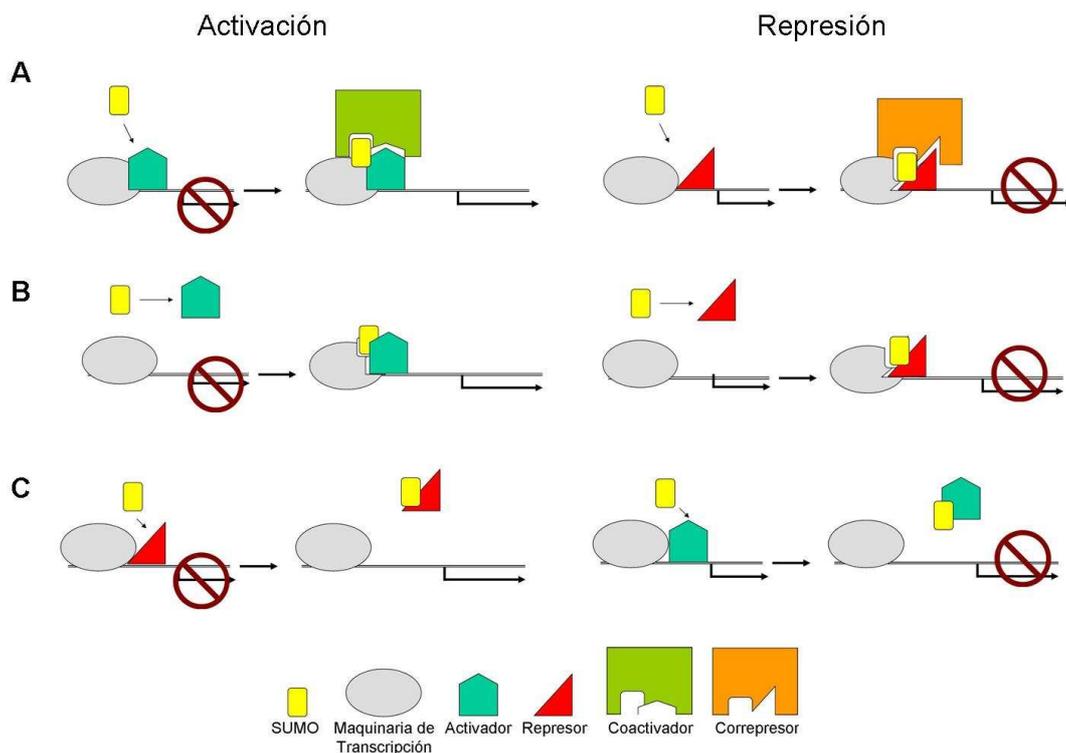


Figura 15: Participación de la vía de SUMOilación en la activación y represión de la transcripción. Casos hipotéticos en los que la vía de SUMOilación permite la activación (izquierda) o la represión (derecha) de la transcripción. La flecha indica transcripción. **A.** La SUMOilación de un activador o de un represor puede crear un sitio de interacción para un coactivador o un correpresor. **B.** La SUMOilación de un activador o de un represor puede resultar en cambios en su localización y/o en su reclutamiento a los promotores. **C.** La SUMOilación de un represor o de un activador puede resultar en cambios en su localización y su desensamblaje del promotor.

TnaA y la metamorfosis

TnaA podría tener un papel en la regulación de la expresión de genes que no sean los homeóticos. El posible papel de TnaA como un regulador más general de la transcripción aun está por explorarse, sin embargo las evidencias que se tienen al momento es que las glándulas salivales de larvas de tercer instar con genotipo *tna¹/tna⁵* presentan un patrón de expresión de proteínas alterado (Figura 3D del artículo). Las proteínas de la vía de ecdisona y aquellas reguladas por la misma hormona podrían ser SUMOiladas por TnaA, ya que los individuos con niveles reducidos de TnaA (Gutiérrez *et al.*, 2003; Figura 3C del artículo), SUMO (Talamillo *et al.*, 2008b), Aos1 (una de las subunidades de la enzima E1 activadora de la vía de SUMOilación; Kanakousaki y Gibson, 2012) y Ubc9 (Huang *et al.*, 2005b; Chiu *et al.*, 2005) no pueden completar la metamorfosis y presentan una extensión de la etapa larvaria. La glándula protorácica de las larvas de tercer instar es la encargada de la síntesis de ecdisona, la cual es secretada a la hemolinfa para ser transformada a su forma activa en los tejidos blanco. Las larvas con niveles reducidos de SUMO en la glándula protorácica presentan niveles bajos de lípidos y de ecdisona (Talamillo *et al.*, 2008b) y recientemente se encontró que SUMO se requiere para la expresión de los receptores de membrana involucrados en la importación de lípidos necesarios para la síntesis de ecdisona (Talamillo *et al.*, 2013). TnaA se expresa en la glándula protorácica y podría ser la E3 ligasa de SUMO que favorece la SUMOilación de los factores involucrados en la importación de lípidos.

Por otro lado, las chaperonas Hsp70 y Hsp90 son requeridas para la activación del receptor de ecdisona (formado por el heterodímero EcR/Usp) en *D. melanogaster in vivo* (Arbeitman y Hogness, 2000). Además Hsp90 colocaliza con Trithorax en regiones transcripcionalmente activas (“puffs”) en los cromosomas politénicos y coinmunoprecipitan a partir de extractos nucleares embrionarios (Tariq *et al.*, 2009). En este mismo trabajo se propone que Hsp90 es una proteína *trxG* pues suprime a los fenotipos de pérdida de función de Polycomb y se requiere para la expresión de los genes homeóticos. También es posible que TnaA junto con el FOLDOSOMA o independientemente, promueva la función de la ecdisona a través de regular el ensamblaje/desensamblaje de complejos que participan positiva o negativamente en la transcripción de genes regulados por esta hormona. Un ejemplo sería el complejo BRAHMA que según algunos autores se requiere para regular la expresión inducida por la ecdisona del grupo de genes *Eig*, (Zraly *et al.*, 2006; Carrera *et al.*, 2008; Zraly y Dingwall, 2012).

Las funciones de TnaA aún no están del todo claras, sin embargo resulta muy interesante su posible participación en la regulación de la expresión de los genes homeóticos entre otros, como una E3 ligasa de SUMO. Actualmente hay evidencias en la literatura que indican que la SUMOilación no ocasiona un solo efecto sino que más bien es una forma en que la célula regula muy finamente la función de ciertas proteínas en el espacio y el tiempo. Esto coloca a TnaA como un jugador con un papel importante en los mecanismos de regulación de la expresión génica.

Conclusiones finales

√ En *D. melanogaster* hay, por lo menos, dos proteínas TnaA (TnaA₁₃₀ y TnaA₁₂₃) que se expresan diferencialmente en el tiempo y el espacio.

√ Los niveles reducidos de las proteínas TnaA causan la extensión de la etapa de larva de tercer instar, donde los individuos mutantes permanecen hasta su muerte. Estas larvas presentan un patrón de expresión de proteínas alterado en las glándulas salivales.

√ TnaA interacciona físicamente con la enzima E2 conjugante de SUMO Ubc9 y con la subunidad Osa de uno de los complejos BRAHMA de *D. melanogaster*.

√ Los genes del *trxG*, *tna* y *osa* interaccionan con genes de la vía de SUMOilación (*lwr* y *smt3*). Los animales que poseen combinaciones de mutaciones en estos genes, presentan fenotipos atribuibles a la expresión incorrecta de *Antp* a partir del promotor P2.

Perspectivas

1.- Búsqueda de nuevos interactores de TnaA.

Con la finalidad de encontrar nuevos interactores de TnaA se podrían hacer inmunoprecipitaciones con los anticuerpos que ya se tienen pero partiendo de cantidades mucho mayores de extractos. Las proteínas que coimmunoprecipiten se pueden separar por electroforesis en condiciones desnaturizantes y secuenciar por espectrometría de masas. Otra estrategia son los ensayos de doble híbrido de levadura con la biblioteca pero ahora usando como carnadas fragmentos más pequeños de TnaA.

2.- Demostrar claramente que TnaA es una E3 ligasa de SUMO.

Los datos obtenidos en mi trabajo sugieren que TnaA es una E3 ligasa de SUMO, sin embargo no pudimos demostrar de una forma clara dicha actividad. La cantidad limitada de TnaA que pudimos obtener es quizás la causa de que se observara un efecto sutil de la SUMOilación de Osac₂ en presencia de TnaA. Una estrategia a seguir es el sistema de expresión de baculovirus, en donde se podría expresar a TnaA fusionada con un epítopo (por ejemplo Flag) y así obtener cantidades grandes de extractos. TnaA se podría purificar de los extractos a través de un anticuerpo que reconozca al epítopo. Otra estrategia que se podría hacer es realizar los ensayos de SUMOilación *in vitro* tal y como se hicieron pero ahora se añadiría al fragmento TnaA_{XSPRING2} en lugar de TnaA completo. Esta estrategia ha funcionado en algunas E3 ligasas de SUMO como RanBP2 en donde la actividad enzimática recae en un dominio en específico.

3.- Ensayos funcionales

Como se mencionó previamente, un punto crítico para entender la consecuencia de la SUMOilación de cualquiera de estas subunidades es contar con ensayos que nos permitan evaluar las funciones en las que participan. En fondos mutantes de *tna* se podría evaluar el reclutamiento de la ARN pol II en sus diferentes estados fosforilados a los cromosomas politénicos, lo cual daría idea acerca de si TnaA participa en el inicio o en la elongación de la transcripción. Así mismo se podría evaluar la presencia de subunidades del trxG o PcG en los cromosomas politénicos y determinar si TnaA tiene un papel en su reclutamiento.

Bibliografía

- Akam M. 1987. The molecular basis for metamereric pattern in the *Drosophila* embryo. *Development* 101: 1-22.
- Akdemir F, Christich A, Sogame N, Chapo J, Abrams JM. 2007. p53 directs focused genomic responses in *Drosophila*. *Oncogene* 26: 5184-5193.
- Akey CW, Luger K. 2003. Histone chaperones and nucleosome assembly. *Curr Opin Struct Biol* 13: 6-14.
- Arbeitman MN, Hogness DS. 2000. Molecular chaperones activate the *Drosophila* ecdysone receptor, an RXR heterodimer. *Cell* 101: 67-77.
- Armstrong JA, Papoulas O, Daubresse G, Sperling AS, Lis JT, Scott MP, Tamkun JW. 2002. The *Drosophila* BRM complex facilitates global transcription by RNA polymerase II. *EMBO J* 21: 5245-5254.
- Batsché E, Yaniv M, Muchardt C. 2005. The human SWI/SNF subunit Brm is a regulator of alternative splicing. *Nat Struct Mol Biol* 13: 22-29.
- Beisel C, Paro R. 2011. Silencing chromatin: comparing modes and mechanisms. *Nat Rev Genet* 12: 123-135.
- Bergson C, McGinnis W. 1990. An autoregulatory enhancer element of the *Drosophila* homeotic gene *Deformed*. *EMBO J* 9: 4287-4297.
- Bhaskar V, Smith M, Courey AJ. 2002. Conjugation of Smt3 to Dorsal may potentiate the *Drosophila* immune response. *Mol Cell Biol* 22: 492-504.
- Boulet A, Scott M. 1988. Control elements of the P2 promoter of the *Antennapedia* gene. *Genes Dev* 2: 1600-1614.
- Brody T, Stivers C, Nagle J, Odenwald WF. 2002. Identification of novel *Drosophila* neural precursor genes using a differential embryonic head cDNA screen. *Mech Dev* 113: 41-59.
- Burke TW, Kadonaga JT. 1997. The downstream core promoter element, DPE, is conserved from *Drosophila* to humans and is recognized by TAFII60 of *Drosophila*. *Genes Dev* 11: 3020-3031.
- Calgaro S, Boube M, Cribbs DL, Bourbon HM. 2002. The *Drosophila* gene *taranis* encodes a novel trithorax group member potentially linked to the cell cycle regulatory apparatus. *Genetics* 160: 547-560.
- Carrera I, Zavadil J, Treisman JE. 2008. Two subunits specific to the PBAP chromatin remodeling complex have distinct and redundant functions during *Drosophila* development. *Mol Cell Biol* 28: 5238-5250.
- Chalkley GE, Moshkin YM, Langenberg K, Bezstarosti K, Blastyak A, Gyurkovics H, Demmers JA, Verrijzer CP. 2008. The transcriptional coactivator SAYP is a trithorax group signature subunit of the PBAP chromatin remodeling complex. *Mol Cell Biol* 28: 2920-2929.
- Charité J, de Graaff W, Consten D, Reijnen MJ, Korving J, Deschamps J. 1998. Transducing positional information to the *Hox* genes: critical interaction of *cdx* gene products with position-sensitive regulatory elements. *Development* 125: 4349-4358.
- Chen X, Ding B, LeJeune D, Ruggiero C, Li S. 2009. Rpb1 SUMOylation in response to UV radiation or transcriptional impairment in yeast. *PLoS One* 4: e5267.
- Chiu H, Ring BC, Sorrentino RP, Kalamarz M, Garza D, Govind S. 2005. *ubc9* negatively regulates the Toll-NF- κ B pathways in larval hematopoiesis and drosomycin activation in *Drosophila*. *Dev Biol* 288: 60-72.
- Chouinard S, Kaufman TC. 1991. Control of expression of the homeotic *labial* (*lab*) locus of *Drosophila melanogaster*: evidence for both positive and negative autogenous regulation. *Development* 113: 1267-1280.

- Collins RT, Treisman JE. 2000. Osa-containing Brahma chromatin remodeling complexes are required for the repression of wingless target genes. *Genes Dev* 14: 3140-3152.
- Csermely P, Kajtar J, Hollosi M, Oikarinen J, Somogyi J. 1994. The 90 kDa heat shock protein (Hsp90) induces the condensation of the chromatin structure. *Biochem Biophys Res Commun* 202: 1657-1663.
- Davidson AJ, Zon LI. 2006. The *caudal*-related homeobox genes *cdx1a* and *cdx4* act redundantly to regulate *Hox* gene expression and the formation of putative hematopoietic stem cells during zebrafish embryogenesis. *Dev Biol* 292: 506-518.
- Day JP, Dow JA, Houslay MD, Davies SA. 2005. Cyclic nucleotide phosphodiesterases in *Drosophila melanogaster*. *Biochem J* 388: 333-342.
- Deak P, Omar MM, Saunders RD, Pal M, Komonyi O, Szidonya J, Maroy P, Zhang Y, Ashburner M, Benos P, Savakis C, Siden-Kiamos I, Louis C, Bolshakov VN, Kafatos FC, Madueno E, Modolell J, Glover DM. 1997. P-element insertion alleles of essential genes on the third chromosome of *Drosophila melanogaster*: correlation of physical and cytogenetic maps in chromosomal region 86E-87F. *Genetics* 147: 1697-1722.
- Denison C, Rudner AD, Gerber SA, Bakalarski CE, Moazed D, Gygi SP. 2005. A proteomic strategy for gaining insights into protein SUMOylation in yeast. *Mol Cell Proteomics* 4: 246-254.
- Elfring LK, Daniel C, Papoulas O, Deuring R, Sarte M, Moseley S, Beek SJ, Waldrip WR, Daubresse G, DePace A, Kennison JA, Tamkun JW. 1998. Genetic analysis of *brahma*: the *Drosophila* homolog of the yeast chromatin remodeling factor SWI2/SNF2. *Genetics* 148: 251-265.
- Freeman BC, Yamamoto KR. 2002. Disassembly of transcriptional regulatory complexes by molecular chaperones. *Science* 296: 2232-2235.
- Gareau JR, Lima CD. 2010. The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 861-871.
- Gaytán de Ayala AA, Gutiérrez L, Fritsch C, Papp B, Beuchle D, Müller J. 2007. A genetic screen identifies novel Polycomb group genes in *Drosophila*. *Genetics* 176: 2099-2108.
- Geiss-Friedlander R, Melchior F. 2007. Concepts in SUMOylation: a decade on. *Nature Review Mol Cell Biol* 8: 947-956.
- Gershenson NI, Trifonov EN, Ioshikhes IP. 2006. The features of *Drosophila* core promoters revealed by statistical analysis. *BMC Genomics* 7: 161.
- Goibert V, Osman D, Bras S, Augé B, Boube M, Bourbon HM, Horn T, Boutros M, Haenlin M, Waltzer L. 2010. A genome-wide RNA interference screen identifies a differential role of the MEDIATOR CDK8 module subunits for GATA/ RUNX-activated transcription in *Drosophila*. *Mol Cell Biol* 30: 2837-2848.
- Gorman MJ, Kaufman TC. 1995. Genetic analysis of embryonic cis-acting regulatory elements of the *Drosophila* homeotic gene *sex combs reduced*. *Genetics* 140: 557-572.
- Graba Y, Aragnol D, Pradel J. 1997. *Drosophila* Hox complex downstream targets and the function of homeotic genes. *Bioessays* 19: 379-388.
- Guan X, Middlebrooks BW, Alexander S, Wasserman SA. 2006. Mutation of TweedleD, a member of an unconventional cuticle protein family, alters body shape in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 16794-16799.
- Gutiérrez L, Zurita M, Kennison JA, Vázquez M. 2003. The *Drosophila* trithorax group gene *tonalli* (*tna*) interacts genetically with the Brahma remodeling complex and encodes an SP-RING finger protein. *Development* 130: 343-354.
- Hannich JT, Lewis A, Kroetz MB, Li SJ, Heide H, Emili A, Hochstrasser M. 2005. Defining the SUMO-modified proteome by multiple approaches in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 280: 4102-4110.

- Hargreaves DC, Crabtree GR. 2011. ATP-dependent chromatin remodeling: genetics, genomics and mechanisms. *Cell Res* 21: 396-420.
- Hochstrasser M. 2001. SP-RING for SUMO: New functions bloom for a Ubiquitin-like protein. *Cell* 107:5-8.
- Hsu JY, Juven-Gershon T, Marr MT, Wright KJ, Tjian R, Kadonaga JT. 2008. TBP, Mot1, and NC2 establish a regulatory circuit that controls DPE-dependent versus TATA-dependent transcription. *Genes Dev* 22: 2353-2358.
- Hsu SI, Yang CM, Sim KG, Hentschel DM, O'Leary E, Bonventre JV. 2001. TRIP-Br: a novel family of PHD zinc finger- and bromodomain-interacting proteins that regulate the transcriptional activity of E2F-1/DP-1. *EMBO J* 20: 2273-2285.
- Huang CY, Beliakoff J, Li X, Lee J, Li X, Sharma M, Lim B, Sun Z. 2005a. hZimp7, a novel PIAS-like protein, enhances androgen receptor-mediated transcription and interacts with SWI/SNF-like BAF complexes. *Mol Endocrinol* 19: 2915-2929.
- Huang L, Ohsako S, Tanda S. 2005b. The *lesswright* mutation activates Rel-related proteins, leading to overproduction of larval hemocytes in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 280: 407-420.
- Janody F, Treisman JE. 2011. Requirements for MEDIATOR complex subunits distinguish three classes of notch target genes at the *Drosophila* wing margin. *Dev Dyn* 240: 2051-2059.
- Juven-Gershon T, Hsu JY, Kadonaga JT. 2008. Caudal, a key developmental regulator, is a DPE-specific transcriptional factor. *Genes Dev* 22: 2823-2830.
- Juven-Gershon T, Kadonaga JT. 2010. Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery. *Dev Biol* 339: 225-229.
- Kahyo T, Nishida T, Yasuda H. 2001. Involvement of PIAS1 in the SUMOylation of tumor suppressor p53. *Mol Cell* 8: 713-718.
- Kanakousaki K, Gibson MC. 2012. A differential requirement for SUMOylation in proliferating and non-proliferating cells during *Drosophila* development. *Development* 139: 2751-2762.
- Kapoun AM, Kaufman TC. 1995. A functional analysis of 5', intronic and promoter regions of the homeotic gene *proboscipedia* in *Drosophila melanogaster*. *Development* 121: 2127-2141.
- Kaufman TC, Lewis R, Wakimoto B. 1980. Cytogenetic analysis of chromosome-3 in *Drosophila melanogaster*: the homeotic gene complex in polytene chromosome interval 84A-B. *Genetics* 94: 115-133.
- Kennison JA. 2004. Introduction to Trx-G and Pc-G genes. *Methods in Enzymology* 377: 61-70.
- Kennison JA, Tamkun JW. 1988. Dosage-dependent modifiers of *Polycomb* and *Antennapedia* mutations in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 8136-8140.
- Lewis EB. 1978. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276: 565-570.
- Lomelí H, Vázquez M. 2011. Emerging roles of the SUMO pathway in development. *Cellular and Molecular Life Sciences* 68: 4045-4064.
- Loncle N, Boubé M, Joulia L, Boschiero C, Werner M, Cribbs DL, Bourbon HM. 2007. Distinct roles for MEDIATOR Cdk8 module subunits in *Drosophila* development. *EMBO J* 26: 1045-1054.
- Luders J, Stearns T. 2007. Microtubule-organizing centers: a re-evaluation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 161-167.
- Maeda RK, Karch F. 2006. The ABC of the BX-C: the bithorax complex explained. *Development* 133: 1413-1422.

- Makhnevych T, Houry WA. 2012. The role of Hsp90 in protein complex assembly. *Biochim Biophys Acta* 1823: 674-682.
- Marenda DR, Zraly CB, Dingwall AK. 2004. The *Drosophila* Brahma (SWI/SNF) chromatin remodeling complex exhibits cell-type specific activation and repression functions. *Development Biology* 267: 279-293.
- Martens J, Winston F. 2003. Recent advances in understanding chromatin remodeling by SWI/SNF complexes. *Current Opinion in Genetics and Development* 13: 136-142.
- McQuilton P, St Pierre SE, Thurmond J, Consortium F. 2012. FlyBase 101-the basics of navigating FlyBase. *Nucleic Acids Res* 40: D706-D714.
- Mohrmann L, Langenberg K, Krijgsveld J, Kal AJ, Heck AJ, Verrijzer CP. 2004. Differential targeting of two distinct SWI/SNF-related *Drosophila* chromatin-remodeling complexes. *Mol Cell Biol* 24: 3077-3088.
- Mollaaghababa R, Sipos L, Tiong SY, Papoulas O, Armstrong JA, Tamkun JW, Bender W. 2001. Mutations in *Drosophila* heat shock cognate 4 are enhancers of Polycomb. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 3958-3963.
- Möller A, Avila FW, Erickson JW, Jäckle H. 2005. *Drosophila* BAP60 is an essential component of the Brahma complex, required for gene activation and repression. *J Mol Biol* 352: 329-337.
- Monribot-Villanueva J, Juárez-Urbe RA, Palomera-Sánchez Z, Gutiérrez-Aguilar L, Zurita M, Kennison JA, Vázquez M. 2013. TnaA, an SP-RING protein, interacts with Osa, a subunit of the chromatin remodeling complex BRAHMA and with the SUMOylation pathway in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One* 8: e62251.
- Müller J, Kassis JA. 2006. Polycomb response elements and targeting of Polycomb group proteins in *Drosophila*. *Curr Opin Genet Dev* 16: 476-484.
- Müller J, Verrijzer P. 2009. Biochemical mechanisms of gene regulation by Polycomb group protein complexes. *Curr Opin Genet Dev* 19: 150-158.
- Nathan D, Ingvarsdottir K, Sterner DE, Bylebyl GR, Dokmanovic M, Dorsey JA, Whelan KA, Krsmanovic M, Lane WS, Meluh PB, Johnson ES, Berger SL. 2006. Histone SUMOylation is a negative regulator in *Saccharomyces cerevisiae* and shows dynamic interplay with positive-acting histone modifications. *Genes Dev* 20: 966-976.
- Nie M, Xie Y, Loo JA, Courey AJ. 2009. Genetic and proteomic evidence for roles of *Drosophila* SUMO in cell cycle control, Ras signaling, and early pattern formation. *PLoS One* 4: e5905.
- Novatchkova M, Tomanov K, Hofmann K, Stuiblé HP, Bachmair A. 2012. Update on SUMOylation: defining core components of the plant SUMO conjugation system by phylogenetic comparison. *New Phytol* 195: 23-31.
- Panse VG, Hardeland U, Werner T, Kuster B, Hurt E. 2004. A proteome-wide approach identifies SUMOylated substrate proteins in yeast. *J Biol Chem* 279: 41346-41351.
- Papoulas O, Beek SJ, Moseley SL, McCallum CM, Sarte M, Shearn A, Tamkun JW. 1998. The *Drosophila* trithorax group proteins Brm, Ash1 and Ash2 are subunits of distinct protein complexes. *Development* 125: 3955-3966.
- Phelan ML, Sif S, Narlikar GJ, Kingston RE. 1999. Reconstitution of a core chromatin remodeling complex from SWI/SNF subunits. *Molecular Cell* 3: 247-253.
- Pilot F, Philippe JM, Lemmers C, Chauvin JP, Lecuit T. 2006. Developmental control of nuclear morphogenesis and anchoring by charleston, identified in a functional genomic screen of *Drosophila* cellularisation, *Development* 133: 711-723.
- Praefcke GJ, Hofmann K, Dohmen RJ. 2012. SUMO playing tag with ubiquitin. *Trends Biochem Sci* 37: 23-31.
- Pratt, WB, Toft DO. 2003. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp Biol Med (Maywood)* 228: 111-133.

- Rosonina E, Duncan SM, Manley JL. 2010. SUMO functions in constitutive transcription and during activation of inducible genes in yeast. *Genes Dev* 24: 1242-1252.
- Schnaider T, Oikarinen J, Ishiwatari-Hayasaka H, Yahara I, Csermely P. 1999. Interactions of Hsp90 with histones and related peptides. *Life Sci* 65: 2417-2426.
- Schuettengruber B, Martínez AM, Iovino N, Cavalli G. 2011. trithorax group proteins: switching genes on and keeping them active. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12: 799-814.
- Sharma M, Li X, Wang Y, Zarnegar M, Huang CY, Palvimo JJ, Lim B, Sun Z. 2003. hZimp10 is an androgen receptor co-activator and forms a complex with SUMO-1 at replication foci. *EMBO J* 22: 6101-6114.
- Shilatifard A. 2012. The COMPASS family of histone H3K4 methylases: mechanisms of regulation in development and disease pathogenesis. *Annu Rev Biochem* 81: 65-95.
- Sikorski TW, Buratowski S. 2009. The basal initiation machinery: beyond the general transcription factors. *Curr Opin Cell Biol* 21: 344-351.
- Sim KG, Zang Z, Yang CM, Bonventre JV, Hsu SI. 2004. TRIP-Br links E2F to novel functions in the regulation of cyclin E expression during cell cycle progression and in the maintenance of genomic stability. *Cell Cycle* 3: 1296-1304.
- Smith M, Bhaskar V, Fernandez J, Courey AJ. 2004. *Drosophila* Ulp1, a nuclear pore-associated SUMO protease, prevents accumulation of cutoplasmic SUMO conjugates. *J Biol Chem* 279: 43805-43814.
- Smith M, Mallin DR, Simon JA, Courey AJ. 2011. Small ubiquitin-like modifier (SUMO) conjugation impedes transcriptional silencing by the Polycomb group repressor Sex comb on midleg. *J Biol Chem* 286: 11391-11400.
- Southworth JW, Kennison JA. 2002. Transvection and silencing of the *Scr* homeotic gene of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 161: 733-746.
- Srinivasan S, Dorighi KM, Tamkun JW. 2008. *Drosophila* Kismet regulates histone H3 lysine 27 methylation and early elongation by RNA polymerase II. *PLoS Genet* 4: e1000217.
- Sugimoto M, Nakamura T, Ohtani N, Hampson L, Hampson IN, Shimamoto A, Furuichi Y, Okumura K, Niwa S, Taya Y, Hara E. 1999. Regulation of CDK4 activity by a novel CDK4-binding protein, p34(SEI-1). *Genes Dev* 13: 3027-3033.
- Taatjes DJ. 2010. The human MEDIATOR complex: a versatile, genome-wide regulator of transcription. *Trends Biochem Sci* 35: 315-322.
- Takahashi Y, Kikuchi Y. 2005. Yeast PIAS-type Ull1/Siz1 is composed of SUMO ligase and regulatory domains. *J Biol Chem* 280: 35822-35828.
- Talamillo A, Herboso L, Pirone L, Pérez C, González M, Sánchez J, Mayor U, Lopitz-Otsoa F, Rodriguez MS, Sutherland JD, Barrio R. 2013. Scavenger Receptors Mediate the Role of SUMO and Ftz-f1 in *Drosophila* Steroidogenesis. *PLoS Genet* 9: e1003473.
- Talamillo A, Sánchez J, Barrio R. 2008a. Functional analysis of the SUMOylation pathway in *Drosophila*. *Biochemical Society Transactions* 36: 868-873.
- Talamillo A, Sánchez J, Cantera R, Pérez C, Martín D, Caminero E, Barrio R. 2008b. Smt3 is required for *Drosophila melanogaster* metamorphosis. *Development* 135: 1659-1668.
- Talbert P, Garber R. 1994. The *Drosophila* homeotic mutation *Nasobemia* (*AntpNs*) and its revertants: An analysis of mutational reversion. *Genetics* 138: 709-720.

- Tang DJ, Hu L, Xie D, Wu QL, Fang Y, Zeng Y, Sham JS, Guan XY. 2005. Oncogenic transformation by SEI-1 is associated with chromosomal instability. *Cancer Res* 65: 6504-6508.
- Tariq M, Nussbaumer U, Chen Y, Beisel C, Paro R. 2009. Trithorax requires Hsp90 for maintenance of active chromatin at sites of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 1157-1162.
- Tyagi A, Ryme J, Brodin D, Ostlund Farrants AK, Visa N. 2009. SWI/SNF associates with nascent pre-mRNPs and regulates alternative pre-mRNA processing. *PLoS Genet* 5: e1000470.
- Vázquez M, Cooper MT, Zurita M, Kennison JA. 2008. γ Tub23C interacts genetically with Brahma Chromatin-Remodeling Complexes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 180: 835-843.
- Vázquez M, Moore L, Kennison JA. 1999. The trithorax group gene *osa* encodes an ARID-domain protein that genetically interacts with the Brahma chromatin-remodeling factor to regulate transcription. *Development* 126: 733-742.
- Vethantham V, Rao N, Manley JL. 2007. SUMOylation modulates the assembly and activity of the pre-mRNA 3' processing complex. *Mol Cell Biol* 27: 8848-8858.
- Vikis HG, Guan KL. 2004. Glutathione-S-transferase-fusion based assays for studying protein-protein interactions. *Methods Mol Biol* 261: 175-186.
- Watanabe-Fukunaga R, Iida S, Shimizu Y, Nagata S, Fukunaga R. 2005. SEI family of nuclear factors regulates p53-dependent transcriptional activation. *Genes Cells* 10: 851-860.
- Whittaker AJ, Royzman I, Orr-Weaver TL. 2000. *Drosophila* double parked: a conserved, essential replication protein that colocalizes with the origin recognition complex and links DNA replication with mitosis and the down-regulation of S phase transcripts. *Genes Dev* 14: 1765-1776.
- Wohlschlegel JA, Johnson ES, Reed SI, Yates JR, III. 2004. Global analysis of protein SUMOylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 279: 45662-45668.
- Wu Y, Li Q, Chen XZ. 2007. Detecting protein-protein interactions by Far western blotting. *Nat Protoc* 2: 3278-3284.
- Wykoff DD, O'Shea EK. 2005. Identification of SUMOylated proteins by systematic immunoprecipitation of the budding yeast proteome. *Mol Cell Proteomics* 4: 73-83.
- Zhang H, Smolen GA, Palmer R, Christoforou A, van den HS, Haber DA. 2004. SUMO modification is required for *in vivo* *Hox* gene regulation by the *Caenorhabditis elegans* Polycomb group protein SOP-2. *Nat Genet* 36: 507-511.
- Zhou Q, Li T, Price DH. 2012. RNA polymerase II elongation control. *Annu Rev Biochem* 81: 119-143.
- Zhou W, Ryan JJ, Zhou H. 2004. Global analyses of SUMOylated proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. Induction of protein SUMOylation by cellular stresses. *J Biol Chem* 279: 32262-32268.
- Zraly CB, Dingwall AK. 2012. The chromatin remodeling and mRNA splicing functions of the Brahma (SWI/SNF) complex are mediated by the SNR1/SNF5 regulatory subunit. *Nucleic Acids Res* 40: 5975-5987.
- Zraly CB, Middleton FA, Dingwall AK. 2006. Hormone-response genes are direct *in vivo* regulatory targets of BRAHMA (SWI/SNF) complex function. *J Biol Chem* 281: 35305-35315.

ANEXO I

“Far Western”.

El protocolo que se siguió es el descrito por Wu *et al.* (2007). A continuación se describen las modificaciones que se realizaron al protocolo. El bloqueo de las membranas se realizó con una solución de 10% de leche en PBST [PBS (4 mM de KH_2PO_4 , 16 mM de Na_2HPO_4 y 115 mM de NaCl , pH 7.4) más 0.05% de Tween 20] por 1 h a temperatura ambiente. Las carnadas GST-Tna A_{NH_2-1} y GST (aproximadamente 3 μg de cada una) se incubaron con las membranas en una solución de 5% de leche en el “binding buffer” (Wu *et al.*, 2007) por 2 h a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron con el anticuerpo primario Tna A_{NH_2-1} (dilución 1:4000) en una solución del 5% de leche en PBST por 1 h a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario anti-rata (dilución 1:2000) en una solución del 5% de leche en PBST por 1 h a temperatura ambiente.

ANEXO II

Construcción de la biblioteca de ADNc para ensayos interacción de doble híbrido de levadura.

1.- Obtención de ARNm de embriones de *D. melanogaster* y purificación de ARN poliA.

El protocolo utilizado es el descrito por el proveedor del reactivo Trizol (Invitrogen). Los embriones de 3-21 h de *D. melanogaster* (1 g) se homogenizaron con el reactivo Trizol (10 mL) y el homogenado se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Al homogenado se le adicionaron 2 mL de cloroformo y se agitó vigorosamente durante 15 seg. Después se dejó reposar 3 min y se centrifugó a 12 000 x g por 15 min a 4°C. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se adicionaron 5 mL de isopropanol. La mezcla anterior se incubó por 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12 000 x g por 10 min a 4°C. El sobrenadante se removió, se adicionaron 10 mL de etanol al 75% y se mezcló vigorosamente con vórtex. Después se centrifugó a 7500 x g durante 5 min a 4°C.

El ARN se dejó secar al medio ambiente y se resuspendió con 100 µL del buffer de elusión (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA y 0.2% SDS). Se midió la OD₂₆₀ a la última solución y se ajustó para que quedara a una concentración de 1 mg en 0.5 a 1 mL. La solución de ARN se incubó a 55°C por 10 min y posteriormente se adicionó un volumen igual del “binding buffer” 2X (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1M NaCl, 1 mM EDTA y 0.8% SDS). La mezcla anterior se enfrió a temperatura ambiente, se adicionaron 20 µL de oligo-dT celulosa y se agitó con vórtex e incubó 30 min a temperatura ambiente en un plato giratorio. Después se centrifugó y la pastilla se lavó 5 veces con 50 µL de 1X “binding buffer”. La mezcla ARN-oligo-dT celulosa se eluyó 3 veces (20 µL en cada ocasión) con el buffer de elusión a una temperatura de 65°C. Las tres eluciones se mezclaron, se midió el volumen final y se adicionó 1/10 del volumen total de CH₃COONa 3 M, pH 5.2. Posteriormente, a la solución anterior se adicionaron 2 volúmenes de etanol al 100% y se dejó reposar 2 h a -20°C. La mezcla fue centrifugada a 5000 x g durante 60 min a 4°C y se decantó. La pastilla se lavó 2 veces con 1 mL de etanol al 70%. Finalmente, la pastilla se dejó secar y se resuspendió en 100 µL de buffer de elusión. Nuevamente a la solución se le midió la OD₂₆₀ y se repitió todo el proceso de purificación previamente explicado en este párrafo. La resuspensión final se hizo en 6 µL de agua. La concentración final fue de 531.2 ng/µL.

2.- Construcción de la biblioteca de ADNc.

La biblioteca de ADNc se construyó según el manual del proveedor del kit “BD Matchmaker™ Library Construction and Screening Kits” de la casa comercial BD Biosciences Clontech. La síntesis de la primera hebra del ADNc se realizó utilizando 1 µL de cebadores aleatorios (cebador “CDS III/6” del kit), 2 µL de ARN poliA (aproximadamente 1 µg) y 1 µL de agua desionizada. Esta mezcla se incubó a 72°C por 2 min. Posteriormente se incubó en hielo por 2 min y se añadieron 2 µL del 5X “First-Strand Buffer” (provisto en el kit), 1 µL de DTT (20 mM), 1 µL de dNTP Mix (10 mM) y 1 µL de la transcriptasa reversa MMLV. La mezcla anterior se agitó y se centrifugó brevemente y luego se incubó a 42°C por 10 min. Después se adicionó 1 µL del cebador BD SMART III (provisto en el kit) y se incubó a 42°C por 1 h. Transcurrido este último tiempo, la mezcla se incubó a 72°C por 10 min para luego dejar enfriar a temperatura ambiente. Una vez temperado el vial, se añadieron 2 unidades de ARNasa H y se incubó a 37°C por 20 min. De esta última reacción se tomaron 2 µL y se añadieron a 70 µL de agua desionizada más los siguientes reactivos del kit: 10 µL de 10X BD Advantage 2 PCR Buffer, 2 µL de 50X dNTP Mix, 2 µL del “5´ PCR Primer”, 2 µL del “3´ PCR Primer”, 10 µL de “10X GC-Melt Solution” y 2 µL del “50X BD Advantage 2 Polymerase Mix”. La mezcla se agitó brevemente y se colocó en un termociclador con el siguiente programa: 1 ciclo de 95°C por 30 seg, 20 ciclos de 95°C por 10 seg y 68°C por 6 min (el tiempo de incubación a 68°C aumentó 5 seg por ciclo) y 1 ciclo de 68°C por 5 min.

El ADNc de doble cadena sintetizado se colocó en una columna “BD CHROMA SPIN™ TE-400” (provista en el kit) y se centrifugó a 700 x g durante 5 min a 4°C. Al eluido se le agregó 1/10 del volumen de CH₃COONa 3 M, pH 4.8 y 2.5 volúmenes de etanol al 95% preenfriado a -20°C y se incubó a -20°C por 1 h. Posteriormente la mezcla se centrifugó a 14 000 x rpm durante 20 min a temperatura ambiente. Se removió el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente la pastilla se resuspendió con 20 µL de agua desionizada.

3.- Transformación de levaduras.

1 mL de medio de cultivo YPDA (20 g/L de Difco peptona, 10 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de glucosa y 15 mL de una solución de adenina al 0.2%) fue inoculado con varias colonias de 2-3 mm de diámetro de la cepa AH109. Esta suspensión celular se agitó vigorosamente durante 5 min y se transfirió a un matraz que contenía 50 mL de YPDA. Posteriormente se incubó a 30°C durante 18 h con

agitación de 250 rpm hasta alcanzar la fase estacionaria (OD_{600} mayor a 1.5). El cultivo anterior (30 mL) se transfirió a un matraz que contenía 300 mL de YPDA. La concentración celular se ajustó con medio de cultivo hasta que se obtuvo una OD_{600} entre 0.2 a 0.3. Las células se incubaron a 30°C durante 30 h con agitación (230 rpm). La OD_{600} final fue de 0.4 a 0.6. Las células se transfirieron a tubos de 50 mL (Falcon) y se centrifugaron a 700 x g por 5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se desechó y las células se resuspendieron en buffer 1X TE estéril (provisto por el kit). Las células se mezclaron en un solo tubo en un volumen final de 25-50 ml y se centrifugaron a 700 x g por 5 min a temperatura ambiente. El tubo se decantó y la pastilla se resuspendió en 1.5 mL de 1X TE/1X LiAc estéril (provisto en el kit) .

En un vial eppendorf estéril se colocó los 20 μ L correspondientes al ADNc más 6 μ L del vector pGADT7-Rec (este vector permite la clonación de insertos a través de recombinación *in vivo*), 20 μ L del acarreador de ADN “Herring Testes” (provisto en el kit) y 600 μ L de las células. La mezcla anterior se agitó brevemente y se añadió 2.5 mL de la solución PEG/LiAc estéril (8 mL de polietilenglicol al 50%, 1 mL del buffer TE 10X y 1 mL de acetato de litio 1 M). Posteriormente, la mezcla se volvió a agitar vigorosamente en el vórtex a alta velocidad por 10 seg y luego se incubó a 30°C durante 30 min con agitación de 200 rpm y se añadió 160 μ l de DMSO. El tubo se mezcló por inversión suave. Después las células se incubaron a 42°C durante 15 min y transcurrido el tiempo se incubaron en hielo durante 1 a 2 minutos. Las células se centrifugaron a 700 x g por 5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se desechó y las células se resuspendieron en 1 mL de YPD plus (2X YPDA sin adenina) y se incubaron a 30°C con agitación durante 90 min. Las células se centrifugaron a 700 x g por 5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se desechó y las células se resuspendieron en 0.5 mL del buffer 1X TE. Se inocularon 150 μ L de células en cajas Petri que contenían el medio de cultivo SD/-Leu (26.7 g/L de “Minimal SD base”, 0.69 g/L del suplemento -Leu y 20 g/L de Agar). Las placas se incubaron a 30°C durante 3 días.

Después de los 3 días de cultivo, las placas se incubaron a 4°C por 4 h y luego se les añadieron 5 mL del medio para congelamiento (Medio YPD 1X más 25% de glicerol). Las células se dispersaron con perlas de vidrio estériles y se mezclaron las correspondientes de todas las placas. Con una cámara de Neubauer se corroboró que la concentración celular fuera menor o igual a 2×10^7 células/mL. El título de la biblioteca obtenida fue de 159 000 000 UFC/ml cuando lo recomendado por el proveedor

es de mayor o igual a 20 000 000 UFC/ml. Finalmente se realizaron alícuotas de 1 mL y se almacenarán a -80°C.

4.- Ensayo de interacción física por apareamiento.

Los ensayos de interacción física por doble híbrido de levadura se realizaron conforme al protocolo descrito por el proveedor del kit “BD Matchmaker™ Library Construction and Screening Kits” de la casa comercial BD Biosciences Clontech. La búsqueda de proteínas interaccionantes se realizó por apareamiento entre levaduras de la cepa AH109 que contenían a la biblioteca clonada en el vector pGADT7-Rec y levaduras de la cepa Y187 que contenían a las diferentes carnadas clonadas en el vector pGBKT7 (explicado en la sección de Materiales y Métodos del artículo). Para el apareamiento de cepas de levadura se mezcló, en un matraz de 2 L, una alícuota de 1 mL de la biblioteca y 5 mL de un cultivo de toda la noche de la levadura que contenía a la carnada y se añadió 45 mL del medio de cultivo 2X YPDA más kanamicina (50 µg/mL). Las células se incubaron a 30°C por 24 h con una agitación leve de 30 rpm. Posteriormente las células se centrifugaron a 1 000 x g por 10 min y la pastilla se resuspendió en 10 mL de 0.5X YPDA más kanamicina (50 µg/mL).

La selección de levaduras diploides que expresan proteínas que interaccionan se logró a través de evaluar el crecimiento en el medio de cultivo SD/-Leu/-Trp/-Ade/-His (26.7 g/L de “Minimal SD base”, 0.60 g/L del suplemento -Leu/Trp/-Ade/-His, 3 mM de 3-amino-1,2,4-triazole y 20 g/L de Agar), el cual carece de adenina, histidina, triptófano y leucina. La presencia de los vectores pGBKT7 y pGADT7 le permite a la levadura diploide el crecimiento en un medio que carece de triptófano y leucina, respectivamente debido a que se expresan los genes reporteros *ADE2* e *HIS3*. Si las proteínas que expresa la levadura diploide interaccionan, se restaura la actividad del factor transcripcional Gal4 y permite la expresión de genes reporteros que le permiten a la célula el crecimiento en un medio deficiente en adenina e histidina. El sistema cuenta en total con cuatro genes reporteros. Como se mencionó previamente, dos de ellos permiten el crecimiento de las células diploides en ausencia de adenina (*ADE2*) e histidina (*HIS3*). Los otros dos genes reporteros se evalúan con ensayos de β- (*lacZ*) y α- (*MEL1*) galactosidasa. Es necesario mencionar que los genes reporteros *lacZ* y *MEL1* son regulados por la misma secuencia UAS (“Upstream Activating Sequence”). En los ensayos de interacción por doble híbrido realizados en el presente trabajo demostraron que aquellas interacciones que permiten la expresión de los genes reporteros *ADE2* e *HIS3* siempre activan la expresión de *lacZ*.

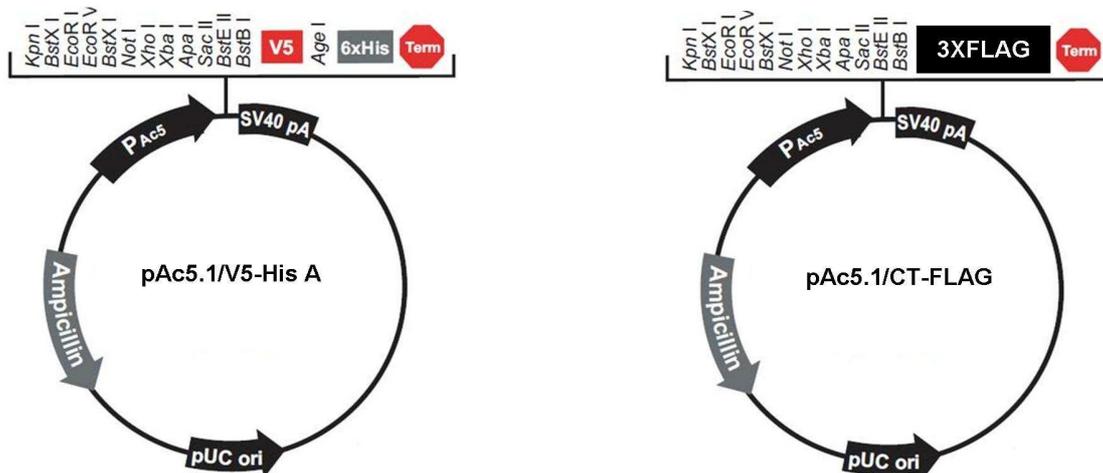
Con los ensayos de α -galactosidasa no se obtuvieron datos concluyentes debido a que todas las colonias diploides se ponen de color azul en un momento dado.

ANEXO III

Oligonucleótidos utilizados para la clonación de TnaA y Osa_{C2} en los vectores pAc5.1/V5-His y pAc5.1/CT-Flag, respectivamente.

Oligo	Año	Clave	Secuencia (5' a 3')	Uso
266	2012	Osa2CtFor	CCG GAA TTC AAC GAT ATG GTC ACG CGA AAG GGT	Oligo "Forward" para la clonación de Osa _{C2} en el vector pAc5.1/CT-Flag
267	2012	Osa2CtRev	CGT TCT AGA CGT ACC GCA GCT GTT GCT GTT G	Oligo "Reverse" para la clonación de Osa _{C2} en el vector pAc5.1/CT-Flag
268	2012	TnaCtFor	CCG GAA TTC AAC GAT ATG GGC CAA ATC TCA CCG CCA GGT GCC ACA AC	Oligo "Forward" para la clonación de TnaA en el vector pAc5.1/CT-Flag
269	2012	TnaCtRev	CGT TCT AGA GAA TAA CGT GGC CAG CAA GTC GTC GCT G	Oligo "Reverse" para la clonación de TnaA en el vector pAc5.1/CT-Flag

Vectores de expresión de células S2R⁺ de *D. melanogaster*.



pUC ori: Origen de replicación. Permite un número alto de copias.

pAc5: Promotor del gen *Actina 5C* de *D. melanogaster*. Permite la expresión constitutiva de las proteínas heterólogas en altos niveles.

SV40 pA: Señal de poliadenilación tardía. Permite la eficiente terminación y poliadenilación del ARNm.

Ampicillin: Gen de β-lactamasa. Permite a *E. coli* crecer en presencia de ampicilina.

El proveedor del sistema de expresión es Invitrogen.