



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

**INTERACCIÓN GENÉTICA Y MOLECULAR DE LA SUBUNIDAD DMP52 DE TFIIH
Y DP53 EN EL DESARROLLO DEL ALA DE *DROSOPHILA MELANOGASTER***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. EN C. MARÍA CLAUDIA VILICAÑA TORRES

TUTOR PRINCIPAL:

**DR. MARIO ENRIQUE ZURITA ORTEGA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**DRA. CLAUDIA LYDIA TREVIÑO SANTACRUZ
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**DR. DAVID RENE ROMERO CAMARENA
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS**

CUERNAVACA, MORELOS. OCTUBRE, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

Con todo mi amor, a mis padres Sara Torres Anguiano y Luis Villicaña Valle, por quienes he llegado a ser quien soy y por ser el ejemplo de trabajo y esfuerzo.

A mis hermanos: Alejandra Sarai, Ezequiel, Laura, Ana Xochil, José Luis y Adriana, por ser la inspiración para ser mejor cada día.

A mi hermosa sobrina Violeta.

A mi esposo Darío, por brindarme el apoyo y la comprensión para realizar este sueño, y sobretodo por su infinito amor.

A mi adorada hija Ana Isabel, por mostrarme el milagro de la vida y por ser el motor de mi mundo.

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por la beca doctoral otorgada para la realización de este posgrado, por el apoyo financiero otorgado por PAPIIT/UNAM 20109-3, CONACYT Grant 127440, IXTLI/UNAM, la fundación Miguel Alemán y por los fondos de Howard Hughes Medical Institute.

Agradezco a mi tutor el Dr. Mario Enrique Zurita Ortega por toda la calidad humana y profesional brindada durante estos años de doctorado, por permitir el desarrollo profesional y de carácter de muchas habilidades en su laboratorio así como por su asesoría y su total disposición que permitieron que este proyecto saliera adelante.

A las Dras. Martha Vázquez Laslop, Dra. Viviana Valadez Graham y Dra. Denhí Schnabel Peraza por todas sus críticas, consejos y apoyo en el desarrollo y refinamiento de este trabajo. También quiero agradecer al M. en C. Andrés Saralegui Amaro por toda su ayuda y asesoramiento en el uso del microscopio confocal. A la laboratorista María del Carmen Muñoz García por el excelente apoyo técnico brindado. A René Hernández por todo su apoyo y alegría en el laboratorio.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio Zoraya, Mariana, Juan Luis, Brenda, Alyeri, Silvia, Dafne, Mandy, Cynthia y Carlos, por el apoyo en todo momento, por compartir alegrías y algunos apuros que nunca faltan en esta carrera. Especialmente quiero agradecer a Grisel, quien con su valiosa ayuda permitió que este proyecto llegara a su fin. A todos muchas gracias por su comprensión ya que como estudiantes sabemos lo difícil que es el camino que hay que seguir para lograr nuestros proyectos.

El jurado de Examen Doctoral estuvo formado por:

Dra. Diana Escalante Alcalde
Dr. Federico Sánchez Rodríguez
Dra. Helena Porta Ducoing
Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz
Dra. Leonor Pérez Martínez

RESUMEN

TFIIH es un complejo multiproteico conformado por 10 subunidades que participan en la regulación de la transcripción mediada por la RNA polimerasa I y II, el ciclo celular y la reparación por escisión de nucleótidos (NER). Mutaciones en las subunidades XPB, XPD y p8 generan en humanos 3 síndromes fotosensibles: xeroderma pigmentosum (XP), síndrome de Cockayne (CS) y tricotiodistrofia (TTD). Otros síndromes asociados a mutaciones en otras subunidades no han sido reportados sugiriendo que las mutaciones podrían ser deletéreas durante el desarrollo del organismo resultando en muerte prematura. Las mutantes Dmp52 en *D. melanogaster* caracterizadas por Fregoso *et al.* (2007) mostraron fenotipos similares a los observados en pacientes XP, CS y TTD. No obstante, la interpretación de estos fenotipos es difícil debido a que no es posible distinguir si son un efecto directo de la ausencia de Dmp52 o la acumulación de daño durante el desarrollo. En este trabajo se demostró que Dp53 interacciona físicamente con Dmp52 *in vitro* e *in vivo* indicando una nueva interacción de Dp53 con otro componente de TFIIH. Asimismo, se evaluó la interacción genética entre Dmp52 y Dp53 utilizando dsRNA dirigido a los discos imagales de ala. La disminución de los niveles de Dmp52 generó defectos en el crecimiento y alteración en los patrones de venación del ala con la aparición de venas ectópicas. El defecto en el crecimiento se asoció a la disminución en el tamaño de cada célula y el número de células totales. Los discos de ala con niveles reducidos de Dmp52 presentaron apoptosis pero no alteraciones en el progreso del ciclo celular en el estadio analizado indicando que la disminución del número de células totales podría asociarse a la muerte celular. Interesantemente, la expresión de una dominante negativa de Dp53 (*GUS-Ctp53DM*) generó apoptosis masiva en los discos de ala, la cual se asoció a la acumulación de DNA dañado e inestabilidad cromosomal. Asimismo, se determinó que la apoptosis masiva en los discos con niveles reducidos de Dmp52 y Dp53 es dependiente de JNK. La inhibición farmacológica de TFIIH utilizando la droga triptolide fenocopió la apoptosis dependiente de JNK en discos deficientes en Dp53 demostrando que el mecanismo de acción del triptolide involucra la activación de la vía de JNK en células deficientes en Dp53. Este conocimiento resulta importante para el tratamiento de tumores deficientes en p53 así como para entender como la pérdida de función de TFIIH genera los fenotipos observados en pacientes deficientes en TFIIH.

ABSTRACT

TFIIH is a multiprotein complex conformed for 10 subunits which is involved in regulation of RNA polymerase I and II transcription, cell cycle and nucleotide excision repair (NER). Mutations in either of the genes encoding XPD, XPB and p8 generate 3 human photosensitive syndromes: xeroderma pigmentosum (XP), Cockayne syndrome (CS) and trichothiodystrophy (TTD). Other syndromes associated to mutations in different subunits have not been reported suggesting these mutations could be deleterious during development causing organisms death. In *D. melanogaster*, characterization of Dmp52 mutations by Fregoso *et al.* (2007) showed similar phenotypes to those observed in XP, CS and TTD patients. However, the interpretation of these phenotypes is difficult since it is not possible to distinguish whether they are a direct effect of loss of Dmp52 or the accumulation of damage during development. In this work, we demonstrated that Dp53 physically interacts with Dmp52 *in vitro* and *in vivo* indicating a novel interaction of Dp53 with another TFIIH subunit. Likewise, we evaluated the genetic interaction between Dmp52 and Dp53 using a dsRNA directed at imaginal wing discs. Reduction of Dmp52 levels generates growth defects and venation pattern alteration, rising ectopic veins. Growth defects are associated with reduction in cell size and the number of total cells. Dmp52-depleted wing discs showed apoptosis but no cell cycle alterations in the analyzed developmental stage indicating that reducing of the number of total cells could be associated to cell death. Interestingly, coexpression of a Dp53 dominant negative (*GUS-Ctp53DN*) generated massive apoptosis in wing discs, which was associated to DNA damage accumulation and chromosomal instability. Moreover, it was determined that massive apoptosis in Dmp52 and Dp53-depleted wing discs was JNK-dependent. Pharmacologic inhibition of TFIIH with triptolide drug phenocopied JNK-dependent apoptosis in Dp53-depleted wing discs demonstrating that mechanism of action of triptolide involved JNK-pathway activation in Dp53-depleted cells. This knowledge is important for the treatment of Dp53-deficient tumors as well to understand how loss of function of TFIIH generates observed phenotypes in patients with TFIIH deficiency.

CONTENIDO

CAPÍTULO	TEMA	PÁGINA
I.	INTRODUCCION.....	1
1.1	Estructura y función de TFIIH.....	1
1.2	Otras funciones de las subunidades independientemente de TFIIH.....	6
1.3	Efecto de las mutaciones en TFIIH.....	6
1.4	Respuestas de daño al DNA: p53 y JNK.....	9
1.4.1	p53.....	10
1.4.2	JNK.....	11
II.	ANTECEDENTES.....	13
III.	JUSTIFICACIÓN.....	16
IV.	HIPÓTESIS.....	16
V.	OBJETIVOS.....	17
5.1	Objetivo general.....	17
5.2	Objetivos particulares.....	17
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
6.1	STOCKS DE MOSCAS UTILIZADOS.....	18
6.2	BIOLOGÍA MOLECULAR.....	18
6.2.1	Clonaciones.....	18
6.2.2	Extracción de DNA genómico de mosca.....	18
6.2.3	Extracción de RNA total y síntesis de cDNA.....	19
6.2.4	Reacciones de PCR.....	19
6.2.5	Precipitación de DNA.....	20
6.2.6	Purificación de DNA de geles de agarosa.....	20
6.2.7	Ligación y lavados con butanol.....	20
6.2.8	Preparación de células electrocompetentes.....	21
6.2.9	Electroporación.....	21
6.3	EXTRACTOS TOTALES DE PROTEÍNAS.....	21
6.4	ENSAYO DE PULLDOWN.....	22
6.4.1	Transcripción y traducción <i>in vitro</i>	22
6.4.2	Inducción y purificación de proteínas de fusión a GST.....	22
6.4.3	Ensayo de pulldown.....	23
6.5	CULTIVO DE CÉLULAS S2R ⁺ DE <i>D. melanogaster</i>	23
6.5.1	Generación de vectores y construcciones.....	23

6.5.1.1 Clonación de Dp53 en pAc5.1/V5-HisA.....	23
6.5.1.2 Generación de los vectores pAc5.1/CT-FLAG y pAc5.1/NT-FLAG.....	24
6.5.1.3 Clonación de Dmp52 en el vector pAc5.1/NT-FLAG.....	26
6.5.2 Mantenimiento de la línea celular.....	27
6.5.3 Transfecciones transientes y extractos totales de proteínas de células S2R ⁺	27
6.5.4 Inmunoprecipitaciones y anticuerpos.....	27
6.5.5 Competencia del anticuerpo α -p52.....	28
6.6 DISECCIÓN Y ANÁLISIS DE ALAS.....	28
6.7 ENSAYO DE PÉRDIDA DE HETEROCIGOSIDAD.....	29
6.8 TINCIONES DE DISCOS DE ALA.....	29
6.8.1 Ensayo de TUNEL.....	29
6.8.2 Tinción con naranja de acridina.....	30
6.8.3 Inmunotinción de discos con 5-bromodeoxiuridina (BrdU).....	30
6.8.4 Inmunotinción de discos con H3Pser10 y P-JNK.....	30
6.9 TRATAMIENTO CON TRIPTOLIDE.....	31
VII. RESULTADOS.....	32
7.1 La subunidad Dmp52 de TFIIH interacciona físicamente con el supresor tumoral Dp53.....	33
7.1.1 Dp53 interacciona <i>in vivo</i> con componentes de TFIIH.....	33
7.1.2 Interacción <i>in vitro</i> : Ensayo de Pulldown.....	35
7.2 La disminución de los niveles de Dmp52 genera una reducción en el tamaño del ala y defectos en los patrones de venación.....	38
7.3 Los defectos generados por la disminución de los niveles de Dmp52 están asociados a la pérdida de función de TFIIH	42
7.4 La disminución de los niveles de Dmp52 genera apoptosis.	44
7.5 Dmp52 interacciona genéticamente con Dp53 generando deformaciones en el ala y apoptosis masiva	47
7.6 La apoptosis masiva independiente de Dp53 es inducida por JNK.....	51
7.7 La pérdida de función de Dmp52 y Dp53 incrementa la inestabilidad cromosomal	54
7.8 La incubación con triptolide fenocopia la apoptosis inducida en moscas <i>MS1096>Dmp52i, GUS-Ctp53DN</i>	56
VIII. DISCUSIÓN.....	58

8.1. Los defectos en el crecimiento en las moscas con niveles reducidos de Dmp52.....	58
8.2 La inducción de apoptosis e inestabilidad cromosomal.....	59
8.3 Interacciones físicas vs interacciones genéticas.....	62
8.4 Modelo.....	64
IX. CONCLUSIONES.....	65
X. PERSPECTIVAS.....	66
XI. ANEXO.....	67
ANEXO I. Competencia del anticuerpo de Dmp52.....	67
ANEXO II. Las mutaciones en Dmp52 suprimen parcialmente la apoptosis inducida por la sobreexpresión de Dp53	68
XII. REFERENCIAS.....	69
XIII. PUBLICACIÓN.....	79

I. INTRODUCCIÓN

La transcripción y la reparación del DNA son procesos que requieren de una regulación fina para lograr una respuesta específica y controlada de los mismos. Muchos complejos multiproteicos se encuentran involucrados en la regulación de estos procesos por lo que el intercambio entre componentes así como las interacciones transitorias entre ellos son comunes. Uno de los complejos involucrados en la transcripción y la reparación del DNA es TFIIH, el cual está conformado por varias subunidades. La complejidad en las funciones que realiza TFIIH aumenta si consideramos que este complejo establece varias interacciones con factores transcripcionales que incluyen los receptores hormonales, los supresores tumorales, el RNA, las proteínas virales y de reparación entre otras (Zurita y Merino, 2003), por lo que la comprensión de sus funciones e interacciones resulta indispensable para entender la relación genotipo-fenotipo existente en pacientes que presentan deficiencias en TFIIH.

1.1 Estructura y función de TFIIH

TFIIH es un complejo conformado por 10 subunidades: XPB, XPD, CDK7, p44, p62, p52, p34, mat1, ciclina H y p8. TFIIH principalmente se encuentra formando dos subcomplejos: el subcomplejo CAK (cinasa activadora de CDKs) conformado por CDK7, mat1 y ciclina H; y el subcomplejo central (o “core”) compuesto por XPB, XPD, p62, p52, p44, p34 y p8. No obstante, otras variantes de estos complejos se han purificado con otros componentes mostrando interacciones transitorias. Este es el caso de XPD ya que se ha encontrado que forma un subcomplejo transitorio al unirse al CAK (Chen *et al.*, 2003). Recientemente, también se ha descrito en levadura una nueva subunidad denominada Tfb6, la cual interacciona transitoriamente con componentes del “core” y que probablemente juega una función importante en la reparación (Murakami *et al.*, 2012). Por otro lado, la endonucleasa XPG también se ha propuesto como otra subunidad que forma parte de TFIIH ya que se ha encontrado que interacciona físicamente con el complejo y que participa activamente durante la reparación y la transcripción (Ito *et al.*, 2007).

Algunos componentes de TFIIH presentan varias actividades enzimáticas siendo XPB y XPD DNA helicasas con una polaridad 3'-5' y 5'-3', respectivamente (Oksenysh y Coin, 2010); CDK7 es una cinasa y p44 se ha descrito como una ligasa de ubiquitina en levadura (Takagi *et al.*, 2004). Las subunidades restantes juegan

principalmente un papel estructural en la formación de los complejos e incluso proporcionan estabilidad como lo hace p8 (Giglia-Mari *et al.*, 2004). Estudios de microscopía electrónica sobre la estructura de TFIIH en levadura y humano han demostrado que el holocomplejo presenta una estructura tridimensional en forma de anillo donde el centro del anillo parece funcionar como una región a la que se une el DNA. Asimismo, el anillo presenta una protuberancia, la cual corresponde a las subunidades del CAK (Schultz *et al.*, 2000).

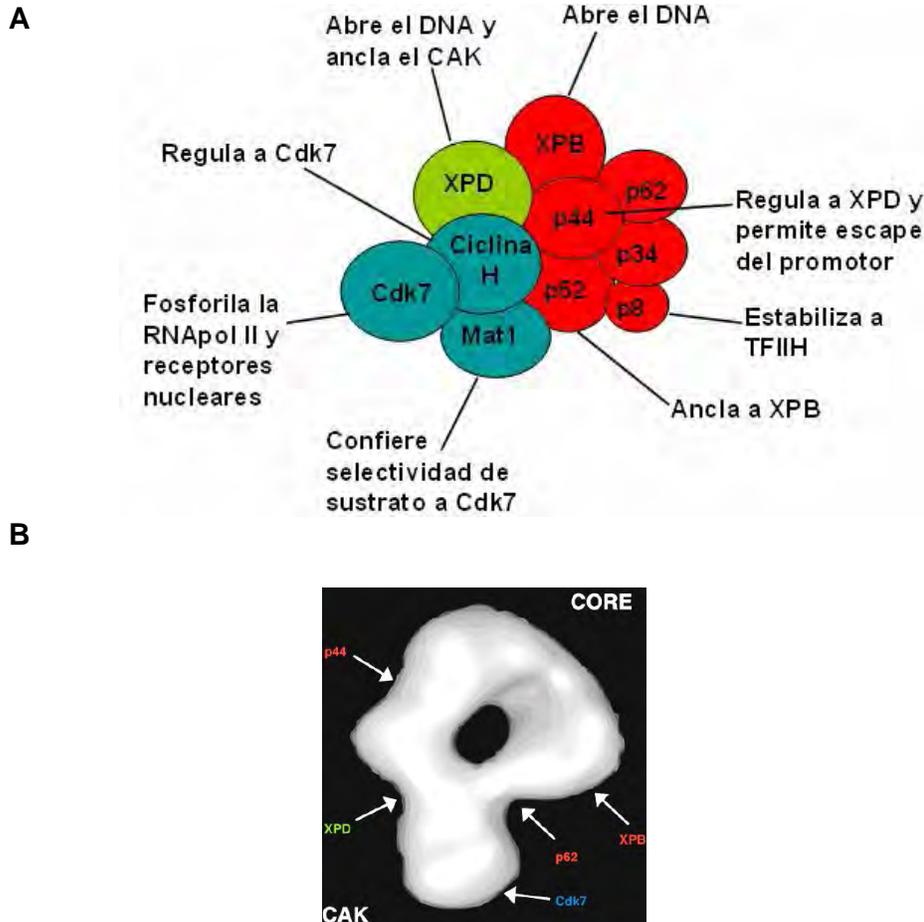


Figura 1. Estructura y funciones de las subunidades de TFIIH humano. A. Esquema donde se resumen las funciones que realizan las subunidades de TFIIH. En rojo, las subunidades que forman el “core”; en azul, las subunidades que componen el CAK. XPD puede encontrarse en ambos subcomplejos B. Estructura tridimensional de TFIIH donde se muestran los subcomplejos “core” y el CAK. Modificado de Schultz *et al.* (2000) y Egly (2001).

TFIIH está involucrado en la regulación de varias funciones celulares que incluyen la apertura del DNA para formar la burbuja de la reparación por escisión de nucleótidos (NER), la transcripción mediada por la RNA polimerasa I y II (RNAPol I y II) y el control del ciclo celular (De Boer y Hoeijmakers, 2000).

Con respecto a la reparación, NER es una vía de reparación altamente conservada que se encarga de remover un amplio rango de lesiones que provocan la distorsión de la estructura del DNA. Estas lesiones incluyen los fotoproductos producidos por la radiación UV, los compuestos químicos alquilantes, varias formas de lesiones oxidativas e incluso los sitios abásicos generados por glicosilasas (Andresoo, 2006; Fuss y Tainter, 2011). Particularmente, la radiación ultravioleta da lugar a la formación de dímeros de ciclobutano de pirimidina (CPDs) y los 6-4 fotoproductos (6-4PP) que provocan deformaciones en la estructura helicoidal del DNA, y estos resultan peligrosos ya que potencialmente pueden generar mutaciones. Los aductos ocasionados por UV son removidos a través de NER donde TFIIH participa activamente (De Boer y Hoeijmakers, 2000).

Existen dos variantes de NER, las cuales dependen de cómo se reconoce el daño en la molécula de DNA. La reparación global del genoma (GGR) se refiere a aquella que ocurre en las regiones que no están siendo transcritas y el reconocimiento de la lesión lo realizan los complejos de proteínas XPC-HR23B en presencia o ausencia de UV-DDB1/DDB2. Por otro lado, la reparación acoplada a la transcripción (TCR) es aquella que ocurre en regiones del genoma que se están transcribiendo y el reconocimiento del daño ocurre cuando la RNA polimerasa se estanca en el sitio donde la lesión ha ocurrido para que posteriormente se unan otras proteínas de reparación como CSA y CSB. Después del reconocimiento del daño en el DNA, las proteínas XPA y RPA se unen al sitio de daño y estabilizan el DNA, sobretodo cuando TFIIH abre la burbuja de reparación. TFIIH se une y se encarga de abrir el DNA alrededor de la lesión de manera asimétrica (a partir de la lesión abre 22 nucleótidos en 5' y 5 nucleótidos en 3') con las actividades de helicasa de sus subunidades XPB y XPD (Oksenyich y Coin, 2010). Posteriormente, las endonucleasas XPF-ERCC1 y XPG se encargan de escindir un fragmento de 28-32 nucleótidos de longitud que contiene el aducto. Después las DNA polimerasas δ , κ o ϵ sintetizan DNA *de novo* utilizando la hebra no dañada como templado. Finalmente, la ligasa I se encarga de sellar los extremos del DNA recién sintetizado restableciendo de esta manera la hebra dañada (figura 2) (Fousteri y Mullenders, 2008).

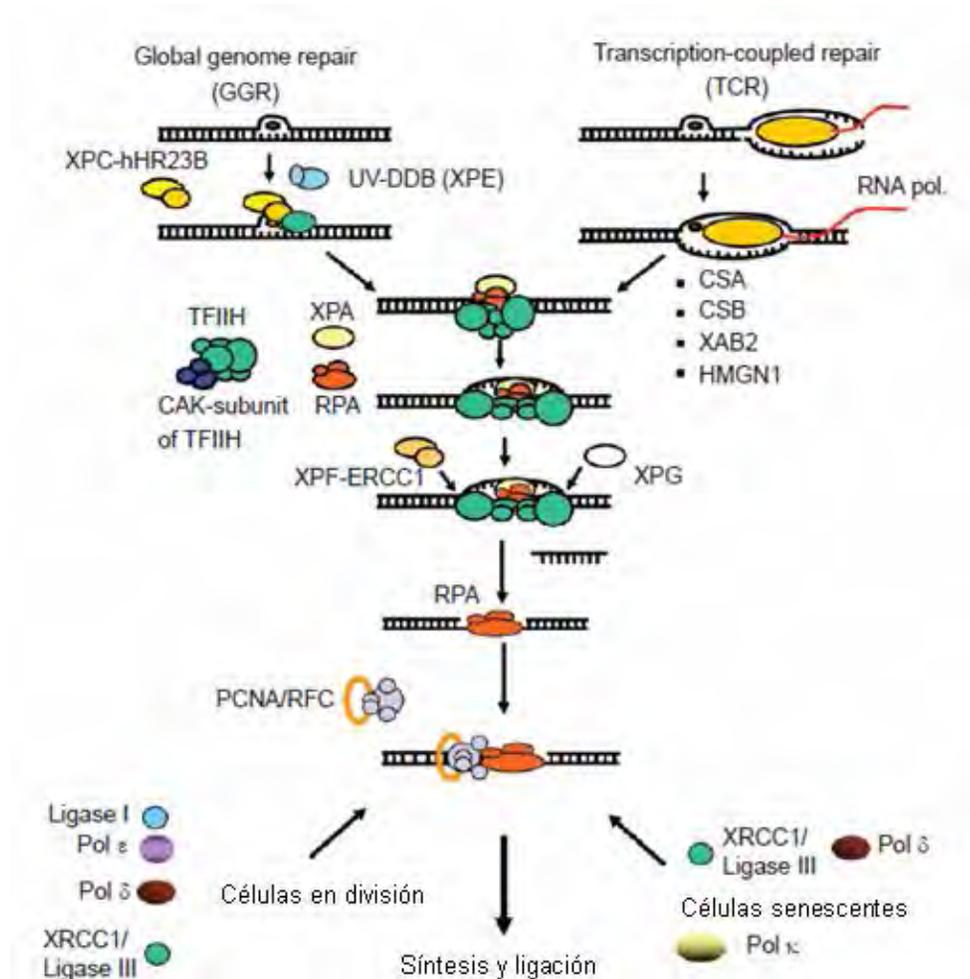


Figura 2. TFIIH participa en NER. Existen dos variantes de NER que difieren en cómo se reconoce la lesión en el DNA. En GGR, el reconocimiento del daño lo realizan las proteínas XPC-hHR23B y el complejo UV-DDB (XPE), las cuales se unen a la lesión que distorsiona la estructura de DNA; mientras que para TCR, la señal de reconocimiento ocurre debido al estancamiento de la RNAPol II en la lesión, lo cual permite el reclutamiento de otras proteínas como CSA y CSB. Los pasos posteriores para las dos variantes son los mismos y consisten en la unión de XPA, RPA y TFIIH. TFIIH se encarga de abrir la cadena de DNA alrededor de la lesión. Posteriormente, las endonucleasas ERCC1-XPF y XPG escinden el oligonucleótido que contiene la lesión para que se sintetice DNA *de novo* por las DNA polimerasas ε, δ y κ junto con factores de procesamiento como RFC y PCNA. Finalmente, los extremos son ligados reestableciendo el DNA que había sido dañado. Si las células se encuentran dividiéndose activamente o en senescencia, algunos factores específicos intervienen en los pasos de síntesis y ligación. Modificado de Fousteri y Mullenders (2008).

Además de la reparación, TFIIH está involucrado en la iniciación, el escape del promotor y los pasos tempranos de elongación en la transcripción así como en la reiniciación de la transcripción después de las pausas de la RNAPol II. En la iniciación de la transcripción, la actividad ATPasa de XPB se requiere para abrir el DNA alrededor del sitio de inicio y permitir la formación del complejo de preiniciación. Posteriormente, CDK7 fosforila la serina 5 y 7 del heptapéptido repetido “YSPTSPS” del dominio carboxilo terminal de la subunidad Rbp1 de la RNAPol II, lo cual permite

el escape del promotor y la elongación (Gerber *et al.*, 1995). TFIIH también puede regular la transcripción a través de la transactivación de diferentes receptores nucleares ya que se ha encontrado que CDK7 fosforila una variedad de receptores que incluyen los receptores α y γ del ácido retinoico (Bastien *et al.*, 2000; Keriel *et al.*, 2002), el receptor de estrógenos (Chen *et al.*, 2000), el receptor de andrógenos (Chymkowitch *et al.*, 2011) y PPAR- γ (Helenius *et al.*, 2009); además, CDK7 también se encarga activar el receptor de la vitamina D de manera indirecta a través de la fosforilación de su coactivador Ets1 (Drané *et al.*, 2004).

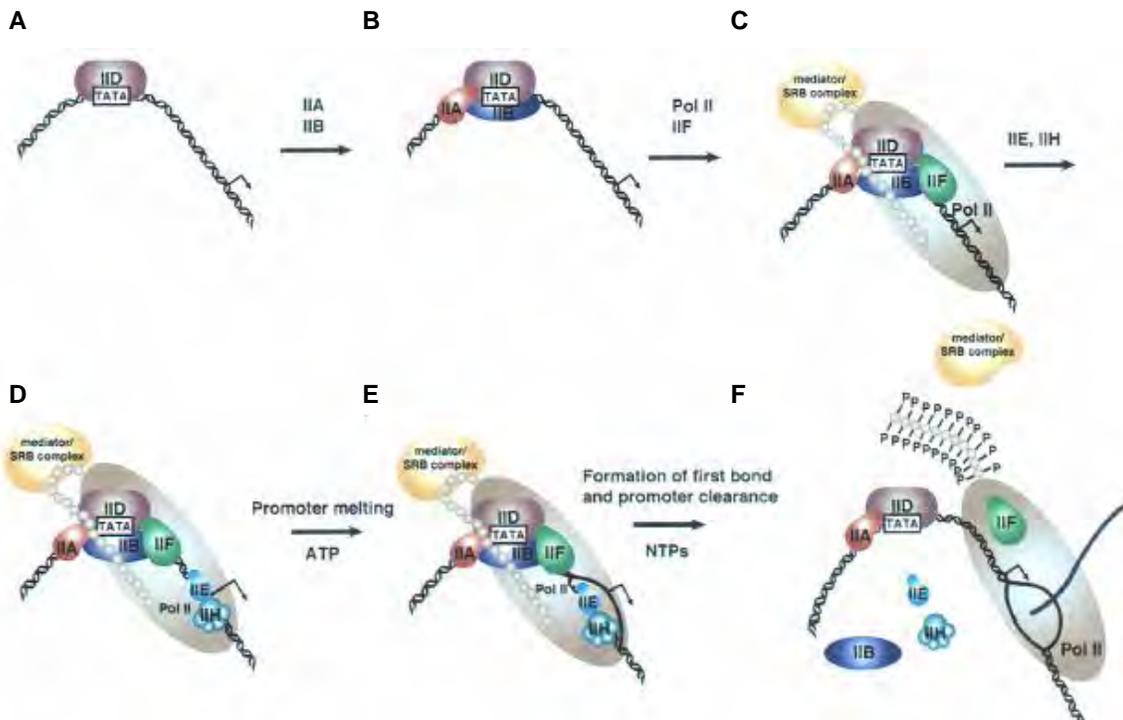


Figura 3. TFIIH participa en la transcripción mediada por la RNApol II. **A.** Durante el inicio de la transcripción, TFIIID se une al DNA en la región promotora que contiene la caja TATA. **B.** Posteriormente, TFIIA y TFIIB se unen. **C.** Se recluta el complejo mediador y TFIIF; TFIIF recluta a la RNA pol II al promotor. **D.** El complejo de preiniciación se completa cuando TFIIE y TFIIH se unen. **E.** TFIIH se encarga de abrir la cadena del DNA y fosforila el CTD de la RNApol II. **F.** Finalmente, la RNApol II inicia la transcripción en presencia de los nucleótidos trifosfatados (NTPs) permitiendo el escape del promotor y el inicio de la elongación. Modificado de Orphanides *et al.* (1996).

TFIIH también juega un papel fundamental en la transcripción del RNA ribosomal mediada por la RNApol I. TFIIH colocaliza en regiones del nucleólo donde la transcripción de rDNA se encuentra activa; aunque no está involucrado en la formación del complejo de iniciación o el escape del promotor, TFIIH estimula la transcripción dependiente de la RNApol I siendo un factor importante durante la

elongación (Iben *et al.*, 2002; Assfalg *et al.*, 2011). Por otro lado, el subcomplejo CAK se requiere para la progresión del ciclo celular. CDK7 fosforila a CDK2, lo cual regula la transición de G1/S; mientras que la fosforilación del T-loop de CDK1 es crucial para el ensamblaje del complejo CDK1/ciclina B1 y con ello la progresión de la fase G2 a M (Larochelle *et al.*, 2007).

1.2 Otras funciones de las subunidades independientemente de TFIIH

Además de las funciones anteriormente mencionadas, se ha descrito que algunas subunidades de TFIIH pueden formar parte de otros complejos pudiendo participar en otros procesos de manera independiente a TFIIH. En el caso de XPD, se ha descrito que esta proteína coimmunoprecipita y forma parte del complejo MMXD formado por MMS19, Ciao1 y MIP18, el cual participa en la segregación de los cromosomas (Ito *et al.*, 2010). XPD también regula la localización de CDK7 modulando la dinámica del huso mitótico (Li *et al.*, 2010). Por otro lado, la helicasa XPB colocaliza en el centrosoma durante la mitosis e incluso coimmunoprecipita con γ -tubulina sugiriendo un papel en la regulación de la mitosis (Weber *et al.*, 2010). Recientemente, se demostró que Mat1/Tfb3 interacciona físicamente con Ubc4 y la enzima conjugante Ubc12 a través de su dominio RING regulando la nedilación-ubiquitinación de Rtt101 y la nedilación de Cul3, las cuales se requieren para la supervivencia cuando agentes genotóxicos inducen daño durante la replicación del DNA (Rabut *et al.*, 2011). Todos estos reportes sugieren que algunas subunidades de TFIIH pueden regular otros procesos de manera independiente a las funciones del complejo.

1.3 Efecto de las mutaciones en TFIIH

Las mutaciones en los genes que codifican para las subunidades de TFIIH se han relacionado con el desarrollo de 3 síndromes fotosensibles recesivos en los humanos: xeroderma pigmentosum (XP), síndrome de Cockayne (CS) y tricotiodistrofia (TTD), los cuales se asocian a mutaciones encontradas en XPB, XPD y p8. A continuación se describen brevemente los fenotipos asociados a cada enfermedad:

- **Xeroderma pigmentosum:** estos pacientes presentan una alta incidencia de desarrollar cáncer en la piel aproximadamente >1000 veces que la población normal así como >10 veces el desarrollo de tumores internos principalmente en

el pulmón y la vejiga; asimismo, presentan una pigmentación anormal de la piel y en casos severos también exhiben anomalías neurológicas (Kraemer *et al.*, 1987). Este síndrome puede ser ocasionado por mutaciones en 8 grupos de complementación: XPA-G y XPV (Fuss y Tainer, 2011).

- **Síndrome de Cockayne:** sus principales fenotipos consisten en la calcificación del sistema nervioso central, la neurodesmielinación, enanismo caquéctico, anomalías esqueléticas, la degeneración mental progresiva, progeria, ataxia, degeneración retinal y bajo peso al nacer. La mayoría de los pacientes presentan mutaciones en CSA o CSB aunque hay reportes de mutaciones en XPB, XPD y XPG (Fuss y Tainer, 2011).
- **Tricotiodistrofia:** presentan descamación de la piel o ictiosis, cabello y uñas quebradizas, anomalías esqueléticas, retraso mental, estatura corta, anemia, características de envejecimiento prematuro como caquexia, osteoporosis y kifosis. Los genes afectados corresponden a las subunidades de TFIIH: XPB, XPD y p8 (Fuss y Tainer, 2011).

Adicionalmente, mutaciones en XPD, XPG y CSB se han asociado a la generación de COFS (síndrome cerebro-oculo-facio-esquelético), el cual comparte características similares con CS (Hamel *et al.*, 1996; Meira *et al.*, 2000; Graham *et al.*, 2001). Generalmente, los fenotipos que presentan los pacientes XP se han asociado principalmente a problemas relacionados con la reparación al DNA, resultando en fotosensibilidad y cáncer. En pacientes CS, se asocia con defectos en TCR y en TTD a una tasa de transcripción reducida. Enigmáticamente, aunque en los pacientes XP existe un incremento en la incidencia de cáncer, en los pacientes CS y TTD no hay un incremento en la predisposición de cáncer a pesar de que presentan fotosensibilidad (De Boer y Hoeijmakers, 2000; Zurita y Merino, 2003). Asimismo, dependiendo del tipo de mutaciones en XPB o XPD, algunos pacientes muestran fenotipos combinados pudiendo encontrar pacientes XP/CS y XP/TTD (Broughton *et al.*, 1995 y 2001), lo cual sugiere que las mutaciones asociadas a cada síndrome podrían afectar una o más funciones de TFIIH dando lugar a la heterogeneidad de fenotipos. Sin embargo, la incidencia de pacientes con ambas enfermedades es extremadamente rara.



Figura 4. Síndromes asociados a mutaciones en componentes de TFIIH. A. Xeroderma pigmentosum (XP). **B.** Síndrome de Cockayne (CS). **C.** Tricotiodistrofia (TTD). Tomado de Lehman (2001).

En los humanos no se han registrado enfermedades relacionadas con otras subunidades de TFIIH, por lo que los defectos relacionados a otras subunidades no se conocen. Por tal razón, elucidar el papel que desempeña cada subunidad en el complejo ha resultado difícil. No obstante, el uso de organismos modelo como la mosca de la fruta *D. melanogaster* ha permitido estudiar las funciones de algunas subunidades de TFIIH satisfactoriamente. En el caso de Dmp52 (el homólogo de p52 en mosca), la caracterización de varios alelos mutantes mostraron que las mutaciones en este gen producen fenotipos durante el desarrollo que incluyen la presencia de quetas y cutícula quebradizas, una reducción en el tamaño del organismo en todos los estadios, defectos en ovogénesis y espermatogénesis, la melanización del intestino y la aparición de tumores melanóticos, así como inestabilidad cromosomal y sensibilidad a UV (Fregoso *et al.*, 2007, ver figura 5). Todos estos fenotipos son similares a los fenotipos presentados por los pacientes XP, CS y TTD demostrando que la pérdida de función de TFIIH en la mosca genera defectos similares a los encontrados en los humanos, por lo que es un buen modelo para el estudio de la función de las subunidades de TFIIH.

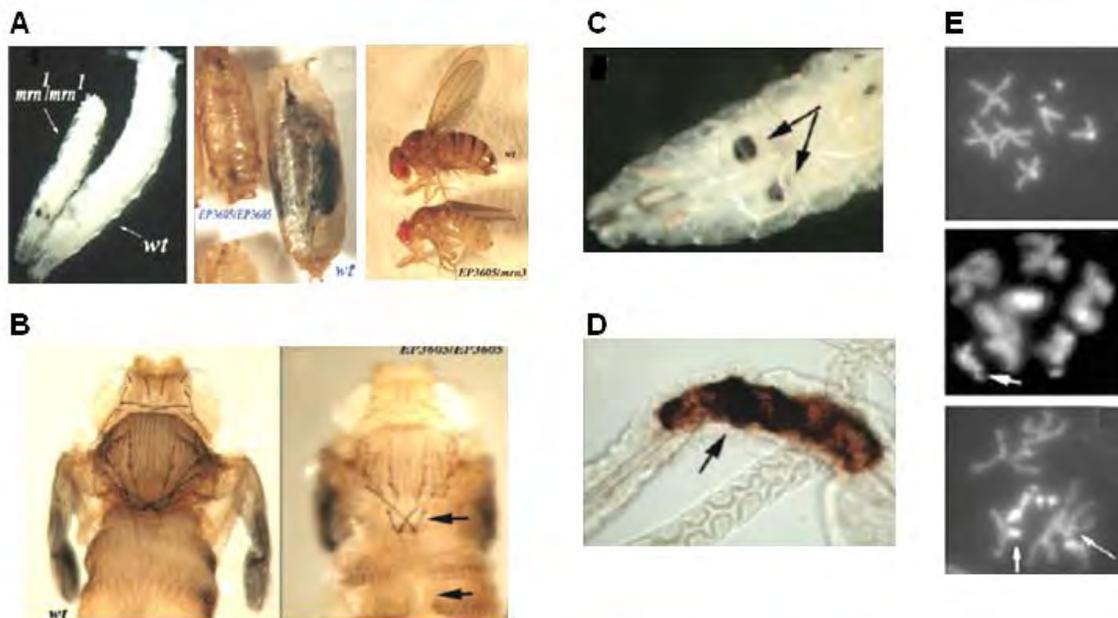


Figura 5. Las mutaciones en Dmp52 generan diversos defectos durante el desarrollo. A. Fenotipo *minute* en larvas mm^1/mm^1 (panel izquierdo), pupas EP3605/EP3605 (panel central) y adultos EP3605/ mrn^3 (panel derecho). **B.** Los mutantes EP3605/EP3605 (panel derecho) presentan defectos en la cutícula y quetas quebradizas comparadas con moscas silvestres (panel izquierdo), los cuales son señalados por flechas. **C.** Presencia de tumores melanóticos en larvas mrn^1/mrn^1 . **D.** Presencia de melanización en el anillo del intestino medio de larvas EP3605/ mrn^3 . **E.** Aberraciones cromosomales en neuroblastos metafásicos con mutaciones en Dmp52. Los organismos heterocigotos EP3605/+ (panel superior) presentan fenotipo silvestre. Sin embargo, los neuroblastos de larvas heterocigotas EP3605/ mrn^1 (panel central) y EP3605/ mrn^3 (panel inferior) presentan cromosomas no condensados y fragmentados. Tomado y modificado de Fregoso *et al.* (2007).

1.4 Respuestas de daño al DNA: p53 y JNK

El DNA es la molécula encargada de transmitir la información genética de una generación a la siguiente y de permitir el adecuado desarrollo, el funcionamiento y la reproducción en los organismos. Muchos agentes endógenos y exógenos pueden provocar alteraciones en la estructura e integridad de DNA, las cuales son peligrosas ya que potencialmente pueden dar lugar a inestabilidad y la mutagénesis. A nivel celular, la exposición a estos agentes provoca diversas respuestas como la activación de los sensores de daño al DNA, los transductores de señales y los efectores (Bartek y Lukas, 2001). Los sistemas transductores de señales se encargan de activar los puntos de control del ciclo celular y factores de transcripción, que inducen la expresión de genes involucrados en la reparación al DNA, la detención del ciclo celular y la apoptosis (Yang *et al.*, 2004). Los puntos de control del ciclo celular se activan con el fin de proporcionar más tiempo a las enzimas para concluir la reparación antes de entrar a fases críticas del ciclo celular como la fase S y la mitosis, o de inducir la apoptosis cuando las células afectadas presentan daños

irreparables en el DNA (Ljungman, 2005). A continuación se describen dos componentes que son activados en respuesta al estrés genotóxico y que se trabajaron en esta tesis: p53 y JNK.

1.4.1 p53

p53 es un mediador crítico en la respuesta inducida por estrés genotóxico. Este supresor tumoral se encuentra generalmente inactivo en varios tipos de cáncer por lo que p53 es esencial para evitar la carcinogénesis (Levine, 1997). Aunque se ha demostrado que p53 es una proteína no indispensable para el desarrollo, en ratones “knockout” se ha visto que su falta se asocia a defectos en la gametogénesis, la sensibilidad a diversos agentes genotóxicos así como la aparición de tumores en edades tempranas (Donehower *et al.*, 1992). Esta proteína presenta 4 dominios estructurales y funcionales: una región aminoterminal que consiste en un dominio de transactivación y una región rica en prolina; un dominio central de unión al DNA; un dominio de tetramerización; y un dominio carboxilo terminal regulatorio (Joerger y Fersht, 2008). En condiciones basales, p53 es una proteína de vida corta, la cual se ubiquitina por Mdm2 (mouse double minute 2) para inducir su degradación por el proteasoma. Sin embargo, en condiciones de estrés genotóxico, de hipoxia u otros agentes, p53 se fosforila, lo cual estabiliza a la proteína permitiendo aumentar su concentración a nivel celular. p53 se convierte en un factor transcripcional secuencia específico que puede activar la transcripción de sus genes blanco (Slee *et al.*, 2004). La cascada de activación en respuesta al estrés genotóxico inducido por la radiación ionizante (IR) inicia con la activación de ATM (Ataxia-telangectasia mutated), la cual fosforila a Chk2 y posteriormente ambas pueden fosforilar a p53. En el caso de exposición a UV o bloqueo en la replicación, ATR (ATM-related) se activa y fosforila a Chk1, y esta última fosforila a p53 (Bai y Zhu, 2006). p53 activada puede inducir la apoptosis, la detención del ciclo celular, la reparación y la senescencia entre otros procesos, dependiendo del tipo de estímulo que indujo su acumulación así como del grado del daño ocasionado a la célula (Slee *et al.*, 2004). Adicionalmente, p53 también puede unirse de manera no específica a varias secuencias de DNA como “mismatches” y aductos, lo cual sugiere funciones independientes de su dominio de transactivación (Lee *et al.*, 1995; Liu y Kulesz-Martin, 2001). En eucariotes existen 5 tipos de reparación: la reparación por escisión de nucleótidos (NER), la reparación por escisión de bases (BER), la reparación de mismatches (MMR), la recombinación homóloga (HR) y la unión de extremos no

homólogos (NHEJ). p53 presenta funciones dependientes e independientes de su dominio de transactivación para todos los tipos de reparación, excepto para HR donde sólo presenta funciones independientes (Sengupta y Harris, 2005).

En *Drosophila*, existe sólo un gen que consiste de dos promotores alternativos que pueden codificar para 3 posibles isoformas: la isoforma Dp53 correspondiente a TP53 (homólogo humano) con el dominio de transactivación completo; la isoforma DΔNp53 con el dominio de transactivación aminoterminal truncado codificada a partir de un promotor interno; y Dp53ΔC, que consta sólo del dominio de transactivación (Marcel *et al.*, 2011). Sin embargo, solo Dp53 y DΔNp53 se han reportado experimentalmente (Villicaña *et al.*, 2013). Aunque la homología de la secuencia entre Dp53 y la proteína humana TP53 es baja, Dp53 conserva la estructura secundaria así como los diferentes dominios de la proteína. El análisis de los dominios reveló que la región con mayor similitud entre ambas proteínas es el dominio de unión al DNA donde Dp53 presenta un 24% de identidad y un 44% de similitud (Jin *et al.*, 2000). El gen Dp53 se activa en respuesta a IR y se ha involucrado en la inducción de la apoptosis, la autofagia, el envejecimiento, la diferenciación y el crecimiento. DΔNp53 fue la primer isoforma identificada en la mosca y la mayoría de las funciones mencionadas se han caracterizado para esta isoforma. A diferencia de TP53, DΔNp53 puede inducir la apoptosis en respuesta a IR ya que directamente induce a *reaper*, pero la detención del ciclo celular no ocurre (Brodsky *et al.*, 2000; Sogame *et al.*, 2003). No obstante, en respuesta al estrés energético ocasionado por las mutaciones en componentes mitocondriales, la detención del ciclo celular se lleva a cabo al igual que en humanos (Mandal *et al.*, 2005). También se ha demostrado que DΔNp53 es muy importante en el mantenimiento de la estabilidad cromosomal por lo que conserva las funciones de supresor tumoral (Sogame *et al.*, 2003).

1.4.2 JNK

Las c-Jun N-terminal cinasas (JNK) son miembros de un grupo de serina/treonina cinasas conocida como la familia de proteína cinasa activada por mitógenos (MAPKs) (Bogoyevitch y Kobe, 2006). JNKs participan en una cascada de activación mediada por fosforilación en respuesta a múltiples factores Internos y externos como estímulos mitogénicos, las citocinas proinflamatorias, el estrés osmótico, el choque de calor, IR, UV y el daño oxidativo (Theodosiou y Ashwort, 2002). La activación de JNK ocurre a través de la fosforilación dual de una treonina y

tirosina específica en el motivo Thr-X-Tyr dentro de su loop de activación/fosforilación. Después de la activación de JNK, esta proteína fosforila factores transcripcionales específicos que activan la transcripción de ciertos genes en respuesta al estímulo por el cual se activó (Davis, 2000). La activación de JNK se encuentra involucrada en la regulación de varios procesos celulares que incluyen la muerte celular, la proliferación, la replicación viral, la respuesta inmune a patógenos entre otros. En los humanos, las JNKs son codificadas por 3 diferentes genes, lo cuales a su vez presentan hasta 10 diferentes productos de splicing. Las funciones en las que se encuentra participando cada isoforma depende del tejido donde se está expresando así como los estímulos y las cinasas río arriba que activaron cada isoforma (Bogoyevitch y Kobe, 2006). En *D. melanogaster*, existe sólo un gen homólogo de JNK que codifica la proteína denominada Basket (Bsk). La activación de la cascada de JNK en la mosca provoca la fosforilación de factores transcripcionales como Jun (Jra, Jun-related antigen) y Fos (Kay, Kayak) así como otros sustratos citosólicos (Igaki *et al.*, 2009). JNK se activa por las cinasas MKK4 y MKK7 y se regula negativamente por la fosfatasa Puckered (Martin-Blanco *et al.*, 1998; Davis, 2000). Basket se activa en los procesos de regeneración (Repiso *et al.*, 2011), la apoptosis por exposición a UV (Luo *et al.*, 2007) e IR (McNamee y Brodsky, 2009), la autofagia (Ohsawa *et al.*, 2011), la respuesta inmune (Huang *et al.*, 2009) y varios procesos morfogénicos como el cerrado dorsal (Jacinto *et al.*, 2002).

II. ANTECEDENTES

El supresor tumoral p53 es un componente crítico de los mecanismos celulares que responden a una amplia variedad de agentes ambientales con el fin de mantener la integridad del genoma (Meek, 2004).

La proteína p53 es un componente importante en NER y se encuentra participando en la reparación en varios niveles. Se sabe que p53 es indispensable durante GGR después de irradiar con luz UV, aunque no genera un efecto en TCR (Ford y Hanawalt, 1995; 1997). También juega un papel importante en la relajación de la cromatina después de daño genotóxico ya que permite el acceso de la maquinaria de reparación a los sitios de daño. En células humanas y en cromosomas politénicos de *D. melanogaster* se ha observado que la relajación de la cromatina mediada por hiperacetilación de histonas es un proceso dependiente de p53 (Rubbi y Milner, 2003; Rebollar *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2008). A nivel transcripcional, p53 se encuentra regulando la expresión de los genes de *xpc* y *ddb2*, que codifican proteínas involucradas en NER que se encargan de reconocer las lesiones ocasionadas por UV en el DNA (Hwang *et al.*, 1999; Adimoolan y Ford, 2002; Tan y Chu 2002).

Otros datos genéticos sugieren la participación de TFIIH en la vía apoptótica mediada por p53. En líneas celulares humanas de pacientes XP deficientes para XPD o XPB se ha observado que la inducción de la apoptosis al sobreexpresar DΔNp53 o después de la exposición a doxorubicina (droga que induce la apoptosis dependiente de p53) genera una respuesta apoptótica menor en comparación con las líneas silvestres. No obstante, en estas líneas celulares la apoptosis independiente de p53 inducida por ácido okadaico o mediada por Fas no se afectó (Wang *et al.*, 1996; Robles *et al.*, 1999). Por otro lado, estos datos se han visto corroborados en la mosca de la fruta ya que la apoptosis inducida por la sobreexpresión de p53 en el ala es menor cuando el fondo genético contiene alelos mutantes de XPB (*hay* o *haywire* en la mosca) sugiriendo que TFIIH participa en la vía apoptótica mediada por p53 (Merino *et al.*, 2002, figura 6).

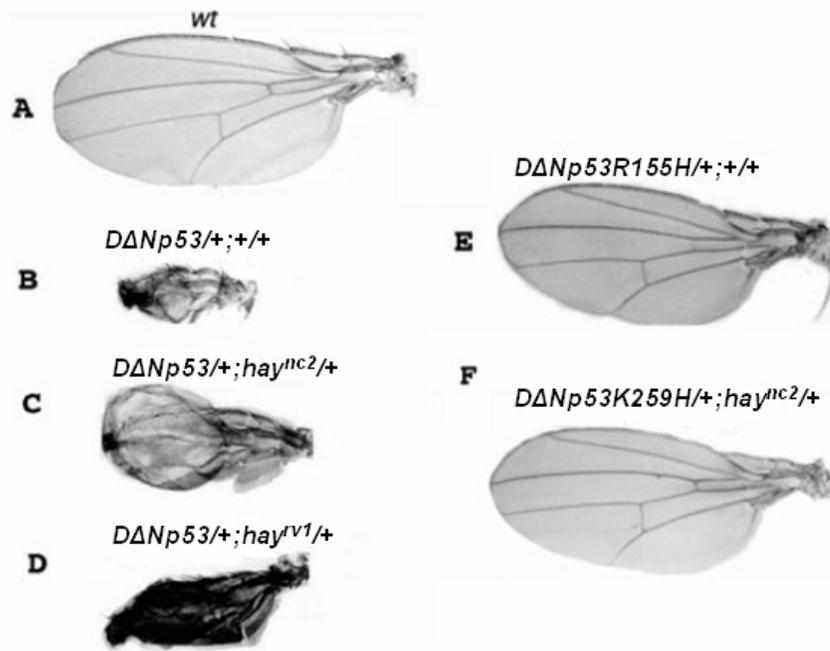


Figura 6. La apoptosis inducida por la sobreexpresión de DΔNp53 es parcialmente suprimida en fondos genéticos deficientes para XPB (*hay*). La sobreexpresión de las dominantes negativas de DΔNp53 en el ala no generan ningún fenotipo (E y F). La sobreexpresión de DΔNp53 en fondos heterocigotos para las mutantes *hay^{nc2}* y *hay^{rv1}* (C y D) suprimen parcialmente los defectos morfológicos de las alas asociados a la apoptosis en comparación con el control solo expresando DΔNp53 (B). Modificado de Merino *et al.* (2002).

De manera más directa, p53 se ha ligado funcionalmente a TFIIH a través de las interacciones proteína-proteína que establece con algunas de sus subunidades. La subunidad p62 interacciona físicamente con el dominio de activación de p53 y se cree que es importante para promover la activación de la transcripción de genes regulados por p53 (Xiao *et al.*, 1994; DiLello *et al.*, 2008); p53 interacciona físicamente con XPD y XPB modulando la actividad de reparación al inhibir su actividad intrínseca de DNA helicasas (Léveillard *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1995). Por otro lado, p53 se fosforila por el CAK manteniendo la interacción física a través de mat1, lo cual aumenta la actividad de unión al DNA de manera secuencia específica (Lu *et al.*, 1997). Recíprocamente, p53 modula la actividad del CAK a través de su interacción con ciclina H donde regula negativamente la actividad cinasa de CDK7 *in vitro* e *in vivo* (Schneider *et al.*, 1998). Adicionalmente, existen datos que sugieren una nueva interacción de p53 con otro componente de TFIIH. El trabajo de Levéillard *et al.* (1996) reportó a través de ensayos tipo far-western de extractos crudos y fracciones purificadas de TFIIH, utilizando como sonda a p53 marcada con ³²-P, que una proteína de 52 kDa interaccionó físicamente con p53 (figura 7); sin embargo, la

identidad de esta proteína no se confirmó ya que p52 aún no se había descrito, lo cual puede sugerir una nueva interacción de p53 con otro componente de TFIIH.

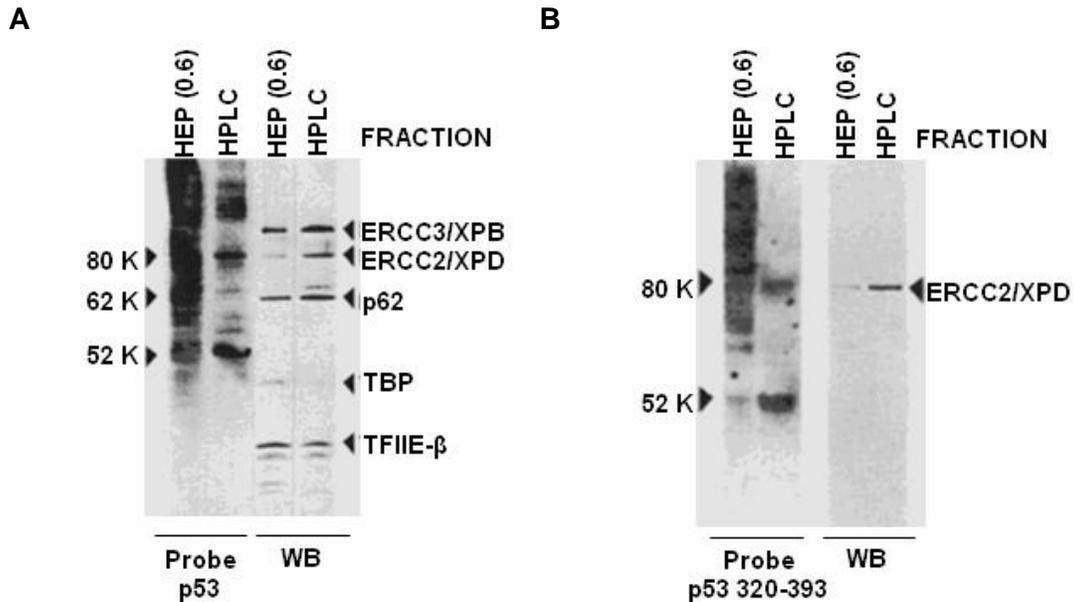


Figura 7. Posible interacción física entre p52 y p53 en células humanas. **A.** Far western blot de extractos de células HeLa utilizando como sonda a p53 marcada con 32 -P. **B.** Far western blot utilizando como sonda el fragmento C-terminal 320-393 de p53 marcado con 32 -P. Obsérvese el enriquecimiento de una proteína de 52 KDa en las fracciones utilizando como sonda a p53 completa o el fragmento C-terminal 320-393. La presencia de las proteínas en las fracciones se verificó a través de western blot con anticuerpos específicos contra ERCC3/XPB, ERCC2/XPD, p62, TBP y TFIIE- β . Figura modificada de Levéillard *et al.* (1996).

Adicionalmente, se sabe que el fenotipo *minute* principalmente se ha asociado con mutaciones que afectan la síntesis de ribosomas y/o la maquinaria traduccional (Saeboe-Larssen *et al.*, 1998). Considerando que TFIIH es un factor de elongación en la transcripción mediada por la RNAPol I y que las mutaciones en Dmp52 generan fenotipos *minute* (Iben *et al.*, 2002; Fregoso *et al.*, 2007; Assfalg *et al.*, 2011), es posible que este proceso se encuentre afectado. De acuerdo con esto, Christie *et al.* (2009, datos no publicados) reportan que las mutaciones en p52 en pez cebra provocan defectos morfológicos y displasia en el intestino así como acumulación de precursores de RNA ribosomal (RNAr) y una disminución en los RNAr 18S y 28S en embriones, lo cual sugiere un defecto en el procesamiento; interesantemente, se encontró que p53, p21 y ciclina G1 se acumulan posiblemente como una respuesta al estrés ocasionado por el procesamiento defectivo del RNAr y la biogénesis de los ribosomas. Varios trabajos han reportado que p53 se activa en respuesta al estrés ribosomal sugiriendo un posible papel de p53 en respuesta a las mutaciones en TFIIH (Chakraborty *et al.*, 2011).

III. JUSTIFICACIÓN

Poco se conoce acerca de las funciones de otras subunidades que conforman a TFIIH excluyendo a XPB, XPD, p8 y el CAK. En los humanos no se han reportado otras enfermedades asociadas a mutaciones en otros componentes de TFIIH probablemente debido a que estas mutaciones producen efectos severos durante el desarrollo y son letales (Fregoso *et al.*, 2007). Por otro lado, existe evidencia que asocia funcionalmente a TFIIH con el supresor tumoral p53; sin embargo, la evaluación de estas interacciones en los modelos animales ha sido poco explorada.

Debido a esta falta de conocimiento, el análisis genético y molecular utilizando modelos animales es relevante para conocer la función de otras subunidades de TFIIH así como sus interacciones con otras proteínas como p53 durante el desarrollo en los organismos multicelulares. En la mosca, se ha demostrado que Dmp52 es importante para el desarrollo; en base a la importancia de p53 y su posible interacción con Dmp52, es crucial caracterizar los fenotipos de las dobles mutantes en Dmp52 y Dp53, lo cual proporcionará información acerca de las funciones y la interacción del complejo con otras proteínas, lo cual podría sentar las bases para realizar estudios más finos sobre los procesos involucrados que se encuentren afectados en estas mutantes.

La información generada será relevante para conocer las vías de señalización que se afectan por las mutaciones en Dmp52 y/o Dp53 que contribuyan con la formación de tumores y los defectos durante el desarrollo así como en la aplicación para el diseño de terapias contra el cáncer.

IV. HIPÓTESIS

La subunidad Dmp52 de TFIIH interacciona física y genéticamente con Dp53 en *Drosophila melanogaster*.

V. OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar las interacciones genéticas y moleculares de la subunidad Dmp52 de TFIIH con el supresor tumoral Dp53 y evaluar su efecto durante el desarrollo del ala en *D. melanogaster*.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar si la subunidad Dmp52 de TFIIH interacciona físicamente con Dp53.
2. Caracterizar los fenotipos generados en moscas expresando un dsRNA contra Dmp52 y evaluar si interaccionan genéticamente con Dp53.
3. Determinar el efecto en la proliferación y en la apoptosis en discos de ala.
4. Determinar el efecto de la interacción en el mantenimiento de la integridad del genoma.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 STOCKS DE MOSCAS UTILIZADOS

Se usaron los stocks *en-gal4* (BL30564), *MS1096^{bx}* (BL8860), *Sgs3-Gal4* (6870), *eyeless-Gal4* (BL8228), *UAS-p35* (BL5073), *UAS-p53* (BL9170), *p53TRiP* (BL29351), *TubP-Gal80^{ts}/TM2* (BL7017), *GUS-Ctp53DN* (BL6583), *Dicer* (BL6009) y *mwh¹* (BL549), los cuales fueron obtenidos de Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC). Las moscas que expresan el dsRNA contra *Dmp52* (*Dmp52i*, v39069), *Dmp34* (*Dmp34i*, v101309) y *Basket* (*Bski*, v34138) fueron proporcionados por Vienna Drosophila RNAi Center (VDRC).

6.2 BIOLOGÍA MOLECULAR

6.2.1 Clonaciones

La clonación de *Dp53* y sus fragmentos se realizaron por amplificación de las clonas de cDNA GH11591 (DΔNp53) y AT28346 (*Dp53*) (DGC Gold Collection); en el caso de *Dmp52*, como templado se usó cDNA o DNA genómico. Las extracciones de DNA plasmídico se usó el kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen).

6.2.2 Extracción de DNA genómico de mosca

Se trituraron suavemente de 50-100 moscas en 2 ml de Douncing Buffer (0.15 M NaCl, 0.01 M Tris-HCl pH 8.0, 5 mM EDTA, 0.2% Igepal NP-40) con un pistilo. El homogenizado se filtró a través de una fibra de poliéster con ayuda de una jeringa. El filtrado se recolectó en un eppendorf y se centrifugó a velocidad máxima durante 1 min. El sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en 100 µl de Douncing Buffer. Se agregaron 300 µl de buffer de lisis (0.3 M NaCl, 0.05 M Tris-HCl pH 8.0, 5 mM, 1% NaSarcosyl) y se mezcló suavemente. Se agregaron 400 µl de fenol, se mezcló y se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min. Posteriormente se agregaron 400 µl de fenol y 400 µl de cloroformo, se mezcló y se centrifugó. Este paso se repitió 3 veces. Posteriormente se agregaron 400 µl de cloroformo, se mezcló y se centrifugó. Se precipitó el DNA de la fase acuosa agregando 2 vol (volúmenes) de etanol, 1/10 vol de acetato de sodio 3M pH 5.2 y glicógeno (opcional). Finalmente, se centrifugó durante 10 min a 13000 rpm y el pellet se lavó dos veces con etanol al 70%. El DNA se secó y se resuspendió en 150 µl de agua para almacenarse a -20°C.

6.2.3 Extracción de RNA total y síntesis de cDNA

Se homogenizaron 50 mg de moscas en 500 µl de Trizol (Invitrogen) y se centrifugaron a 12000 rpm por 10 min a 4°C. El sobrenadante se colectó en un tubo eppendorf y se dejó 5 min a temperatura ambiente. Se agregaron 100 µl de cloroformo, se agitó 15 s y se incubó a temperatura ambiente 2-3 min. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 12000 rpm por 15 min a 4°C, la fase acuosa se colectó y se precipitó con 250 µl de alcohol isopropílico durante 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12000 rpm por 10 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó con 500 µl de etanol al 75%. El pellet se secó y se resuspendió en 40 µl de agua DEPC. Finalmente se incubó 10 min a 60°C para disolverlo y se almacenó a -70°C.

Para el tratamiento con DNAsa, se tomaron 100 µg de RNA total (50-100 µl de RNA total) para una reacción con un volumen final de 50 µl: se agregaron 5 µl de Buffer DNase 10X (400 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM MgSO₄, 10 mM CaCl₂), 0.2 µl de 0.1 M DTT, 1 µl de inhibidor de RNasa (RNaseOUT, Invitrogen), 1 µl de DNase (Roche) y se llenó con H₂O DEPC a 50 µl. La reacción se incubó 30 min a 37°C. Para detener la reacción, se agregó 1 µl EGTA 20 mM pH 8.0 y se calentó a 65°C por 10 min.

Para sintetizar el cDNA, se tomaron 10 µl de RNA total tratado con DNAsa, se añadió 1 µl de dNTP's 10 mM (en H₂O DEPC) y 1 µl de oligo-dT (Invitrogen) y se calentó a 65°C por 5 min. Se pasó a hielo y se centrifugó a velocidad máxima unos segundos para precipitar. Posteriormente, se añadieron 4 µl de buffer 5X first strand, 2 µl de DTT 0.1 M y 1 µl de inhibidor de RNasa, se mezcló y se incubó por 2 min a 37°C. Se añadió 1 µl de enzima RT M-MLV (Invitrogen) y se incubó 1 h a 37°C. Para inactivar, se incubó 15 min a 65°C, se alicuotó y se congeló a -70°C.

6.2.4 Reacciones de PCR

Las condiciones de RT-PCR para todos los oligonucleótidos utilizados fueron las siguientes: una temperatura inicial de 94°C por 5 min, 27 ciclos de 50 s a 92°C, 45 s a 55°C, 50 s a 72°C y un ciclo final de 7 min a 72°C. En el caso de que la longitud del producto fuera mayor de 1 kb, se ajustó el tiempo de elongación de 72°C a 1 min. Se utilizó un volumen de reacción de 50 µl (5 µl de 10X Taq PCR Buffer, 3 µl de MgSO₄ 25 mM, 2.5 µl de deoxinucleósidos trifosfato 5 mM, 0.5 µl de cada oligonucleótido (stock 20 picomoles/µl), 1 µl Taq polimerasa (Roche)) utilizando 2 µl de DNA. Los productos amplificados se visualizaron en un gel de agarosa al 1%

corrido en buffer TAE a 100V. Para la clonación de productos mayores de 900 pb, las reacciones de PCR se realizaron utilizando DNA polimerasa High Fidelity (Roche) de acuerdo con las instrucciones del producto.

6.2.5 Precipitación de DNA

Los productos de PCR y los vectores se precipitaron con etanol. Brevemente, por cada 100 µl se agregó un vol de fenol, 1 vol de cloroformo y 1 vol alcohol isoamílico. La muestra se vortexeó para mezclar bien y se centrifugó 10 min a 13000 rpm a 4°C. Posteriormente, se agregaron 2 vol de etanol frío, 1/10 vol de 3M acetato de sodio pH 5.2 y 2 µl de glicógeno. Se precipitó toda la noche a -20°C. La muestra se centrifugó 10 min a 13000 rpm a 4°C, se descartó el sobrenadante y el botón se lavó dos veces con etanol al 70% centrifugando a 13000 rpm por 5 min a temperatura ambiente. Se dejó secar y se resuspendió en 20 µl de agua bidestilada.

6.2.6 Purificación de DNA de geles de agarosa

Los vectores e insertos se digirieron con las enzimas correspondientes en un volumen de 25 µl. La reacción consistió en 2.5 µl buffer 10X (según la enzima), 1 µl de cada enzima, 1 µg de DNA y se incubó durante 4 h. El DNA digerido se corrió en un gel de agarosa de bajo punto de fusión (Cambrex) y se cortaron las bandas de agarosa con el DNA de interés. Para la purificación, la banda de agarosa de interés se derritió a 65°C durante 10 min (si era necesario se agregó un poco de agua). Se agregó 1 vol de fenol frío y se vortexeó durante 5 min. Se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min. La fase acuosa se separó y se hizo una extracción normal del DNA con 1 vol de fenol, 1 vol de cloroformo y 1 vol de alcohol isoamílico. El sobrenadante se precipitó con 2 vol de etanol, 1/10 vol de acetato de amonio 3M pH 5.2 y glicógeno (opcional) a -20°C toda la noche o 2 h a -70°C.

6.2.7 Ligación y lavados con butanol

La reacción de ligación se realizó en un volumen final de 20 µl y consistió en 4 µl de buffer de ligasa 5X, 40 nmoles de vector digerido, 60 nmoles de inserto y 1 µl de DNA ligasa T4 (5 U) (Invitrogen). La reacción se incubó 3-4h a temperatura ambiente (25°C). En el caso de que el inserto presentara algún extremo romo, para la reacción de ligación se usaron de 10-20 unidades de ligasa T4 en un volumen de 10 µl incubando de 14-16 h. La ligación se realizó en 100 µl y se precipitó con lavados sucesivos de un vol de 1-butanol (también puede utilizarse 2-butanol) hasta

que el DNA se observó en el fondo del tubo. El DNA se secó y se resuspendió en 20 μ l de agua destilada.

6.2.8 Preparación de células electrocompetentes

Para preparar las células electrocompetentes, se hizo un preinóculo de 5 ml en medio YENB (0.75% extracto de levadura, 0.8% Bacto nutrient broth) de *E. coli* DH5 α creciendo a 37°C durante toda la noche. Este preinóculo se agregó a 1 L de medio YENB y se dejó en agitación de 3-6 h hasta que se alcanzó una densidad óptica DO₆₀₀ entre 0.5-0.9. Las células se enfriaron en hielo durante 15 min y se centrifugaron a 4000 x g durante 10 min para remover el sobrenadante. Las células fueron lavadas dos veces con 200 ml de agua estéril fría, primero resuspendiendo en 25 ml agitando vigorosamente y llenando al volumen final. Las células se resuspendieron en un total de 50 ml de glicerol al 10% (filtrado) frío. Las células se centrifugaron y resuspendieron en 2-3 ml de 10% glicerol y se alicuotaron en tubos de 40 μ l. Las alícuotas se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C.

6.2.9 Electroporación

Para la electroporación, se usaron 10 μ l de la reacción de ligación con 40 μ l de células electrocompetentes de *E. coli* DH5 α a 1.8 mV. Las células electroporadas se recuperaron en 1 mL de medio SOC (para preparar 1 L: 20 g bacto-triptona, 5 g extracto de levadura, 0.5 g NaCl, pH 7.0, autoclavear y agregar 5 ml de 5 M de MgCl₂ y 20 ml de 1 M glucosa) durante 20-30 min en agitación a 37°C. Las células se platearon en cajas de Petri con LB (Luria Broth) suplementado con el antibiótico indicado (100 μ g/ml de ampicilina; 100 μ g/ml de cloramfenicol o 30 μ g/ml de kanamicina) y se incubaron a 37°C por 24 h.

6.3 EXTRACTOS TOTALES DE PROTEÍNAS

Se colectaron 20 pares de glándulas salivales de *SgS3-Gal4* homócigo y 30 pares de *Dmp52i; SgS3-Gal4* (homócigo para el dsRNA y el driver) en 30 μ l de buffer de extracción (250 mM sacarosa, 50 mM Tris pH 7.5, 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM EDTA e inhibidores de proteasas Complete® (Roche)) y se ajustó a una concentración final de SDS del 1%. Posteriormente, se le colocaron 10 μ l de buffer Laemmli a la muestra, se hirvió durante 10 min y se cargó en un gel de acrilamida SDS-PAGE, el cual se transfirió a membranas de nitrocelulosa y se reveló por quimioluminiscencia (ECL Amersham). En el caso de moscas completas, por

cada 200 mg de biomasa (larvas o adultos) se agregó 1 ml de buffer de extracción y se agregó SDS a una concentración final de 1%. La muestra se homogenizó por maceración y se filtró en una jeringa con fibra de vidrio para eliminar la cutícula. Posteriormente, se centrifugó a 8000 rpm durante 10 min. El sobrenadante constituyó la fracción soluble y el botón celular la fracción insoluble. La fracción soluble se clarificó 2 veces centrifugando a 10000 rpm durante 10 min. El extracto se alicuotó y almacenó a -20°C.

6.4 ENSAYO DE PULLDOWN

6.4.1 Transcripción y traducción *in vitro*.

La reacción de transcripción/traducción *in vitro* se realizó utilizando el kit TNT® Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega). Brevemente, la mezcla de reacción consistió en lo siguiente: 40 µl de reticulocito, 2 µl de metionina marcada radiactivamente con ³⁵S (Perkin Elmer), 1 µg de DNA plasmídico, agua bidestilada a un volumen de 50 µl. La mezcla se incubó 90 min a 30°C y se almacenó a -20°C.

6.4.2 Inducción y purificación de proteínas de fusión a GST

Para la sobre-expresión de las proteínas de fusión a GST, se sembró un preinóculo en 5 ml de medio LB de las clonas de *E. coli* DH5α o BL21 y se crecieron toda la noche. Este cultivo se diluyó 1:50 en 20 ml de LB, se dejó crecer 1 h a 37°C y fueron inducidos a una concentración 0.4 mM de IPTG (Sigma) a 37°C durante 4 h con agitación vigorosa. Posteriormente, el cultivo se centrifugó a 12000 rpm a 4°C durante 10 min para obtener el botón celular. El botón celular de un volumen correspondiente a 5 ml de cultivo se resuspendió en 1 ml de buffer de solubilización STE (1mM EDTA, 5 mM DTT, 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0) o en PBS con inhibidores de proteasas Complete® (Roche), se agregó lisozima a una concentración final de 1 mg/ml y esta mezcla se incubó en agitación durante 2 h a 4°C. Se agregó sarcosil (N-lauryl sarcosina de sodio) a una concentración final de 1% y se dejó reposar 30 min en hielo. Las muestras se sometieron a 4 ciclos de sonicación (20 s sonicación, 40 s en hielo) o hasta que la mezcla tuvo fluidez. Posteriormente, se agregó tritón X-100 a una concentración final al 1% y se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se almacenó a -20°C. Las proteínas recombinantes se purificaron con perlas de GST-sefarosa (Amersham). Las perlas se incubaron durante 12 h con 10 vol de PBS para

hidratarlas. Posteriormente, se lavaron 5 veces con PBS centrifugando cada vez a 1500 rpm por 5 min. Por cada volumen de perlas GST-Sefarosa se agregaron 2 volúmenes de lisado bacteriano. Las perlas se incubaron 4 h o toda la noche a 4°C en agitación. Después de la incubación, las perlas se lavaron 3 veces con 2 volúmenes de PBS invirtiendo el tubo 20 veces. Para monitorear la purificación de la proteína de fusión a GST se cargaron las perlas en un SDS-PAGE analítico.

6.4.3 Ensayo de pulldown

Aproximadamente un volumen de perlas de sefarosa con una cantidad equivalente a 3-4 µg de GST y GST-Dmp52 purificada fueron lavadas 2 veces con 1 ml buffer de interacción (20 mM Hepes pH 7.9, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 4 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.15% nonidet P-40 (NP-40), 10% glicerol) durante 5 min para equilibrar las perlas. Las perlas equilibradas se bloquearon con 1% BSA en buffer de interacción en un volumen final de 300 µl durante 30 min a 4°C en agitación constante. Posteriormente, las perlas se lavaron 2 veces con 500 µl de buffer de interacción y se agregaron 5 µl de reacción transcripción-traducción *in vitro* (TNT) de Dp53 marcada con metionina radiactiva (³⁵S) en 300 µl finales de buffer de interacción. La mezcla se dejó en incubación durante 5 h a 4°C en agitación constante. Después del tiempo de incubación, se realizaron 6 lavados con 1 ml de buffer de interacción que consistieron en 30 inversiones del tubo eppendorf seguido de centrifugación a 800 rpm durante 5 min. Las perlas se corrieron en un gel de acrilamida SDS-PAGE, el cual se secó y se reveló por autorradiografía.

6.5 CULTIVO DE CÉLULAS S2R⁺ DE *D. melanogaster*

6.5.1 Generación de vectores y construcciones.

6.5.1.1 Clonación de Dp53 en pAc5.1/V5-HisA.

Para los ensayos de transfecciones transientes se usó el vector pAc5.1/V5-HisA (Invitrogen), el cual utiliza el promotor de actina-5C para expresar la proteína de interés de manera constitutiva con las etiquetas V5-6XHis en el extremo carboxilo terminal. Dado que en este vector se requiere incluir una secuencia de Kozak para permitir la unión del RNA mensajero al ribosoma, se utilizó la siguiente secuencia de Kozak: **GCC GCC ATG GTC**. Esta secuencia se incluyó en el oligonucleótido forward seguido de la secuencia del DNA codificante de Dp53. Las secuencias clonadas de Dp53 correspondieron a las secuencias codificantes de la isoforma corta (DΔNp53) y larga (Dp53). Las secuencias se clonaron en el vector pAc5.1/V5-

HisA con los sitios *EcoRI* en el extremo 5' y *XhoI* para el extremo 3' (Tabla I). El oligonucleótido reverso no incluyó un codón de paro ya que después del sitio de clonación múltiple se encuentra la secuencia codificante para la etiqueta V5 y 6XHis, cuidando que el inserto quedara en fase con la secuencia de las etiquetas.

Tabla I. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para clonar las isoformas de Dp53 en el vector pAc5.1/V5-HisA. La secuencia de Kozak incluida en el oligonucleótido forward está resaltada en negritas; los sitios de restricción en encuentran subrayados.

Construcción	Forward	Reverso
DΔNp53-V5	5'-GC <u>GAA TTC</u> GCC GCC ATG GTC ATG TAT ATA TCA CAG CCA ATG-3'	5'-GC <u>CTC GAG</u> TGG CAG CTC GTA GGC ACG-3'
Dp53-V5	5'-GC <u>GAA TTC</u> GCC GCC ATG GTC ATG AGT CTT CAC AAG TCC-3'	5'-GC <u>CTC GAG</u> TGG CAG CTC GTA GGC ACG-3'

6.5.1.2 Generación del vector pAc5.1/NT-FLAG y pAc5.1/CT-FLAG

Con el fin de obtener proteínas etiquetadas con FLAG, se usó el vector N-terminal p3XFLAG-CMV-9 (Sigma) como templado para clonar la secuencia 3XFLAG en el vector pAc5.1/V5-HisA y etiquetar proteínas en la región amino o carboxilo terminal. El vector p3XFLAG-CMV-9 presenta en su región aminoterminal el epítipo FLAG en tándem 3 veces; además presenta una secuencia líder para pre-protripsina (PPT LS) precediendo la secuencia FLAG (figura 8). Para amplificar la secuencia 3XFLAG y posteriormente clonarla en pAc5.1/V5-HisA en la región amino terminal se utilizaron los oligonucleótidos de la tabla II para obtener un producto de PCR de 85 bp. El oligonucleótido forward incluyó la secuencia de Kozak (**GCC GCC ATG GTC**) y un sitio *KpnI*, mientras que el oligonucleótido reverso tiene un sitio *EcoRI* y no tiene codón de paro (figura 9).

Tabla II. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para clonar el fragmento 3XFLAG del vector p3XFLAG-CMV-9 en pAc5.1/V5-HisA en la región amino terminal. La secuencia de Kozak incluida en el oligonucleótido forward está resaltada en negritas; los sitios de restricción en cada oligonucleótido se encuentran subrayados.

Construcción	Forward	Reverso
pAc5.1/NT-FLAG	5'-GC <u>GGT ACCGCC</u> GCC ATG GTC GAC TAC AAA GAC-3'	5'-GC <u>GAA TTC</u> AAG CTT GTC ATC GTC-3'

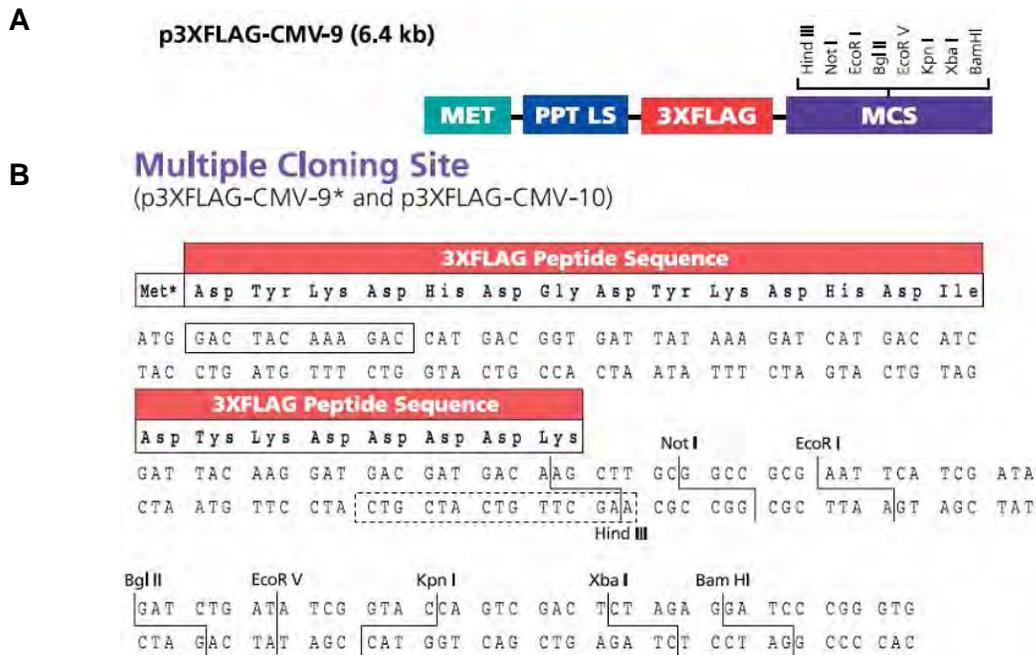


Figura 8. Vector p3XFLAG-CMV-9. **A.** Esquema del vector p3XFLAG-CMV-9 con todos sus componentes. **B.** Secuencia de 3X-FLAG del vector p3XFLAG-CMV-9. Las secuencias en el cuadro negro se incluyeron para el oligonucleótido forward y las del cuadro punteado para el reverso. Como se observa en el esquema, se generó un sitio *HindIII* al final de la secuencia 3XFLAG clonada.

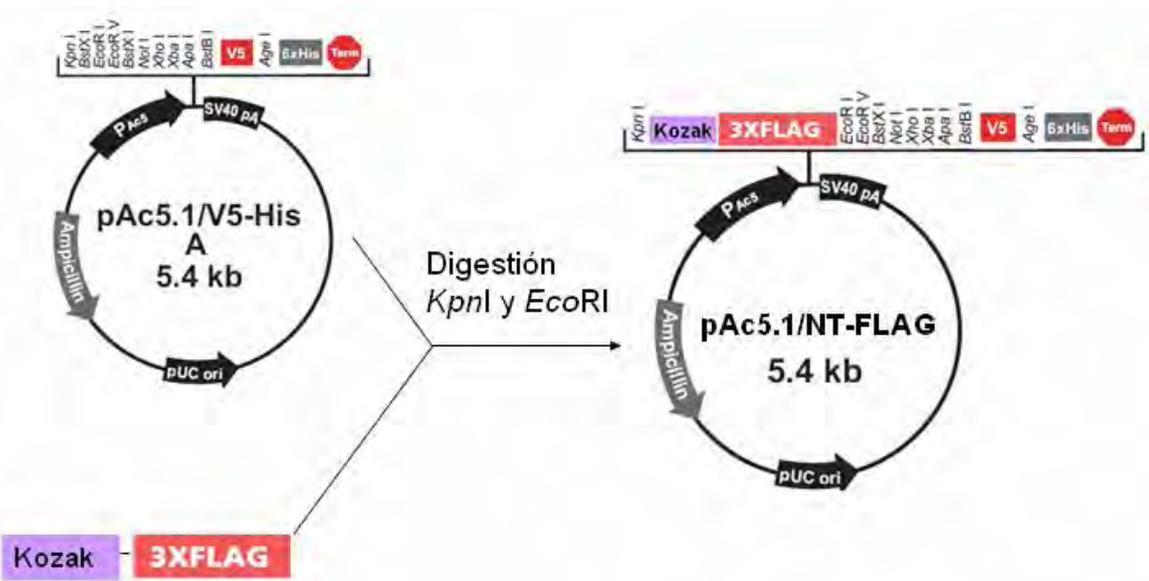


Figura 9. Generación del vector pAc5.1/NT-FLAG. Esquema de clonación del fragmento 3XFLAG en el amino-terminal de pAc5.1/V5-HisA para generar el vector pAc5.1/NT-FLAG.

Para amplificar la secuencia 3XFLAG y clonarla en pAc5.1/HisA en la región carboxilo terminal se utilizaron los oligonucleótidos de la tabla III. El oligonucleótido forward no incluye la secuencia de Kozak, tiene un sitio *Apal* y conserva el sitio

*Bst*BI, mientras que el oligonucleótido reverso tiene un sitio *Pme*I y un codón de paro (figura 10).

Tabla III. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para clonar el fragmento 3XFLAG del vector p3XFLAG-CMV-9 en pAc5.1/V5-HisA en la región carboxilo terminal. Los sitios de restricción utilizados para la clonación están subrayados.

Construcción	Forward	Reverso
pAc5.1/CT-FLAG	5'-GC <u>G</u> GG <u>C</u> CC <u>T</u> TC GAA GAC TAC AAA GAC -3'	5'- GC <u>T</u> TT <u>A</u> AA C TCA AAG CTT GTC ATC GTC- 3'

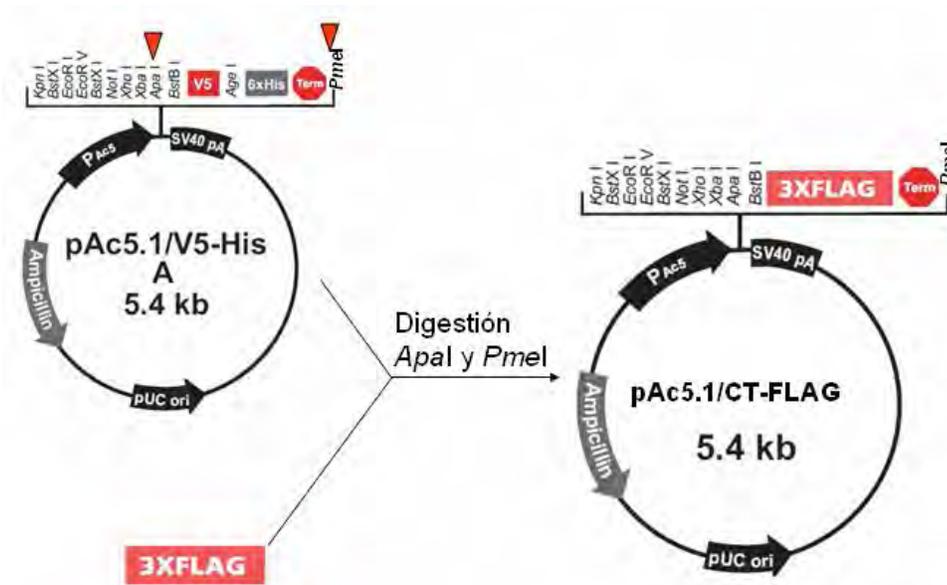


Figura 10. Generación del vector pAc5.1/CT-FLAG. Esquema de clonación del fragmento 3XFLAG en el carboxilo-terminal de pAc5.1/V5-HisA para generar el vector pAc5.1/CT-FLAG.

6.5.1.3 Clonación de Dmp52 en el vector pAc5.1/NT-FLAG

Para la clonación de Dmp52 en el vector pAc5.1/NT-FLAG se usaron los sitios *Eco*RI para el extremo 5' y *Xho*I para el extremo 3' (Tabla IV).

Tabla IV. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para clonar Dmp52 en el vector pAc5.1/NT-FLAG. Los sitios de restricción se encuentran subrayados.

Construcción	Forward	Reverso
FLAG-Dmp52	5'-GGGC <u>G</u> AA <u>T</u> TC <u>A</u> TG GCC GAC ACG AAA TCC GGT-3'	5'-GC <u>C</u> TC <u>G</u> AG TCA AAC ACC ACT CTT AGA-3'

6.5.2 Mantenimiento de la línea celular

Las células S2R⁺ se mantuvieron en medio de Schneider completo con 10% suero fetal bovino (Hyclone) y suplementado con 100 µg de estreptomicina-2.5 µg de amfotericina (Sigma) a 26°C.

6.5.3 Transfecciones transientes y extractos totales de proteínas de células S2R⁺

Las células S2R⁺ fueron cotransfectadas transientemente con 10 µg de DNA plasmídico de cada una de las construcciones de interés por el método de cloruro de calcio (Drosophila Schneider 2 (S2) cells manual, Invitrogen version F). Después de transfectar, las células se dejaron crecer 48 h y posteriormente se colectaron para la extracción de proteínas totales solubles. Las células se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min y el botón celular se resuspendió en buffer WCE (25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM KCl, 5 mM NaF, 1 mM pirofosfato de sodio, 1% nonidet P-40, 0.1% Triton X-100, 2 mM PMSF e inhibidores de proteasas Complete (Roche)). Se dejó en agitación a 4°C durante 30 min y posteriormente se clarificó a 11000 rpm. El extracto se alicuotó y almacenó a -70°C.

6.5.4 Inmunoprecipitaciones y anticuerpos

Las perlas de proteína G acopladas a agarosa (Invitrogen) fueron bloqueadas con 0.1% BSA. Para cada IP se usaron como mínimo 250 µg de proteína total de células transfectadas y se usó un volumen final de 300 µl. Las perlas se lavaron 3 veces con buffer de extracto total para eliminar el PBS. Se hicieron 2 prelimpiados (preclearings) de 1 h cada uno a 4°C y posteriormente se incubó con el anticuerpo toda la noche a 4°C en agitación constante. Al día siguiente, se incubó con perlas G bloqueadas durante 1 h a 4°C y después se lavaron 4 veces por 10 min cada vez. Las perlas se resuspendieron en buffer Laemmli, se cargaron en un gel SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Los anticuerpos contra las etiquetas se utilizaron para inmunoprecipitar en una proporción de 0.5 µg de anticuerpo/250 µg proteína total. Para las CoIPs de células S2R⁺ silvestres se utilizaron 3 mg de extracto total de proteína y los anticuerpos se utilizaron en una proporción de 1 µg de anticuerpo/mg de proteína.

Los anticuerpos utilizados contra las etiquetas fueron: anti-V5 monoclonal (Abcam, ab27671), anti-V5 policlonal (Abcam, ab15828), anti-FLAG monoclonal (Sigma, Clone M2, F1804) y anti-FLAG policlonal (Sigma, F7425). Los anticuerpos

XPB S-19, p53 D-200, p62 Q-19 y CDK7 ds-17 fueron proporcionados por Santa Cruz; el anticuerpo contra Dmp52 fue generado por NEP.

6.5.5 Competencia del anticuerpo α -Dmp52

Para realizar las competencias, se utilizó un péptido sintético de Dmp52 (NEP, New England Peptide), con el cual se inmunizaron las ratas para obtener los anticuerpos contra ésta proteína. La secuencia del péptido utilizada fue la siguiente: Ac-CDVKRYWKKYSKSGV-OH (peso molecular 1889), que corresponde a los últimos 14 aminoácidos de la región carboxilo terminal de Dmp52.

La competencia se realizó en un volumen de 150 μ l con una relación anticuerpo:péptido de 10:100 nM. La mezcla se dejó 2h a temperatura ambiente para permitir la formación del complejo anticuerpo-péptido. Como control “mock” de la competencia se sustituyó el péptido por un volumen igual de agua. Posteriormente, el control “mock” y la competencia con el péptido se probaron en un western blot ajustando el volumen para obtener una dilución final del anticuerpo 1:500.

6.6 DISECCIÓN Y ANÁLISIS DE ALAS

Las alas de las moscas se disecaron con pinzas tomándolas de la región que las unía al cuerpo de la mosca. Las alas se colectaron en pozos con etanol absoluto y posteriormente se pasaron a un portaobjetos humedecido con etanol absoluto. Ya que el etanol se hubo evaporado, inmediatamente se agregaron unas gotas de una solución de ácido láctico:etanol (6:5) (Sigma). Las alas se sumergieron en la solución y se ordenaron en filas. Se colocó un cubreobjetos, se selló con barniz de uñas y se presionó para aplanar las alas. Se esperó a que la preparación se secase y se analizó en un microscopio óptico.

Para las determinaciones de la densidad celular, se tomó una región arbitraria entre las venas 3 y 4 del ala y se contó el número de quetas dentro de esta región. La estimación del tamaño del ala se realizó utilizando el software Image J 1.28u, del Instituto Nacional de Salud (National Institute of Health). El número total de células se calculó como describió previamente Montagne *et al.* (1999). En el caso de la estimación del área del dominio anterior y posterior, se consideró el límite a partir de la vena L4. Para cada experimento se analizaron como mínimo 10 alas de cada genotipo. Como análisis estadístico se utilizó un análisis de t-Student de dos colas para determinar diferencias significativas.

6.7 ENSAYO DE PÉRDIDA DE HETEROCIGOSIDAD

Se obtuvieron moscas heterocigas para *mwh*¹ al cruzar hembras *MS1096*;+/+; *mwh*¹ con machos *Dmp52i* o sus combinaciones. Todas las hembras adultas se colectaron y las alas fueron disecadas y montadas como se describió en la sección 6.6. Sólo las células que presentaron 3 o más tricomas se consideraron como fenotipo *mwh*^{-/-} y se analizaron un mínimo de 15 alas por genotipo (de Andrade *et al.*, 2004).

6.8 TINCIONES DE DISCOS DE ALA

6.8.1 Ensayo de TUNEL

Para este ensayo se utilizó el kit In Situ Cell Death Detection Kit (Roche) de acuerdo a las instrucciones del producto. Brevemente, los discos se disecaron en PBS y se fijaron con formaldehído al 4% en PBS durante 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, el tejido se lavó 3 veces durante 10 min con PBT (PBS+0.3% tritón X-100) y se permeabilizó con 100 mM de buffer de citrato de sodio/0.1% tritón X-100 por 30 min a 65°C.

Los discos se lavaron 3 veces con PBS+0.5% tritón X-100 y después se lavaron con 10 µl de Buffer para TUNEL. Posteriormente, los discos se resuspendieron en 27 µl de Buffer para TUNEL y se incubaron por 30 min a temperatura ambiente y después otros 30 min a 37°C. Después del período de incubación, se agregaron 3 µl de enzima TdT y se incubó a 37°C durante 2.5 h. Los discos fueron lavados 2 veces con PBS+0.5% tritón X-100 durante 10 min y al final un lavado con PBT de 10 min. Finalmente, se montó en citifluor (Ted Pella, Inc.) y se observó con un microscopio de fluorescencia Axiovert 200 (Zeiss).

Para la cuantificación de los gránulos apoptóticos, todos los discos fueron tratados en las mismas condiciones y se tomó como muestra una n=3. La region de interés fue seleccionada y el número de partículas con la más alta intensidad (255 unidades arbitrarias) fueron cuantificadas usando el software Image-J (NIH). En cada imagen analizada, se ajustó el umbral con la más alta densidad correspondiente con lo etiquetado por la reacción de TUNEL. La desviación estándar se calculó usando Microsoft Excel.

En los discos irradiados, las larvas se irradiaron a 200 J en un Stratalinker 2400 (Stratagene), se dejaron recuperar 20 minutos, se disecaron en PBS y se fijaron. Se siguió el procedimiento para teñir por TUNEL.

6.8.2 Tinción con naranja de acridina

Los discos de ala se disecaron en PBS y se transfirieron a una solución 1 μM de naranja de acridina, se incubaron 5 min y después se observaron por microscopía de fluorescencia.

6.8.3 Inmunotinción de discos con 5-bromodeoxiuridina (BrdU)

Los discos de ala de larvas de tercer instar se disecaron en PBS y se incubaron en medio Schneider completo (10% suero fetal bovino) durante 30 min con 75 $\mu\text{g/ml}$ de BrdU (Sigma). Los discos se lavaron una vez con medio Schneider completo durante 10 min y posteriormente 2 veces con PBS durante 10 min. Los discos se fijaron 30 min con formaldehído al 4% en PBS y se lavaron dos veces con PBT (PBS+0.3% tritón X-100) durante 10 min.

Los discos se permeabilizaron durante 30 min en PBS con 0.6% tritón X-100. Posteriormente, los discos se incubaron con una mezcla 1:1 de PBS+0.6% tritón X-100:4 N HCl (concentración final 2 N) durante 30 min. Los discos se lavaron 3 veces durante 10 min con PBT y se bloquearon con 10% NGS (suero normal de cabra, Invitrogen) en PBT durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubó durante toda la noche a 4°C con 5% NGS en PBT con anti-BrdU (Developmental Hybridoma Bank) a una dilución 1:5000. Se lavó 3 veces por 20 min con PBT y se incubó con el anticuerpo secundario anti-ratón Alexa-Fluor rojo-568 (Invitrogen) a una dilución 1:250 en 5% NGS en PBT durante 2 h a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces durante 20 min con PBT y se montó con citifluor (Ted Pella, Inc.).

6.8.4 Inmunotinción de discos con H3Pser10 y P-JNK

Los discos de ala de larvas de tercer instar se disecaron en PBS y se fijaron en formaldehído al 4% en PBS por 30 min. Los discos se lavaron dos veces con PBT (PBS+0.3% tritón X-100) y se permeabilizaron durante 30 min con PBS+ 0.6% tritón X-100. Posteriormente, los discos se lavaron 3 veces con PBT durante 10 min. La muestra se bloqueó durante 1 h a temperatura ambiente con 10% NGS (Invitrogen) en PBT. Se lavó una vez durante 5 min con PBT y se incubó toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario en PBT+5% NGS. Se lavó 3 veces por 20 min y se agregó el anticuerpo secundario en PBT en 5% NGS 2 h a temperatura ambiente. Finalmente, se lavó 3 veces por 20 min y se montaron en citifluor. El anticuerpo contra H3Pser10 (Upstate) se utilizó a una dilución 1:1000 mientras que para el anticuerpo contra P-JNK (Abcam, ab4821) se utilizó una dilución 1:100. El

anticuerpo secundario utilizado fue anti-conejo Alexa-Fluor rojo-568 (Invitrogen) a una dilución 1:250.

6.9 TRATAMIENTO CON TRIPTOLIDE (TPL)

Se disecaron los discos imagales de ala de larvas de tercer instar de *Ore R*, *MS1096/+*, *MS1096>Bski*, *MS1096>GUS-Ctp53DN*, *MS1096>Bski*, *GUS-Ctp53DN* en PBS y se incubaron en medio de insecto Shields y Sang M3 (Sigma) suplementado con 2% suero fetal bovino y 1% penicilina-estreptomicina (Gibco) en la presencia o ausencia de 100 μ M de triptolide (TPL) (Biovision) o DMSO a 25°C durante diferentes períodos de tiempo. Los discos se lavaron una vez con el mismo medio sin la droga, se fijaron en 4% formaldehído en PBS por 20 min y se lavaron 3 veces por 10 min con PBT (PBS con 0.3% tritón X-100). Posteriormente, se determinó la apoptosis a través del ensayo de TUNEL como se describió previamente.

VII. RESULTADOS

Las subunidades XPB, XPD y recientemente p8 se han estudiado bioquímica así como funcionalmente en varios organismos modelo. No obstante, dado que no existen síndromes en los humanos asociados a las mutaciones en otras subunidades de TFIIH, la función de estos componentes no se ha estudiado ampliamente. Por otro lado, se ha demostrado que *Drosophila melanogaster* constituye un buen modelo para el estudio de la función de subunidades de TFIIH (Mounkes y Fuller, 1999; Merino *et al.*, 2002). Fregoso *et al.* (2007) y Matsuno *et al.*, (2007) caracterizaron algunas de las funciones de Dmp52 en la mosca demostrando la importancia de esta subunidad en la función del holocomplejo TFIIH. Mutantes puntuales de Dmp52 evidenciaron que en la mosca fenotipos tales como la disminución en el tamaño de los organismos así como la aparición de tumores melanóticos y la inestabilidad cromosomal, están relacionados a aquellos que presentan los pacientes con xeroderma pigmentosum, síndrome de Cockayne y tricotiodistrofia (Fregoso *et al.*, 2007). Por otro lado, utilizando como modelo el disco de ojo de *D. melanogaster* también se demostró que las mutaciones en Dmp52 y en otros componentes de TFIIH están asociados a fenotipos “*minute*” sugiriendo defectos en el crecimiento.

No obstante, el análisis de las interacciones genéticas con Dp53 resulta difícil en estos organismos debido a la complejidad para interpretar los fenotipos asociados. Tomando estos puntos en consideración, se decidió evaluar si Dp53 interacciona físicamente con Dmp52 así como determinar si la interacción ocurre también a nivel genético usando como modelo el ala de *Drosophila melanogaster*.

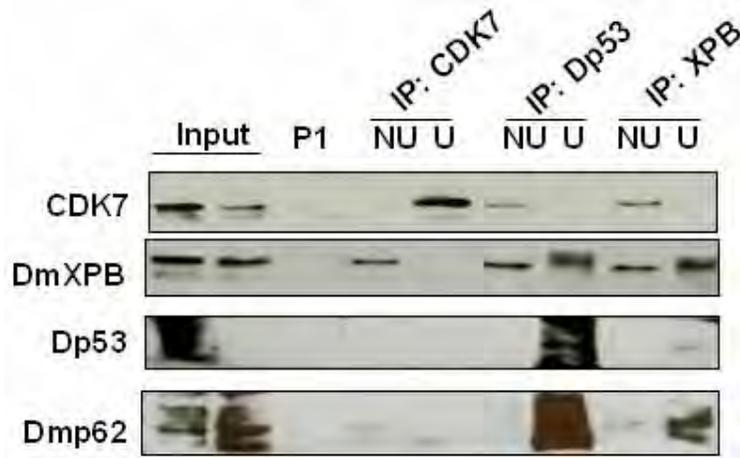
7.1 La subunidad Dmp52 de TFIIH interacciona físicamente con el supresor tumoral Dp53

7.1.1 Dp53 interacciona *in vivo* con componentes de TFIIH.

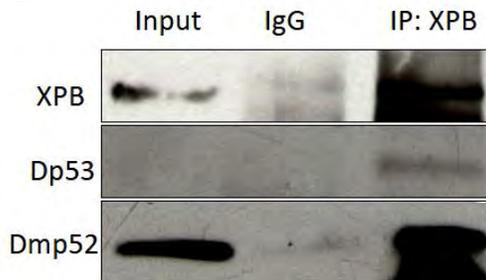
Se sabe que en los humanos p53 interacciona con algunas subunidades de TFIIH (Léveillard *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996) por lo que se decidió evaluar si Dp53 podía interaccionar con algunos componentes de TFIIH en la mosca. Para lograr este objetivo se realizaron coinmunoprecipitaciones (CoIPs) de extractos totales de células S2R⁺ silvestres utilizando anticuerpos contra CDK7, Dp53 y XPB. Interesantemente, las CoIPs utilizando los anticuerpos contra CDK7 y Dp53 sólo inmunoprecipitaron a su respectiva proteína mientras que el anticuerpo de XPB permitió coinmunoprecipitar a Dmp62, Dp53 y Dmp52 (figura 11A-B) sugiriendo que Dp53 se encuentra asociado a TFIIH *in vivo* aún en ausencia de estrés genotóxico. En cuanto a las CoIPs con los anticuerpos con CDK7 y Dp53, es posible que las diferencias se debieron a que las interacciones entre las proteínas del complejo pudieron ser eliminadas por los epítopes de los diferentes anticuerpos pudiendo incluso disgregar el holocomplejo. Esta suposición se apoya en el hecho de que en las CoIPs utilizando el anticuerpo específico contra Dp53 a partir de extractos de células S2R⁺ tratadas con formaldehído al 1% para inducir crosslinking, fue posible coinmunoprecipitar a Dmp52 (figura 11C).

Para reforzar los datos anteriores se decidió evaluar si Dp53 etiquetada y transfectada en células S2R⁺ permitían inmunoprecipitar a Dmp52 endógena. Interesantemente, las CoIPs con el anticuerpo contra FLAG usando extractos de células transfectadas con Dp53-FLAG lograron inmunoprecipitar a Dmp52 endógena sugiriendo su interacción *in vivo* (figura 11D). En el caso de extractos transfectados con DΔNp53-V5 y usando anti-V5, fue posible detectar la presencia de Dmp52 endógena, consistente con lo observado con Dp53-FLAG (figura 11E). Inesperadamente, se encontró que CDK7 y XPB no coinmunoprecipitaron con DΔNp53-V5, sugiriendo que la interacción entre Dmp52 y DΔNp53-V5 no es mediada por estas proteínas (figura 11E).

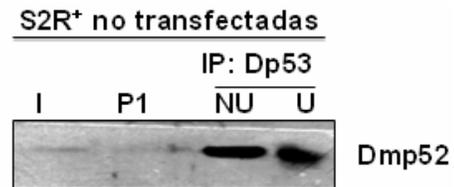
A



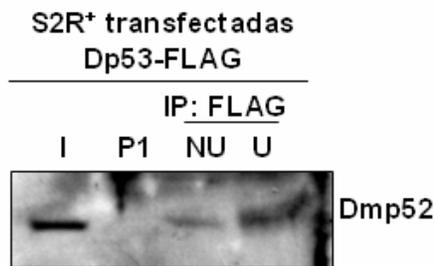
B



C



D



E

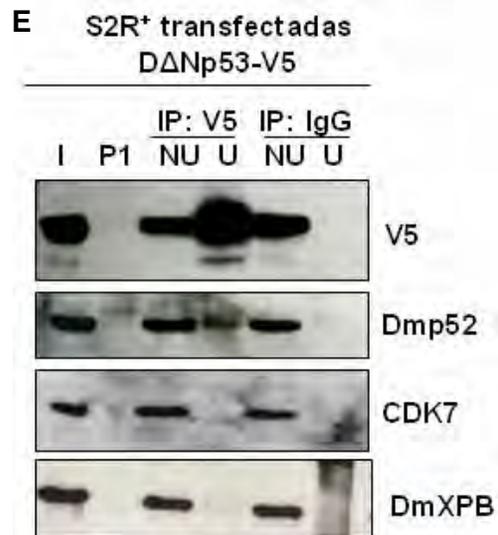


Figura 11. Dp53 coimmunoprecipita con subunidades de TFIIH *in vivo*. **A.** Coimmunoprecipitación de extractos totales de células S2R⁺ silvestres con diferentes anticuerpos. **B.** Coimmunoprecipitación de extractos totales de células S2R⁺ silvestres con el anticuerpo contra XPB demostrando que coimmunoprecipitan Dmp52 y Dp53. **C.** Coimmunoprecipitación de células S2R⁺ tratadas con formaldehído al 1%. La inmunoprecipitación se realizó con el anticuerpo específico de Dp53 y se reveló por western blot con Dmp52. I, input; P1, preclearing 1; NU, no unido; U, unido. **D.** Coimmunoprecipitación de células S2R⁺ transfectadas con Dp53-FLAG. La inmunoprecipitación se realizó con el anticuerpo FLAG y se reveló con el anticuerpo específico contra Dmp52. **E.** Coimmunoprecipitación de células S2R⁺ transfectadas con DΔNp53-V5. La inmunoprecipitación se realizó con el anticuerpo V5. El western blot se reveló con los anticuerpos contra V5, Dmp52, CDK7 y XPB.

Posteriormente, se realizaron CoIPs usando anticuerpos contra las etiquetas a partir de extractos de células cotransfectadas con FLAG-Dmp52 y las isoformas de Dp53 etiquetadas con V5 en el extremo carboxilo. Las CoIPs usando el anticuerpo contra V5 revelaron que FLAG-Dmp52 coinmunoprecipitó con Dp53-V5. De manera recíproca, al utilizar el anticuerpo contra FLAG se coinmunoprecipitó a FLAG-Dmp52 y Dp53-V5 (figura 12A). Las CoIPs de extractos cotransfectados con FLAG-Dmp52 y DΔNp53-V5 arrojaron los mismos resultados que Dp53-V5, demostrando la interacción entre Dmp52 y DΔNp53 (figura 12B). Interesantemente, estos ensayos también revelaron que no se detectó a CDK7 mientras que XPB coinmunoprecipitó en muy bajos niveles; no obstante, es posible que los bajos niveles de XPB y la ausencia de CDK7 puedan deberse a la pérdida de integridad del complejo. En conclusión, estos datos nos permiten corroborar que la interacción entre TFIIH y Dp53 ocurre *in vivo* en células S2R⁺.

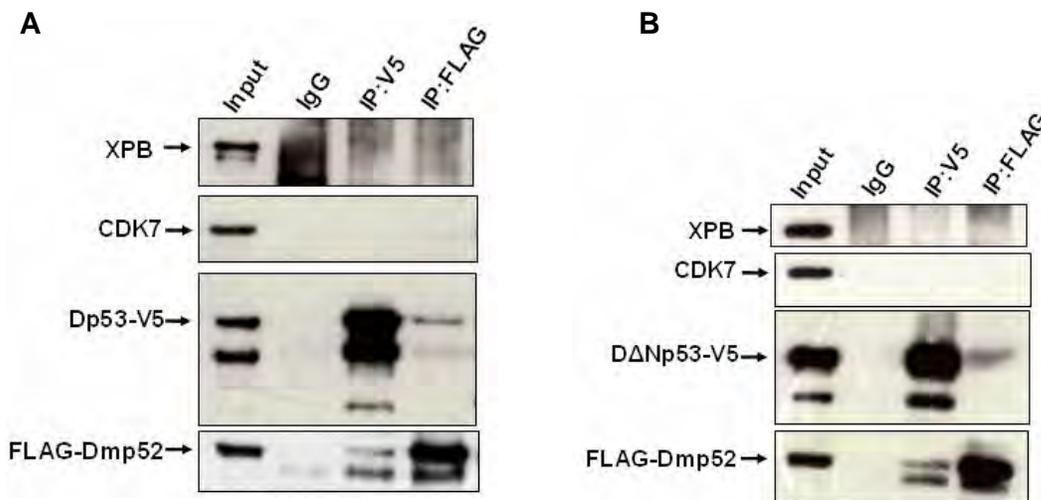


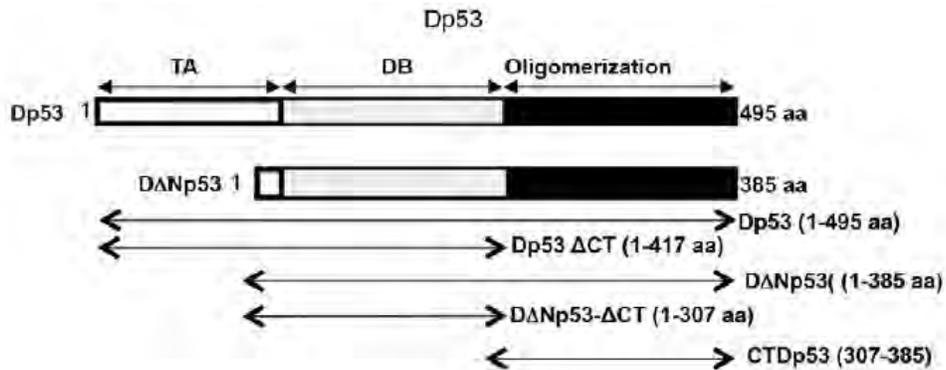
Figura 12. Dmp52 interacciona con ambas isoformas de Dp53 en células S2R⁺ transfectadas. A. Coinmunoprecipitaciones a partir de extractos de células cotransfectadas FLAG-Dmp52 y Dp53-V5. **B.** Coinmunoprecipitaciones a partir de extractos de células cotransfectadas FLAG-Dmp52 y DΔNp53-V5. En A y B, Dmp52 y Dp53 fueron revelados con los anticuerpos contra las etiquetas FLAG y V5, respectivamente.

7.1.2 Interacción *in vitro*: Ensayo de Pulldown

Considerando que Dp53 interaccionó *in vivo* con TFIIH, se decidió mapear las regiones de interacción entre Dmp52 y Dp53 realizando ensayos de pulldown. En el caso de Dp53, las isoformas larga (Dp53) y corta (DΔNp53) así como sus fragmentos clonados en el vector pGADT7 de levadura fueron utilizados para

realizar la reacción de transcripción-traducción *in vitro* de las proteínas y marcarlas con metionina-³⁵S (figura 13A). En el caso de las proteínas fusionadas a GST, se utilizaron diferentes fragmentos de Dmp52 para determinar si existían dominios de interacción específicos con Dp53, de los cuales el dominio CTD-Dmp52 se sabe que interacciona con p8 (Herrera-Cruz *et al.*, 2012) (figura 13B).

A



B

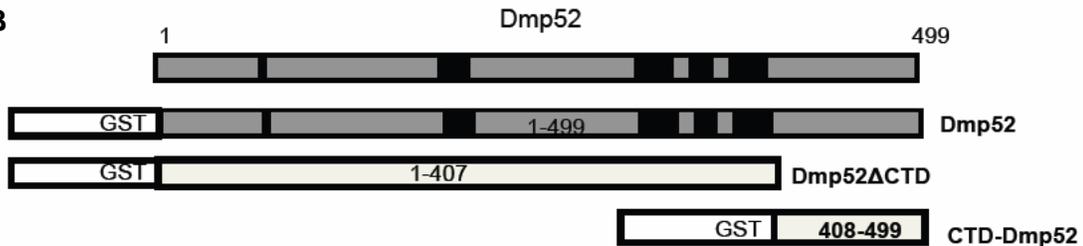


Figura 13. Esquemas de los fragmentos de Dmp52 y Dp53 utilizados para el ensayo de pulldown. A. Fragmentos de Dp53 transcritos-traducidos *in vitro*. **B.** Fragmentos de Dmp52 fusionados a GST.

Los ensayos de interacción utilizando la clona GH11591 (la cual codifica para DΔNp53) se observó que DΔNp53 interaccionó con Dmp52, ya que la señal radiactiva fue más intensa en la interacción con GST-Dmp52 comparada con sólo GST (figura 14A). Al analizar los fragmentos diseñados de Dmp52, se encontró que ambas isoformas de Dp53 fueron capaces de interaccionar con GST-Dmp52ΔCTD y GST-CTD-Dmp52 (figura 14B). Estos resultados sugieren que Dmp52 contiene al menos dos regiones de interacción con ambas isoformas de Dp53. Este dato no es raro, ya que existen proteínas que interaccionan en más de un sitio con otras, como en el caso de p52 humana, la cual posee dos sitios de interacción con XPB (Jawhari *et al.*, 2002; Coin *et al.*, 2007).

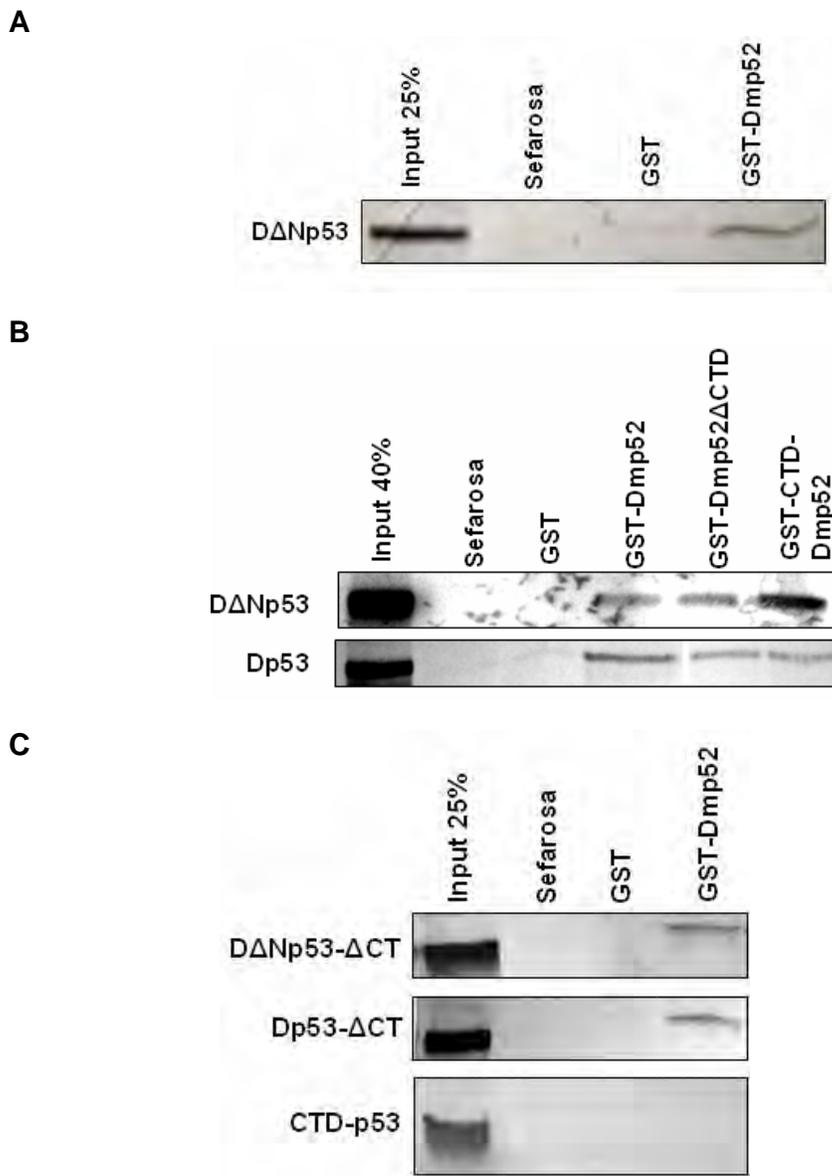


Figura 14. Dmp52 interacciona físicamente con las isoformas de Dp53 que excluyen la región carboxilo terminal. **A.** Autoradiografía del ensayo de pulldown con GST-Dmp52 y DΔNp53 transcrito-traducido *in vitro* a partir de la clona GH11591 **B.** Dmp52 interaccionó con ambas isoformas de Dp53 transcritas-traducidas a partir de las clonas en pGADT7. Asimismo, ambos fragmentos de Dmp52 interaccionaron con las isoformas de Dp53. **C.** Autoradiografía del ensayo de pulldown con GST-Dmp52 y los fragmentos de Dp53.

Por otro lado, los ensayos de pulldown utilizando los distintos fragmentos de Dp53 mostraron que Dmp52 interaccionó con ambas isoformas con regiones que excluyen el carboxilo terminal (figura 14C). Este resultado discrepa con el trabajo de Levéillard *et al.* (1996), donde se reportó que la proteína de 52 kDa perteneciente a TFIIH interaccionó con el fragmento carboxilo terminal de hp53. En nuestros experimentos observamos que la región carboxilo terminal correspondiente en *D.*

melanogaster no interacciona con Dmp52 e incluso no es necesaria para mantener la interacción ya que los fragmentos de las isoformas de Dp53 que excluyen el carboxilo terminal mantienen la interacción física con Dmp52 (figura 14C).

7.2 La disminución de los niveles de Dmp52 genera una reducción en el tamaño del ala y defectos en los patrones de venación.

Dado que se determinó que Dp53 interacciona físicamente con Dmp52, se decidió evaluar los efectos causados por la disminución de Dmp52 en *Drosophila melanogaster* y posteriormente utilizar este modelo para evaluar su interacción con Dp53. Para ello, se utilizó un dsRNA diseñado contra Dmp52 (*Dmp52i*), el cual fue dirigido al dominio dorsal del disco de ala de larvas de tercer instar con el driver *MS1096*. El driver *MS1096* expresa el activador transcripcional Gal4 en la región dorsal del dominio que dará origen al ala en el adulto, aunque su expresión es mínima en la región que dará lugar al escutelo (Mace y Tugores, 2004). Interesantemente, la expresión de *Dmp52i* en el disco de ala provocó una disminución en el tamaño de la misma, lo cual es consistente con el fenotipo *minute* observado en mutantes de Dmp52 (Fregoso *et al.*, 2007) (figura 15A-B). Asimismo, debido a que la expresión de Gal4 con el driver *MS1096* ocurre sólo en el dominio dorsal del ala, las alas con niveles reducidos de Dmp52 exhibieron un fenotipo de curvatura hacia arriba (“bent out”) ya que los efectos ocurrieron sólo en el dominio dorsal provocando la deformación de las mismas (figura 15A).

El análisis microscópico demostró que además de los defectos en el crecimiento, las alas *MS1096>Dmp52i* presentaron defectos en los patrones de venación. Estos defectos incluyeron la formación ectópica de venas y la deformación de otras ya existentes (figura 15C y D). Los fenotipos como la curvatura, la disminución del tamaño del ala y los defectos en los patrones de venación fueron 100% penetrantes ya que todas las moscas nacidas presentaron estos fenotipos. Asimismo, la viabilidad de las moscas *MS1096>Dmp52i* no se afectó ya que fue cercana al 100% (datos no mostrados).

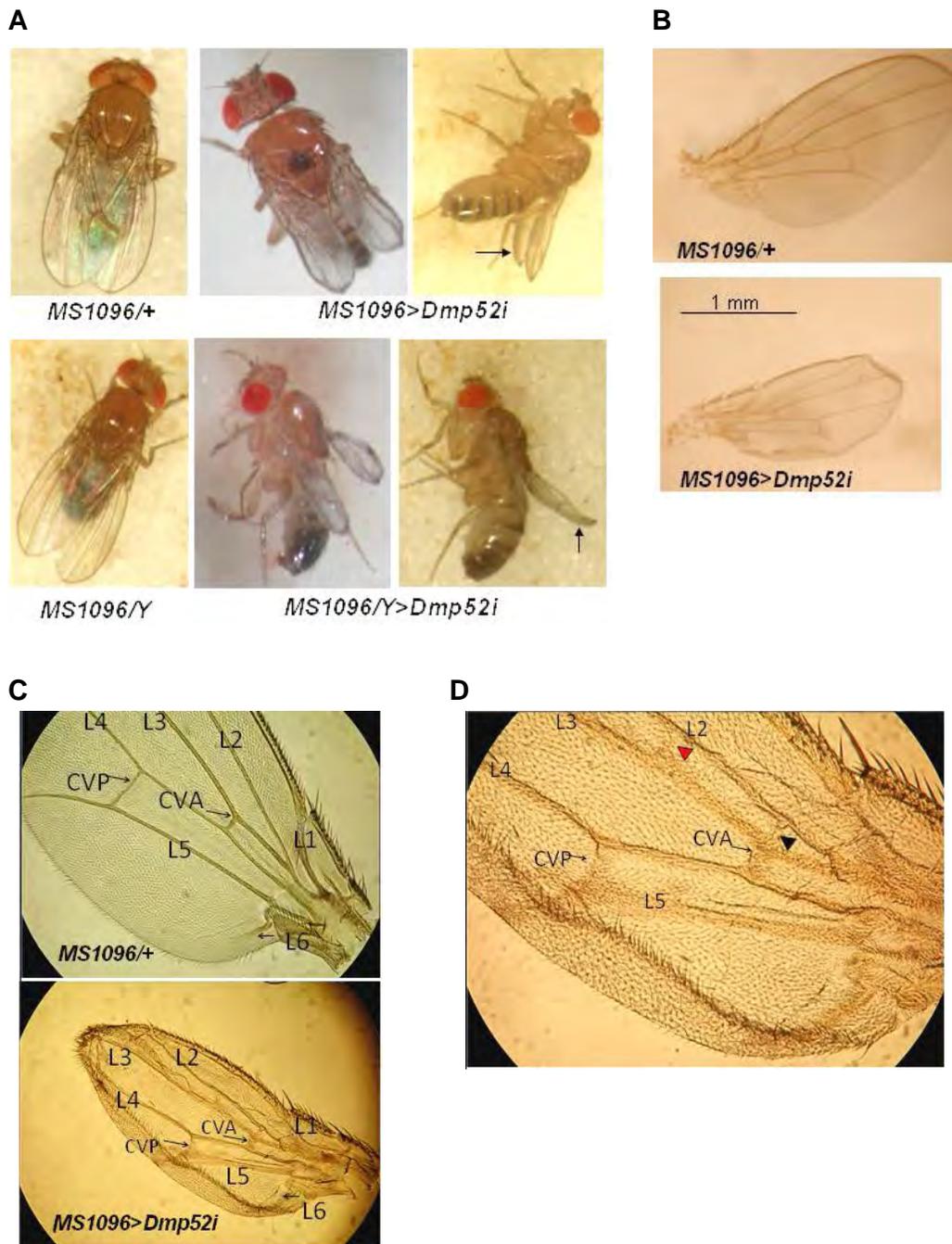


Figura 15. La disminución de los niveles de Dmp52 en ala produce una reducción en el tamaño, curvatura del ala y alteración en el patrón de venación. A. Comparación de moscas adultas *MS1096/+* (control) y *MS1096>Dmp52i*. Las flechas indican la curvatura del ala. **B.** Comparación del tamaño final de las alas de moscas control y moscas *MS1096>Dmp52i*. Ambas figuras están en la misma escala. **C.** Alteraciones en el patrón de venación en las alas de moscas *MS1096>Dmp52i* a un objetivo de 10X. Obsérvese la diferencia en el tamaño. **D.** Foto aumentada de los defectos observados en alas *MS1096>Dmp52i*. Obsérvese la extensión de la crosvena anterior en otra región (triángulo negro) y la aparición de venas en otros dominios (triángulo rojo). Objetivo 20X. L1-L6, venas longitudinales 1 a 6; CVP, crosvena posterior; CVA, crosvena anterior.

Para confirmar los datos anteriores se utilizó el driver *engrailed-Gal4* (*en-Gal4*), el cual dirige la expresión de Gal4 en el dominio posterior del ala y se expresa

también durante la embriogénesis. La viabilidad de las moscas que expresaron *Dmp52i* en el dominio de *en-Gal4* fue aproximadamente de 17% a 25°C (102 moscas nacidas/606 moscas esperadas). El dato anterior sugiere que la disminución de *Dmp52* en otros tejidos y/o durante la embriogénesis además del ala provoca muerte durante el desarrollo. Todas las moscas supervivientes presentaron una disminución en el tamaño del ala y defectos en los patrones de venación consistente con lo observado con el driver *MS1096*. Como se observa en la figura 16B, la disminución del tamaño fue más evidente en la región posterior. La formación ectópica de venas se observó principalmente en el límite anterior-posterior, situado entre la vena L3 y L4 cerca de la cross-vena anterior (CVA), mientras que la cross-vena posterior (CVP) fue muy reducida en tamaño e incluso en algunas alas casi desapareció (figura 16C). Estos defectos fueron 100% penetrantes ya que todas las moscas nacidas presentaron estos fenotipos.

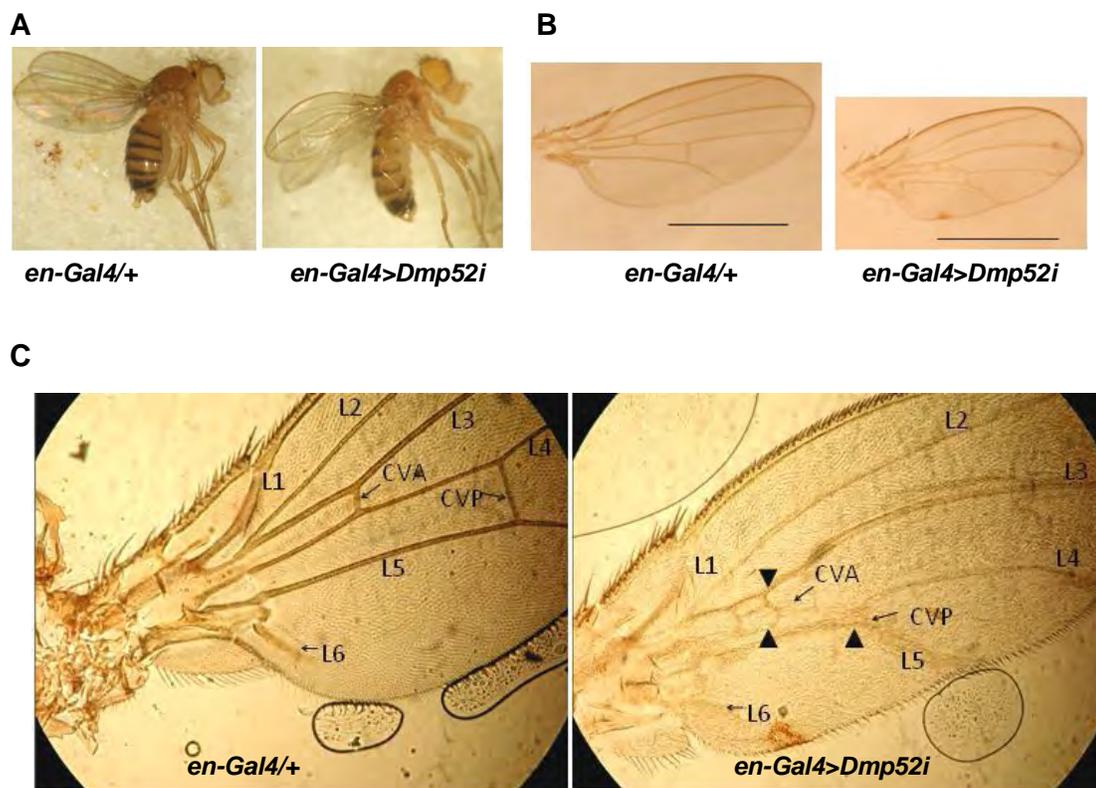


Figura 16. La disminución de los niveles de *Dmp52* con el driver *en-Gal4* produce una reducción en el tamaño y alteración en el patrón de venación del ala. **A.** Adultos y **B.** Alas montadas de organismos *en-Gal4/+* y *en-Gal4>Dmp52i*. La barra representa 1 mm; **C.** Análisis por microscopía de alas control y *en-Gal4>Dmp52i* a un objetivo de 10X. Se observó la formación de venas ectópicas (triángulos negros) y una disminución en el tamaño del ala en comparación con el control *en-Gal4/+*. L1-L6, venas longitudinales 1 a 6; CVP, cross-vena posterior; CVA, cross-vena anterior.

La observación al microscopio de preparaciones de alas de moscas *en-Gal4>Dmp52i* mostró que la disminución en el tamaño del ala ocurrió en toda la estructura y no sólo en el dominio posterior donde normalmente se expresa *engrailed*. Lo anterior sugiere que la reducción en el tamaño del ala es un fenómeno celular no autónomo; es decir, aunque la expresión de *Dmp52i* ocurrió sólo en el dominio posterior del disco de ala, la disminución en el tamaño también se observó en el dominio anterior. Este tipo de fenotipos también se ha observado en reguladores del crecimiento y otras proteínas que incluyen a p53 (Mesquita *et al.*, 2010). No obstante, la disminución en el área del dominio anterior fue mucho menor en proporción con la disminución del dominio posterior (figura 17). Todos estos datos demuestran que las moscas con niveles reducidos de Dmp52 presentaron defectos en el crecimiento así como defectos en la diferenciación de las venas y que la disminución en el crecimiento del ala pudiera ocurrir de manera no autónoma.

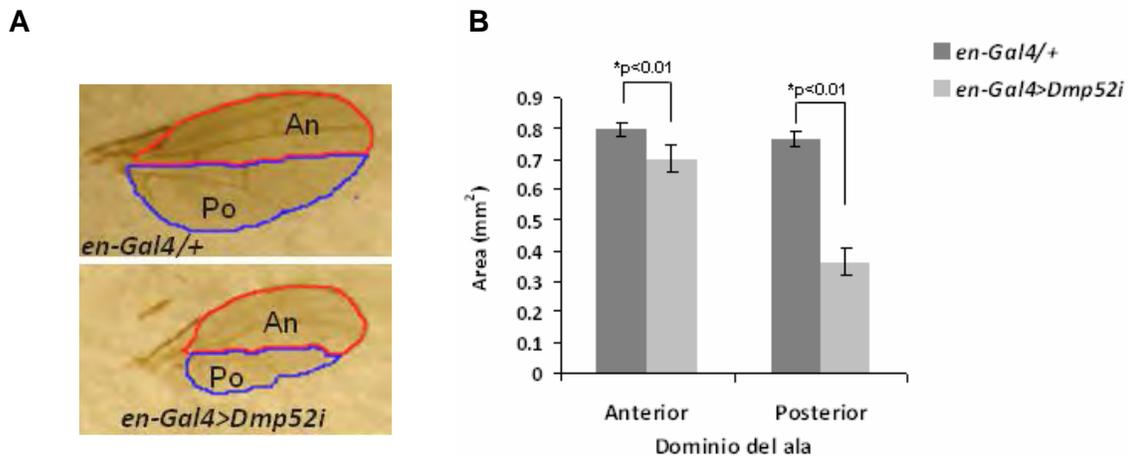


Figura 17. Los defectos en el crecimiento en el ala de moscas *en-Gal4>Dmp52i* son un fenotipo celular no autónomo. A. Esquema de las alas que indican las regiones anterior (An) y posterior (Po) que se analizaron. Las alas están en la misma escala. **B.** Comparación de las áreas de cada región analizada. Se analizaron como mínimo 10 alas de cada genotipo de hembras adultas y como análisis estadístico se utilizó una t-Student de dos colas. Las barras corresponden a la desviación estándar.

Para verificar que los fenotipos observados con los drivers *MS1096* y *en-Gal4* fueron dependientes de la inducción de *Dmp52i* en los dominios del ala, se coexpresó *Gal80^{ts}*, el cual es un inhibidor de la actividad de Gal4 a 25°C. Como se esperaba, se observó que los fenotipos como la reducción en el tamaño del ala y la aparición de venas ectópicas utilizando ambos drivers se revirtieron al coexpresar *Gal80^{ts}* (figura 18A-D). Asimismo, para verificar la disminución de la proteína Dmp52,

Dmp52i se expresó con el driver *Sgs3-Gal4*, el cual se expresa en glándulas salivales. A partir de un extracto de glándulas salivales se confirmó con un western blot que los niveles de Dmp52 disminuyeron mientras que otras subunidades de TFIIH como XPB, CDK7 y p62 no se afectaron mostrando que el dsRNA es específico de Dmp52 (figura 18E).

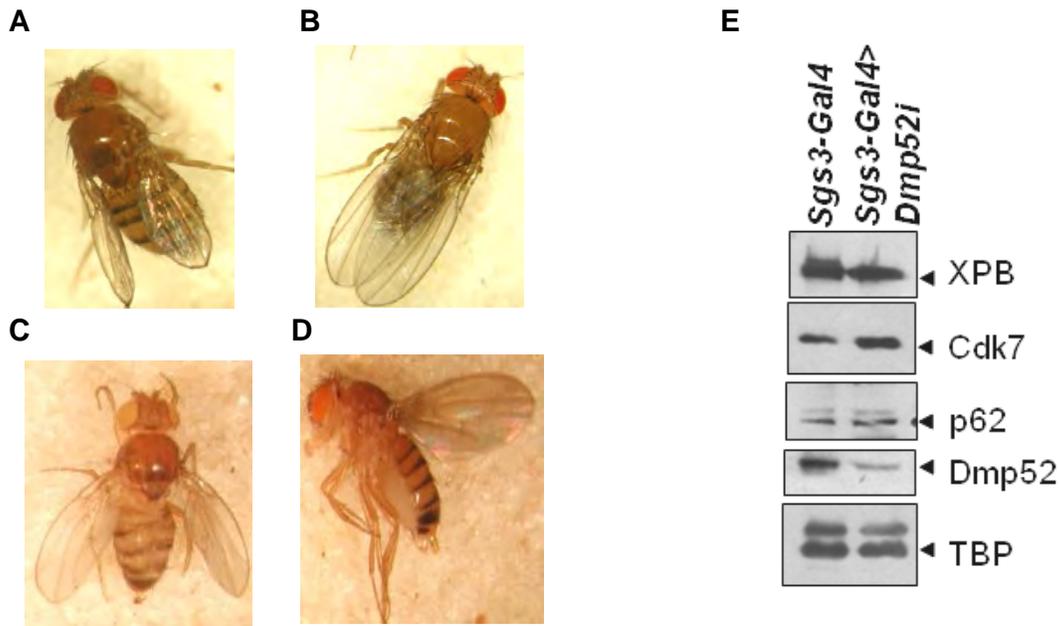


Figura 18. Los fenotipos generados en las alas que expresan *Dmp52i* son revertidos con la coexpresión de *Gal80^{ts}*. Las cruzas se realizaron a 25°C. Genotipos: **A. *MS1096>Dmp52i*. **B.** *MS1096>Dmp52i, Gal80^{ts}*. **C.** *en-Gal4>Dmp52i*. **D.** *en-Gal4>Dmp52i, Gal80^{ts}*. **E.** Western blot de glándulas salivales expresando el dsRNA contra Dmp52 con el driver *Sgs3-Gal4*. El transgén del dsRNA y el driver se encuentran homocigotos (dos copias de cada uno). TBP se utilizó como control de carga.**

7.3 Los defectos generados por la disminución de los niveles de Dmp52 están asociados a la pérdida de función de TFIIH.

Se ha reportado que las helicasas XPD y XPB que forman parte de TFIIH también presentan funciones independientes del holocomplejo. Weber *et al.* (2010) demostró que XPB interacciona físicamente con γ -tubulina y que colocaliza con los centrosomas sugiriendo un posible papel en la mitosis; mientras que Ito *et al.* (2010) purificaron a XPD formando parte de otro complejo que incluye a la proteína MMS19, el cual está implicado en la segregación de los cromosomas y la formación del huso mitótico. Para evaluar si algunos de los fenotipos observados en las moscas que expresan *Dmp52i* pudieran deberse a funciones específicas de Dmp52 pero

independientes de TFIIH, también se evaluaron los fenotipos de moscas expresando un dsRNA diseñado contra la subunidad Dmp34 de TFIIH (*Dmp34i*).

En el caso de *Dmp34i* con el driver *MS1096*, las moscas presentaron alas muy pequeñas y atrofiadas, lo cual no es similar a lo observado en las alas que expresan *Dmp52i*; sin embargo, al modular la temperatura los fenotipos fueron similares sugiriendo que las diferencias a 25°C dependen de la eficiencia de cada dsRNA. Las moscas que expresaron *Dmp52i* y *Dmp34i* a 18°C exhibieron fenotipos menos severos, los cuales son similares entre sí en cuanto a la disminución del tamaño de las alas y las deformaciones que presentan debido a la torción de las mismas, sugiriendo que los fenotipos se deben a la pérdida de función de TFIIH (figura 19A).

Por otro lado, los fenotipos obtenidos con *en-Gal4* al reducir los niveles de Dmp34 o Dmp52 recapitulaban totalmente la disminución del tamaño del ala y la generación de venas ectópicas (figura 19B y C). El fenotipo de crecimiento celular no autónomo observado en moscas *Dmp52i* también se observó en las moscas *Dmp34i* sugiriendo que los fenotipos están asociados a la pérdida de función de TFIIH. Los fenotipos observados al expresar *Dmp52i* y *Dmp34i* con los drivers *MS1096* o *en-Gal4* fueron dependientes de Gal4 ya que al coexpresar *Gal80^{ts}* (inhibidor de Gal4) a 25°C, los defectos se revirtieron al fenotipo silvestre (datos no mostrados).

Considerando que todos los fenotipos fueron consistentes, se dirigió la expresión de cada dsRNA a la región anterior del ojo usando *eyeless-Gal4*. Al expresar *eyeless-Gal4* y una copia de *Dmp52i* no se obtuvieron fenotipos muy evidentes, por lo que para aumentar la eficiencia del dsRNA en el ojo se coexpresó una copia de *Dicer* (*Dcr*). Los fenotipos obtenidos con *Dcr* demostraron que la reducción de los niveles de Dmp52 generó una disminución en el tamaño del ojo. Fenotipos similares se obtuvieron al expresar una copia de *Dmp34i* y una copia de *eyeless-Gal4* (figura 19D) ya que con este dsRNA no fue necesario coexpresar *Dcr*. Cabe mencionar que los fenotipos observados al expresar *Dmp34i* o *Dmp52i* con *eyeless-Gal4* se revirtieron al coexpresar *Gal80^{ts}* (datos no mostrados). Estas evidencias apoyan fuertemente que los fenotipos generados en moscas con niveles reducidos de Dmp52 y Dmp34 están asociados principalmente a la disminución de la función de TFIIH y no debido a efectos específicos de cada subunidad. Además, estos efectos pueden ocurrir en diferentes tejidos y no de manera exclusiva en el ala.

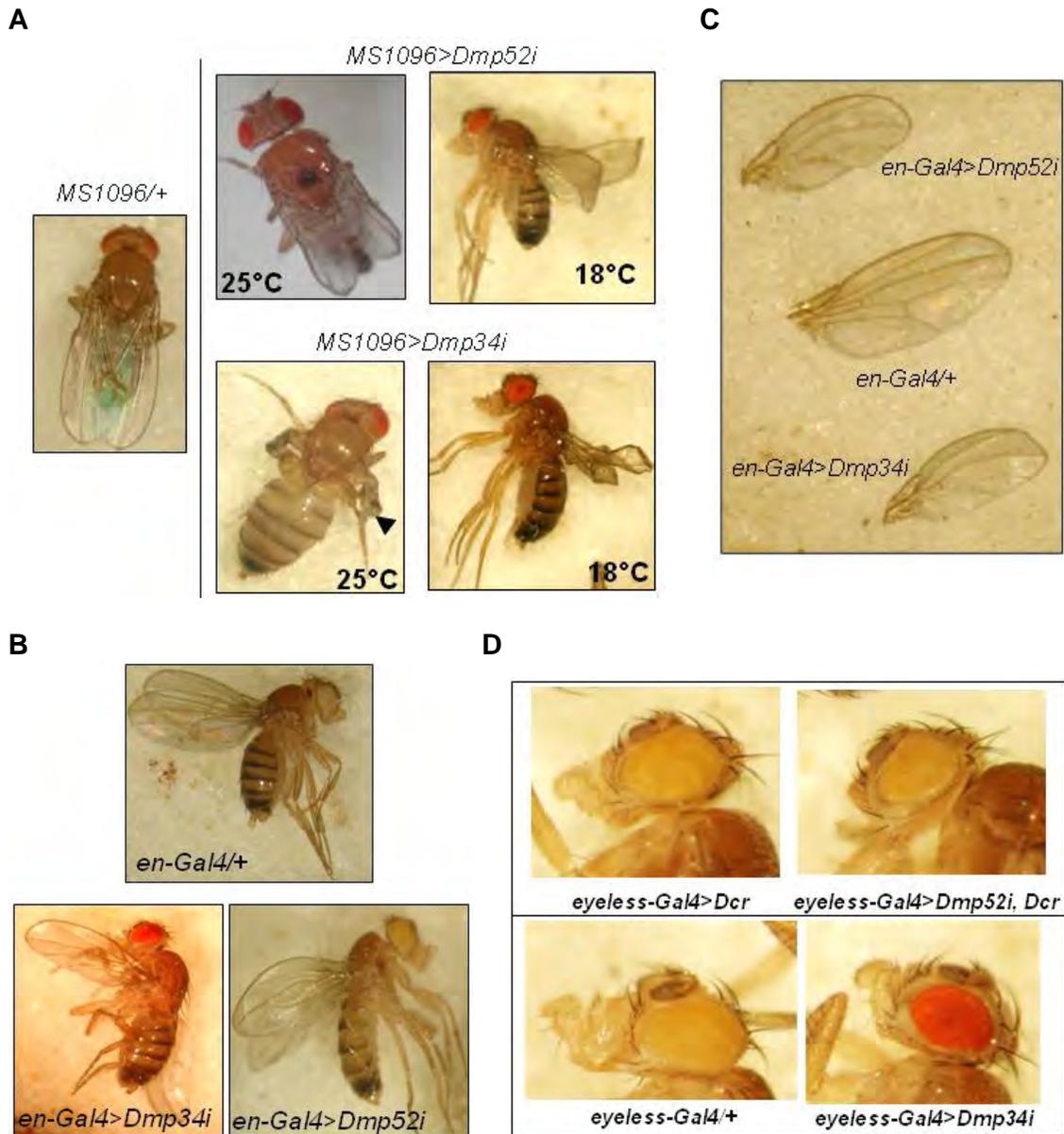


Figura 19. Los defectos generados por la reducción de *Dmp52i* y *Dmp34i* están asociados a la pérdida de función de TFIIH. A. La disminución de los niveles de Dmp34 y Dmp52 generaron fenotipos similares a 18°C con el driver *MS1096*. A 25°C, la eficiencia de *Dmp34i* fue mayor que *Dmp52i* por lo que los fenotipos fueron más severos dando lugar a alas muy atrofiadas. **B.** Moscas que expresan *Dmp34i* o *Dmp52i* con el driver *en-Gal4*. **C.** Comparación del tamaño y los fenotipos en las alas *en-Gal4>Dmp52i* y *en-Gal4>Dmp34i*. Obsérvese que al reducir los niveles de Dmp52 o Dmp34 se recapituló la disminución del tamaño y los defectos en la venación. **D.** La expresión de *Dmp52i* o *Dmp34i* en el ojo con el driver *eyeless-Gal4* provocó una disminución en el tamaño de la retina sugiriendo defectos en el crecimiento.

7.4 La disminución de los niveles de Dmp52 genera apoptosis.

La disminución de los niveles de Dmp52 provocó una reducción en el tamaño del ala de la mosca por lo que para caracterizar los defectos en el crecimiento se

determinó el número de células en el ala utilizando el driver *MS1096*. Considerando <que durante el desarrollo cada célula del disco del ala se diferencia produciendo un solo tricoma o queta por célula (Quijano *et al.*, 2011), se determinó el número de células por unidad de área. Interesantemente, las alas con niveles reducidos de *Dmp52* presentaron un mayor número de células por unidad de área en comparación con los controles, indicando una mayor densidad celular (figura 20A y B). Asimismo, se observó que las quetas de las alas con niveles reducidos de *Dmp52* son más delgadas y su patrón de organización se encuentra desordenado con respecto al control (figura 20A). Nuestras observaciones indican que las células individuales que conforman las alas *MS1096>Dmp52i* son más pequeñas en volumen con respecto a las células del control.

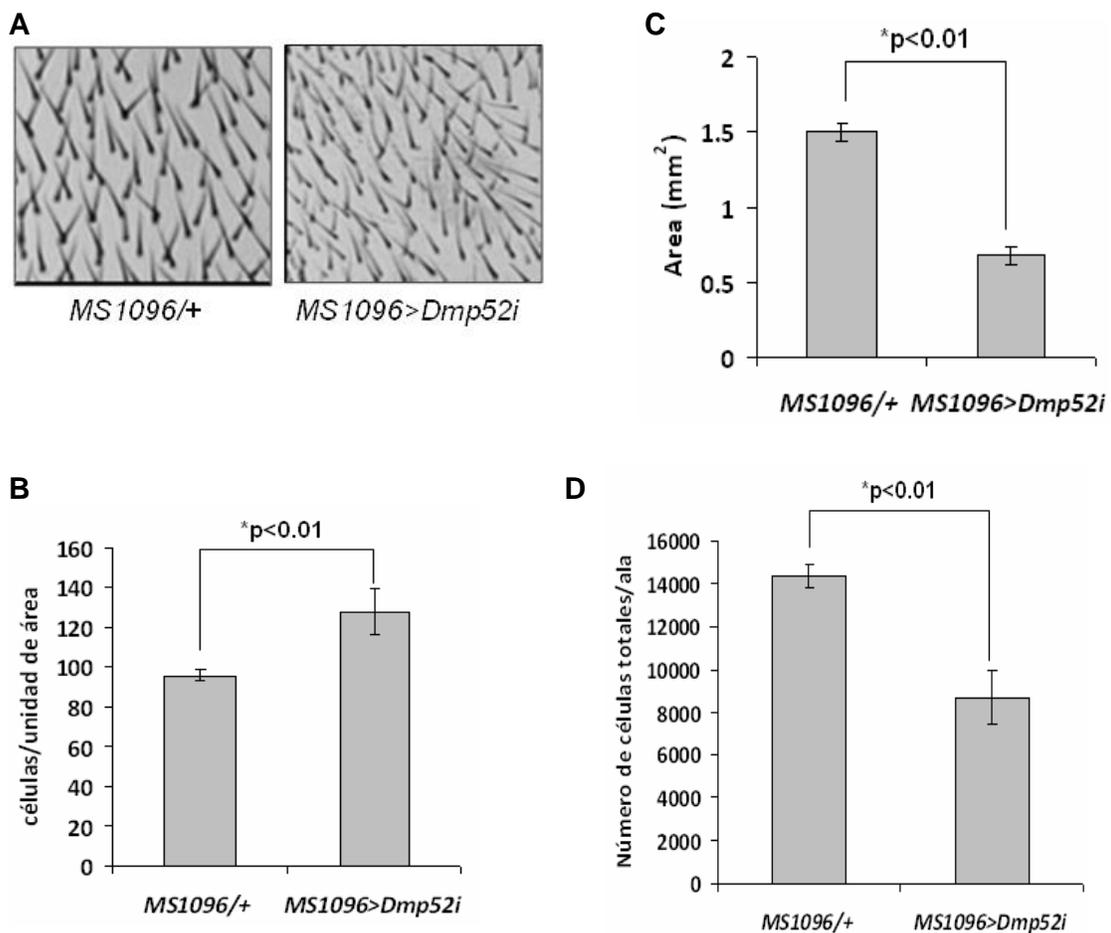


Figura 20. La reducción en el tamaño del ala en moscas *MS1096>Dmp52i* está asociado a una disminución en el número de células totales y una disminución en el tamaño de cada célula. **A.** Las alas montadas *MS1096/+* y *MS1096>Dmp52i* que muestran la densidad celular o número de quetas que conforman el tejido. **B.** Densidad celular determinada por el número de células por unidad de área. **C.** Área total del ala en mm². **D.** Estimación del número de células totales por ala. Para cada genotipo se analizaron 10 alas y como prueba estadística se aplicó una t-Student de dos colas. Las barras corresponden a la desviación estándar.

Por otro lado, las moscas *MS1096>Dmp52i* presentaron una reducción del 55% del área total del ala en comparación con el control y una reducción en el número total de células por ala de aproximadamente el 40% (figura 20C y D). Por lo tanto, estos datos sugieren que la reducción en el tamaño del ala observada en las moscas *MS1096>Dmp52i* se asocia a una disminución en el volumen de cada célula así como en el número de células totales por ala.

Los defectos en el crecimiento observados en las moscas *MS1096>Dmp52i* pueden ser ocasionados por una disminución en la proliferación o un aumento en la apoptosis, o ambos. Para abordar este objetivo, se determinó la incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU) (monitorea el paso de G1 a S), se inmunotñeron los núcleos mitóticos utilizando el marcador de mitosis histona H3 fosforilada en serina 10 (H3Pser10) y para determinar apoptosis se utilizó la técnica de TUNEL. Los discos de ala *MS1096>Dmp52i* presentaron células apoptóticas en el dominio específico de expresión de *MS1096* (figura 21, flecha roja) mientras que en el control no hubo apoptosis; asimismo, los discos no presentaron cambios significativos en la incorporación de BrdU o H3Pser10 indicando que no hay alteraciones en la progresión del ciclo celular en este estadio (figura 21, panel central y derecho), lo cual sugiere que la disminución en el número de células totales por ala podría asociarse a un incremento en la apoptosis en los discos *MS1096>Dmp52i*.

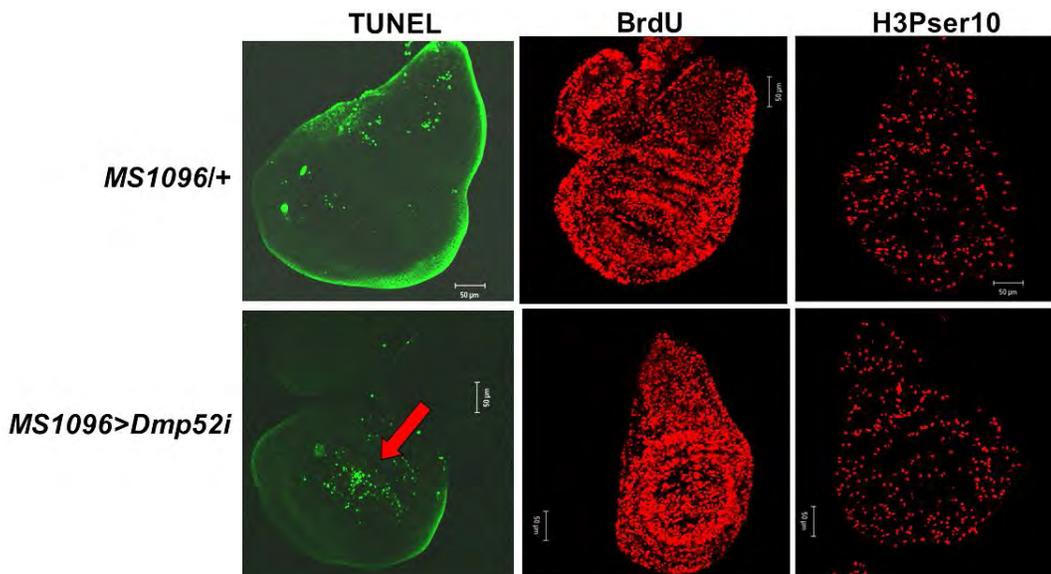


Figura 21. La disminución de los niveles de Dmp52 genera apoptosis en discos imagales de ala. Los discos *MS1096>Dmp52i* presentaron cuerpos apoptóticos en la región de expresión del driver indicando muerte celular (panel izquierdo, indicado con la flecha roja). En el caso de la incorporación de BrdU (panel central) y la inmunotinción con H3Pser10 (panel derecho) no se observó una diferencia en los discos *MS1096>Dmp52i* con respecto al control *MS1096/+*, lo cual sugiere que en este estadio no hay alteración en la progresión del ciclo celular.

7.5 Dmp52 interacciona genéticamente con Dp53 generando deformaciones en el ala y apoptosis masiva.

Considerando que la disminución de los niveles de Dmp52 en el ala generó fenotipos, se tomó como modelo para evaluar la posible interacción con Dp53 utilizando la dominante negativa *GUS-Ctp53DN* (Brodsky *et al.*, 2000). Como resultado, las moscas que expresaron simultáneamente *GUS-Ctp53DN* y *Dmp52i* presentaron un aumento en los defectos morfológicos de las alas sugiriendo que Dp53 interacciona de manera sinérgica con Dmp52 (figura 22, panel superior). Consistentemente, el aumento en los defectos en la morfología del ala también se observaron al expresar un dsRNA específico contra Dp53 (*Dp53i*) (figura 23).

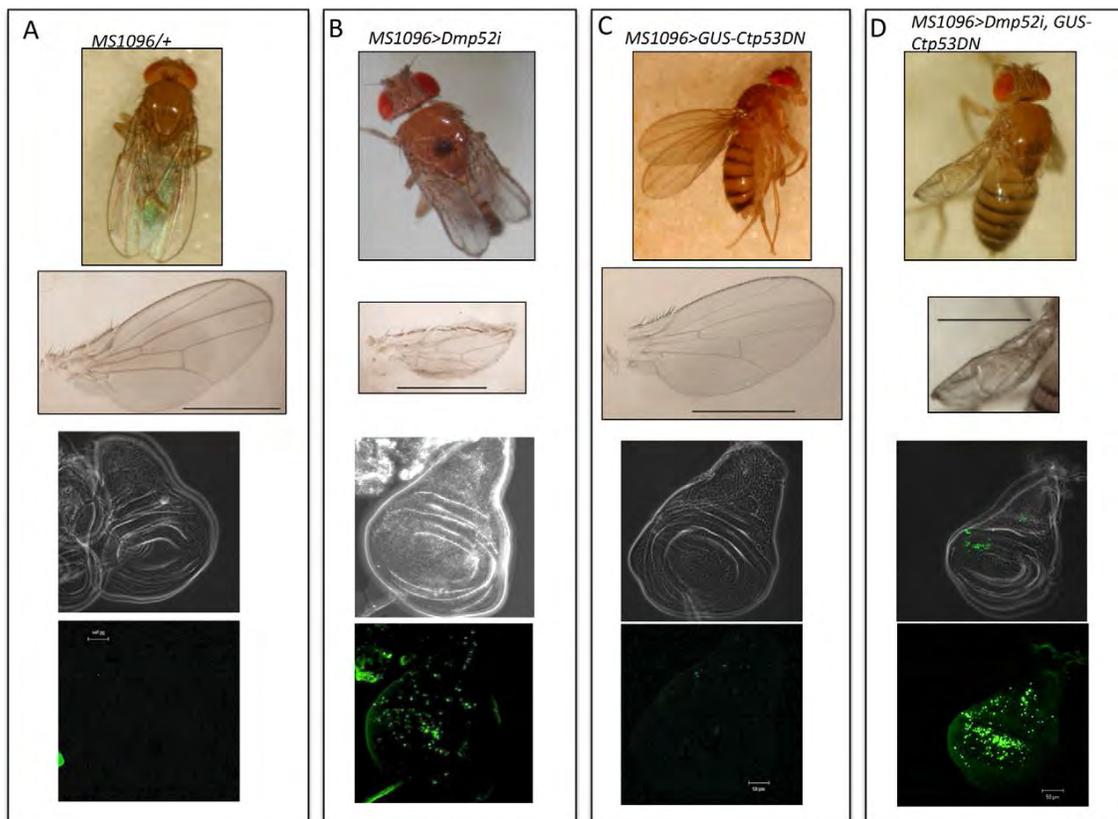


Figura 22. La pérdida de función de Dp53 y Dmp52 genera un aumento en la apoptosis y deformaciones en la morfología del ala. A. Las moscas *MS1096/+* presentaron un fenotipo silvestre en la morfología de las alas así como un número reducido de cuerpos apoptóticos. **B.** Las moscas *MS1096>Dmp52i* mostraron los defectos en el crecimiento y el fenotipo de curvatura, así como varios cuerpos apoptóticos en el dominio correspondiente de la expresión del driver (panel inferior). **C.** La mosca *MS1096>GUS-Ctp53DN* presentó un fenotipo silvestre y unos cuantos cuerpos apoptóticos. **D.** La mosca *MS1096>Dmp52i, GUS-Ctp53DN* mostró un aumento en los defectos morfológicos de las alas que incluyeron ampollas (panel superior), así como un dramático incremento en la apoptosis en la zona de expresión del driver (panel inferior).

Posteriormente se evaluó la apoptosis con el ensayo de TUNEL en los discos que expresaron la dominante negativa de Dp53. Interesantemente, los ensayos de TUNEL mostraron que al coexpresar *GUS-Ctp53DN* en los discos con niveles reducidos de Dmp52, la apoptosis aumentó dramáticamente, lo cual sugiere que la inactivación de Dp53 no suprimió la apoptosis sino que la incrementó cuando los niveles de Dmp52 se redujeron (figura 22, panel inferior). Estos fenotipos se verificaron utilizando la tinción con naranja de acridina y se demostró que la pérdida de función de Dp53 ya sea por la expresión de *GUS-Ctp53DN* o *Dp53i* en un fondo *MS1096>Dmp52i* aumentó dramáticamente la apoptosis (figura 24). Por otro lado, la progresión del ciclo celular monitoreada por la incorporación de BrdU y H3Pser10 no presentó alteraciones en estos genotipos (figura 25).

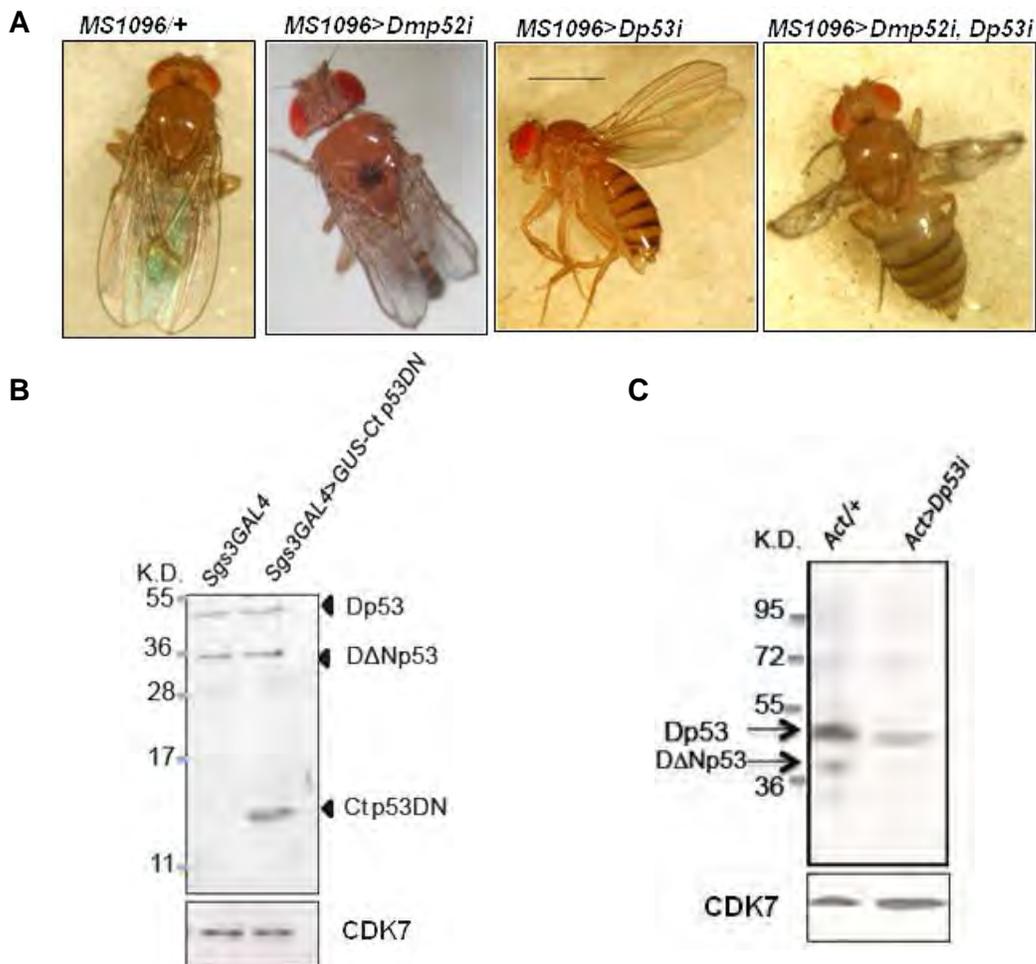


Figura 23. La coexpresión de *Dp53i* aumenta los defectos morfológicos de las alas en un fondo *MS1096>Dmp52i*. **A.** Las moscas coexpresando *Dp53i* en un fondo genético con niveles reducidos en Dmp52 presentaron un aumento en los defectos de las alas. **B.** Western blot de extractos totales de glándulas salivales que expresaron *GUS-Ctp53DN* demostrando la expresión de la proteína transgénica. **C.** Western blot de moscas que expresaron *Dp53i* con el driver ubicuo *Act5C-Gal4* mostrando la disminución de los niveles de las dos isoformas de Dp53.

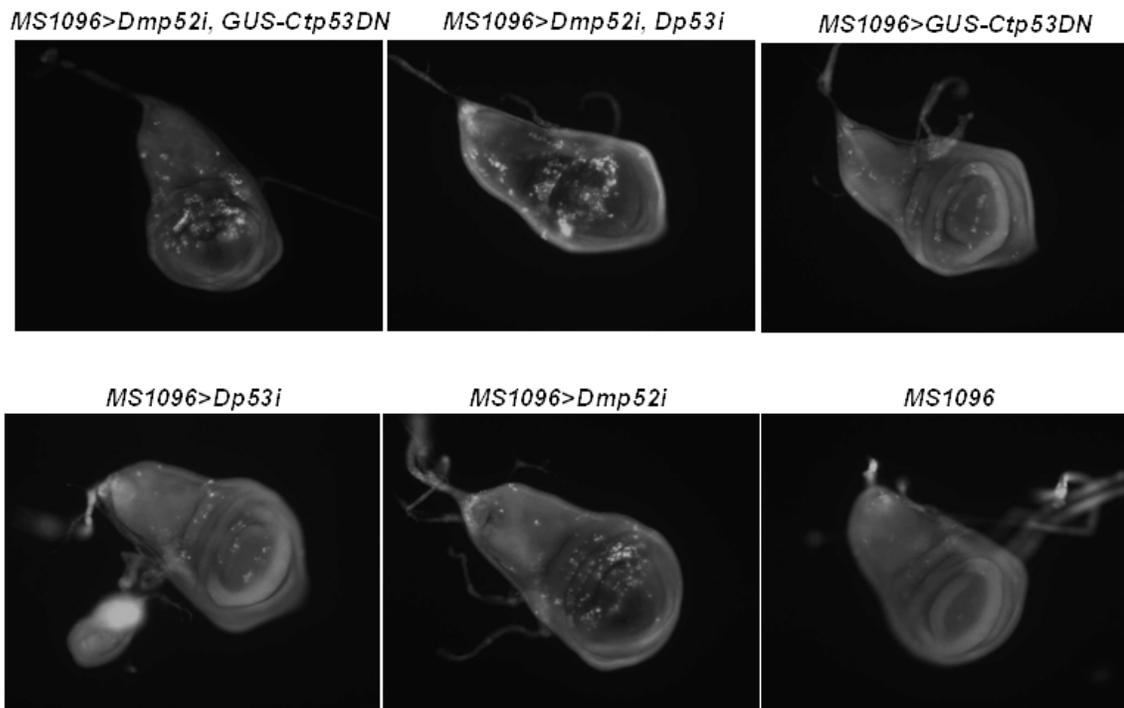


Figura 24. Evaluación de la apoptosis por tinción con naranja de acridina. La disminución de los niveles de Dmp52 generó apoptosis, mientras que la pérdida de función de Dmp52 y Dp53 generó apoptosis masiva en el disco de ala confirmando lo observado a través del ensayo de TUNEL.

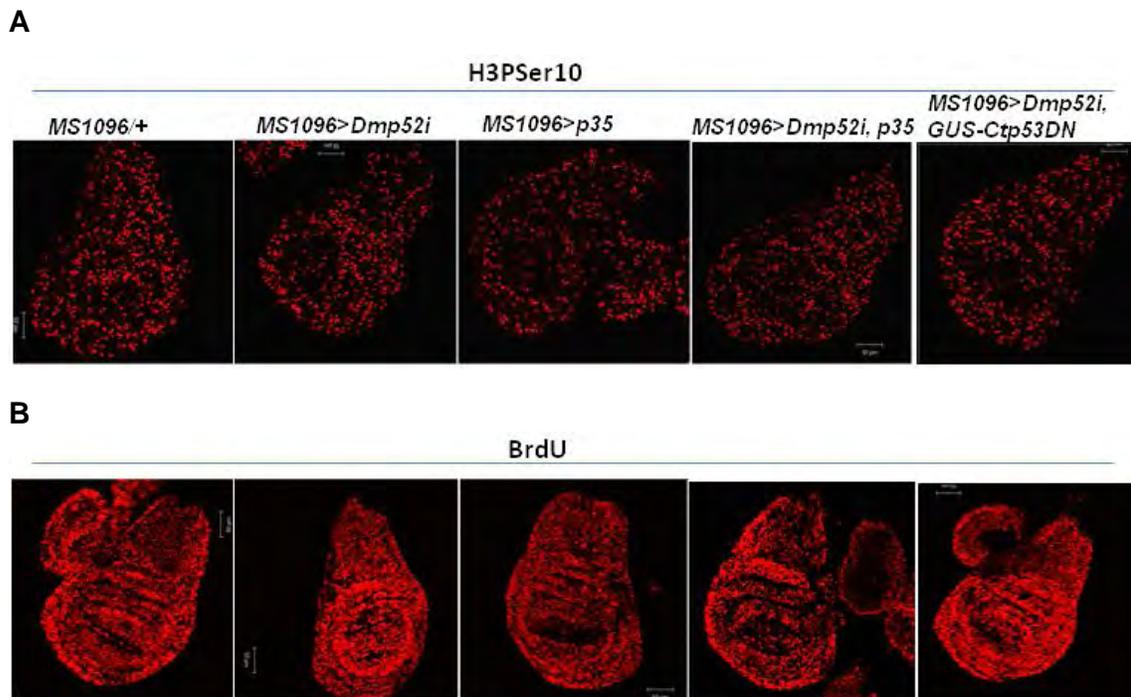


Figura 25. La progresión del ciclo celular no es afectada por la coexpresión de GUS-Ctp53DN o p35 en fondos con niveles reducidos de Dmp52. **A.** Inmunotinción de discos con H3Pser10 monitoreando la entrada a la mitosis. **B.** Incorporación de BrdU indicando la entrada a la fase S. Los genotipos están indicados en el panel superior.

Por otro lado, la coexpresión de *Dmp34i* y *GUS-Ctp53DN* también generó un aumento en la apoptosis comparado con los discos donde sólo se reducen los niveles de *Dmp34* (figura 26), lo cual es consistente con lo observado en los discos con niveles reducidos de *Dmp52* y *Dp53*, y sugiere que la apoptosis masiva generada en los discos de ala coexpresando *GUS-Ctp53DN* están asociados con la pérdida de función de TFIIH.

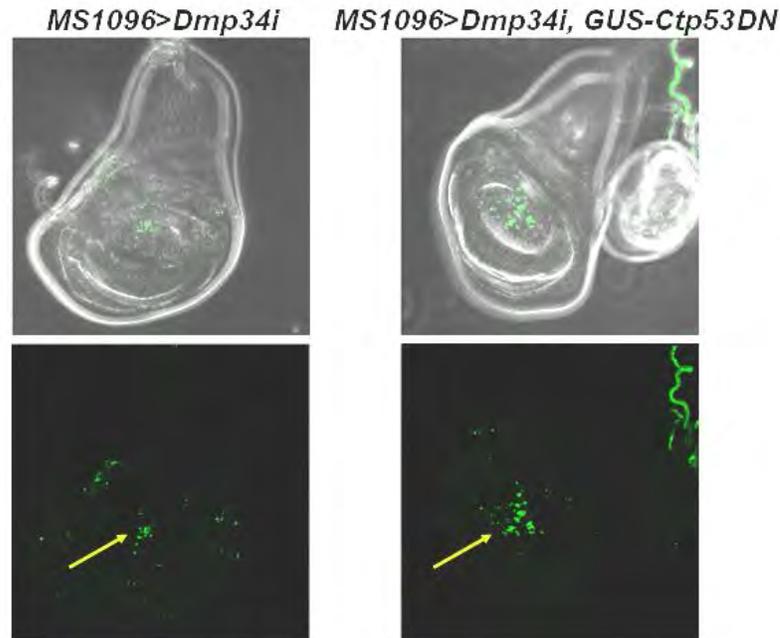


Figura 26. La coexpresión de *GUS-Ctp53DN* y *Dmp34i* genera apoptosis masiva en los discos de ala.

Considerando que la pérdida de función de *Dmp52* y *Dp53* en el ala aumentó los defectos morfológicos y la apoptosis en los discos, se decidió evaluar si estos fenotipos estaban asociados al incremento en la apoptosis. Para lograr este objetivo, se coexpresó la proteína p35, la cual es un inhibidor de las caspasas efectoras *Dcp1* y *Drice* en *D. melanogaster* (Mesquita *et al.*, 2011) en los fondos genéticos de interés. Como se esperaba, la apoptosis inducida en el fondo genético *MS1096>Dmp52i* así como *MS1096>Dmp52i, GUS-Ctp53DN* se suprimió al expresar p35 corroborando que fue dependiente de caspasas. Inesperadamente, aunque la apoptosis se suprimió, la coexpresión de p35 en moscas *MS1096>Dmp52i* generó un aumento en los defectos morfológicos de las alas y otros defectos que consistieron en la aparición de una ampolla en la región central del ala así como crecimientos anormales en los bordes (figura 27A, flecha negra). Estos fenotipos no fueron dependientes de alteraciones en el ciclo celular ya que las

inmuntinciones no mostraron diferencias entre genotipos (figura 25). Todos estos datos sugieren que cuando Dmp52, Dp53 o la apoptosis no funcionan aumentan los defectos morfológicos en las alas, indicando que en estas condiciones de estrés los puntos de control no están respondiendo de manera adecuada para evitar el daño en el tejido, por lo que es posible que los defectos se asocien al daño acumulado en las células, lo cual ocasiona defectos en la morfogénesis del ala.

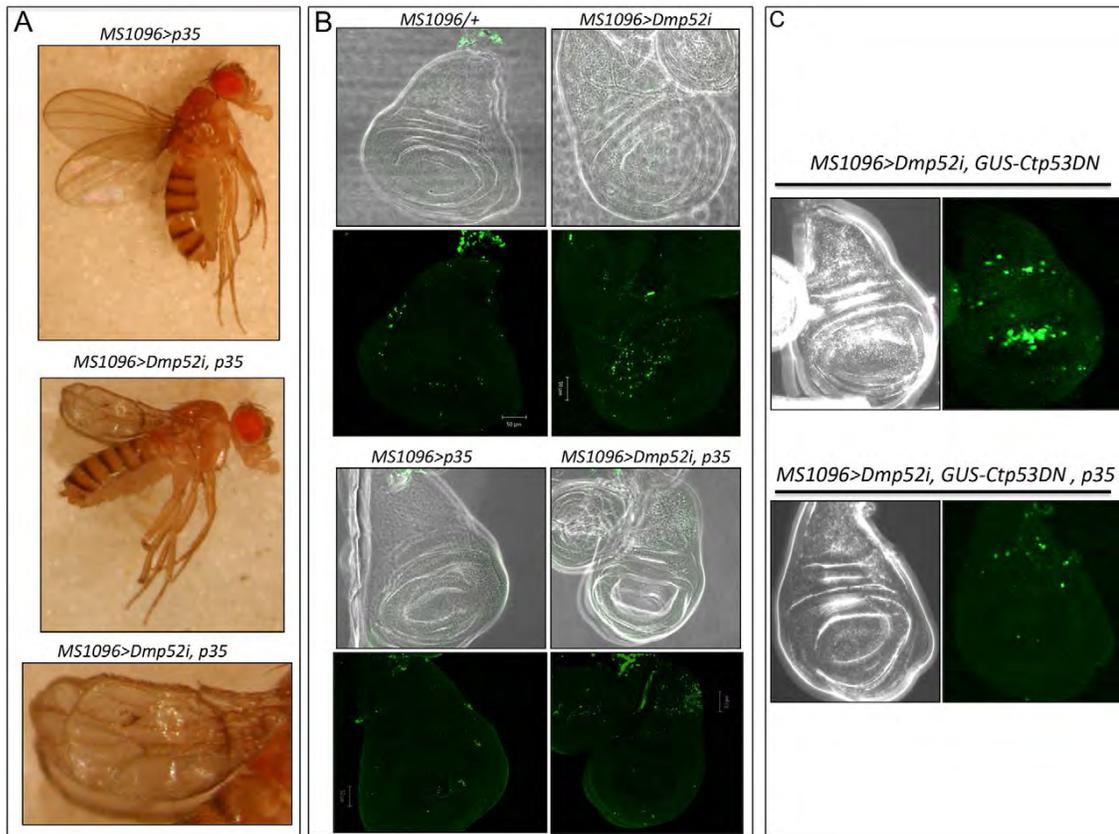


Figura 27. La coexpresión de p35 suprime la apoptosis indicando que es dependiente de caspasas. A. La expresión de p35 en el ala no produjo fenotipos en el ala (panel superior); sin embargo, al coexpresar p35 en un fondo genético con niveles reducidos de Dmp52 se generó una ampolla (panel central) así como crecimientos anormales (panel inferior, indicado por la flecha). B. Ensayo de TUNEL demostrando que la apoptosis generada en los discos *MS1096>Dmp52i* fue dependiente de caspasas. C. La apoptosis masiva inducida en los discos *MS1096>Dmp52i, GUS-Ctp53DN* fue dependiente de caspasas. Los cuerpos apoptóticos desaparecieron (panel inferior) al coexpresar p35 comparado con *MS1096>Dmp52i, GUS-Ctp53DN* (panel superior).

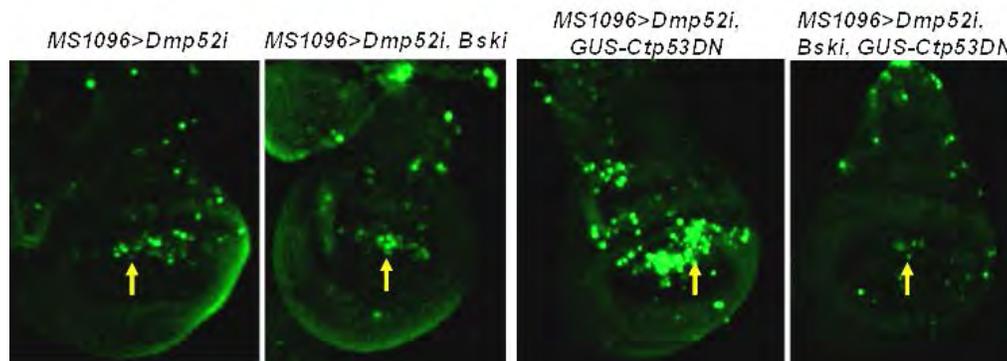
7.6 La apoptosis masiva independiente de Dp53 es inducida por JNK.

En *Drosophila* se ha demostrado que JNK (Basket en *Drosophila*) al igual que Dp53 se activa en respuesta al daño al DNA activando la transcripción de genes proapoptóticos. Incluso se ha reportado que establecen un sistema de

retroalimentación que amplifica la señal inicial de la respuesta apoptótica (Sheklov y Morata, 2011). No obstante, la activación de JNK también ocurre en respuesta a DNA dañado inducido por IR en fondos mutantes de Dp53 (McNamee *et al.*, 2009). Tomando en cuenta que la apoptosis en el genotipo *MS1096>Dmp52i*, *GUS-Ctp53DN* es independiente de Dp53 y dependiente de caspasas, se evaluó si esta apoptosis podría ser dependiente de Basket utilizando un dsRNA específico (*Bski*).

La expresión de *Bski* así como la coexpresión de *Bski* y *GUS-Ctp53DN* con el driver *MS1096* no generaron fenotipos en las alas ni apoptosis (datos no mostrados). En los discos coexpresando *Dmp52i* y *Bski* se observó apoptosis de manera muy similar a los discos *MS1096>Dmp52i* sugiriendo que la apoptosis podría ser independiente de JNK. No obstante, las inmunotinciones de P-JNK en discos *MS1096>Dmp52i* revelaron que la fosforilación de JNK ocurrió ligeramente sugiriendo que podría participar en la apoptosis aunque no es la única vía que se activó (figura 28A-B).

A



B

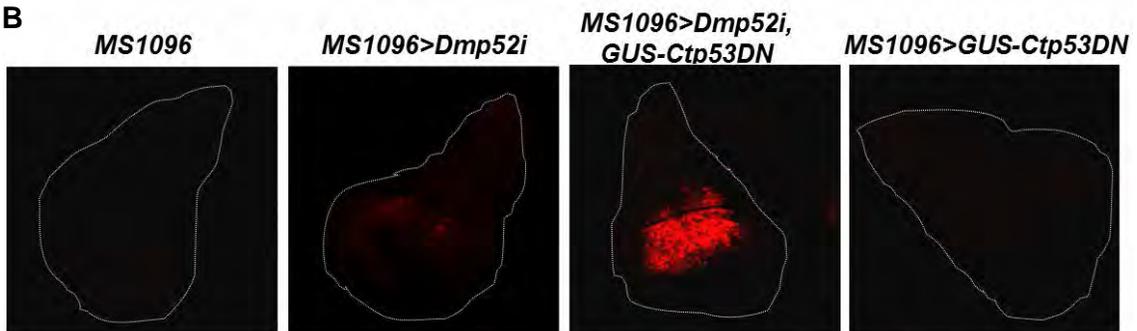


Figura 28. La apoptosis masiva generada en los discos con pérdida de función de Dmp52 y Dp53 es dependiente de JNK. A. Ensayo de TUNEL. Los discos con niveles reducidos de Dmp52 y JNK mostraron cuerpos apoptóticos de manera muy similar a los discos con deficiencias sólo en Dmp52 (indicado por las flechas amarillas). La pérdida de función de Dmp52 y Dp53 generó un aumento en la apoptosis, la cual fue suprimida al coexpresar el dsRNA contra JNK (*Bski*), sugiriendo que la apoptosis es dependiente de JNK. **B.** Inmunotinciones de P-JNK en discos de ala. En los discos con niveles reducidos de Dmp52 se observó una ligera inducción de P-JNK comparada con los controles; sin embargo, en el disco con niveles reducidos en Dmp52 y que coexpresan GUS-Ctp53DN, P-JNK se indujo drásticamente.

En contraste con los resultados anteriores, el ensayo de TUNEL en discos con reducción de los niveles de JNK, Dmp52 y Dp53 mostraron una supresión casi total de la apoptosis sugiriendo que la apoptosis masiva generada en los discos *MS1096>Dmp52i*, *GUS-Ctp53DN* es dependiente de la vía de JNK (figura 28A). Las inmunotinciones corroboraron que se indujo la fosforilación de JNK drásticamente en el genotipo *MS1096>Dmp52i*, *GUS-Ctp53DN* (figura 28B). En conclusión, los fenotipos apoptóticos observados en los discos con pérdida de función de Dmp52 y Dp53 son dependientes de JNK; mientras que en los discos con niveles reducidos de Dmp52 la apoptosis no es totalmente dependiente de JNK ya que al reducir los niveles de la proteína la apoptosis no se suprimió indicando que existen otras vías que se activan (figura 29).

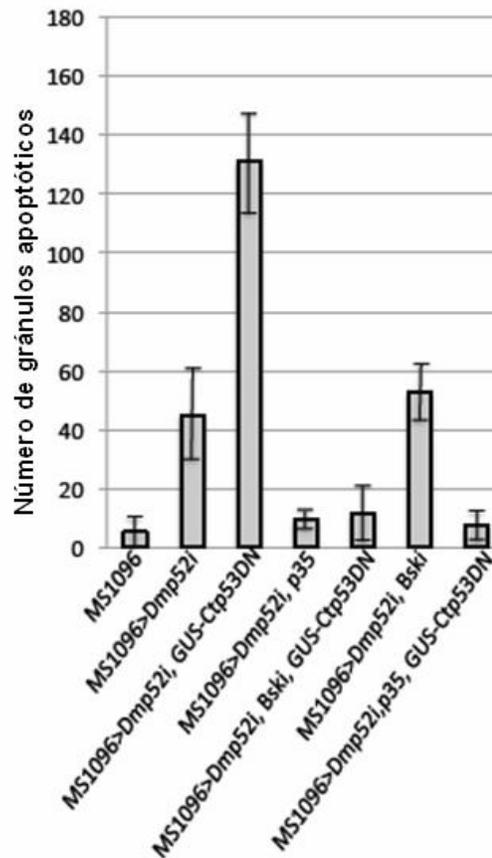
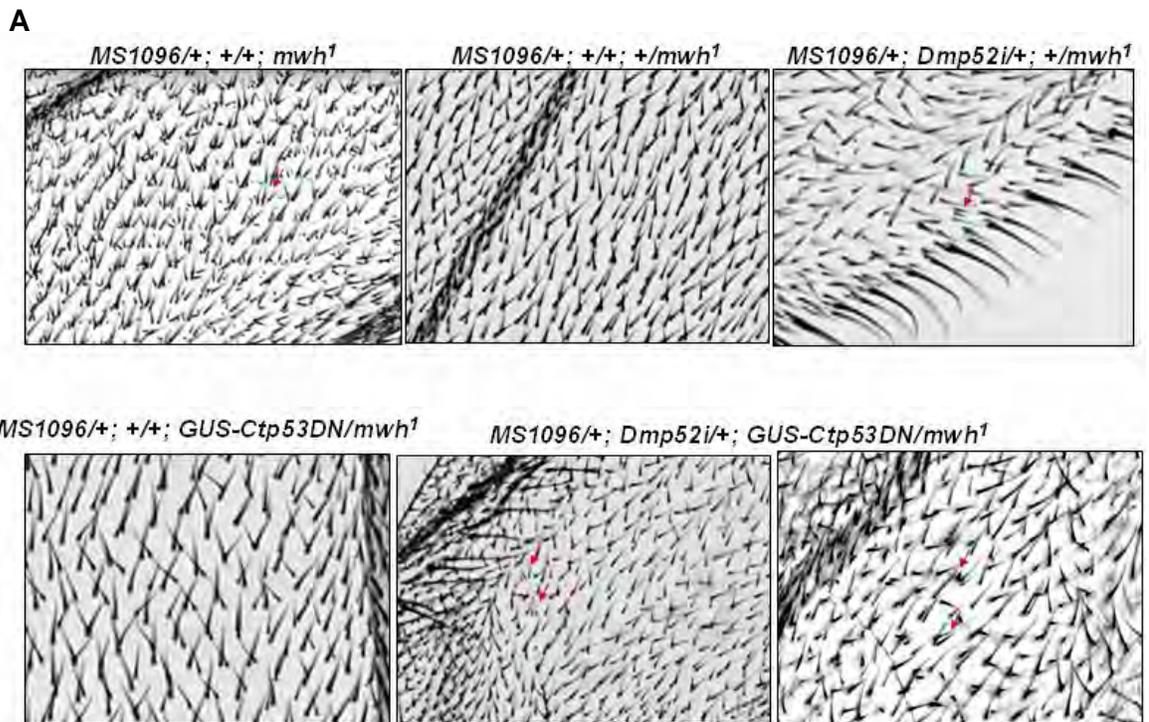


Figura 29. Cuantificación de los gránulos apoptóticos observados en los genotipos analizados. La apoptosis inducida por la reducción de Dmp52 y Dp53 fue dependiente de JNK (*Bsk*), mientras que la apoptosis en los discos con niveles reducidos sólo de Dmp52 no fue totalmente dependiente de JNK. En ambos casos, la apoptosis observada fue dependiente de caspasas. Para la cuantificación, n=3 discos de cada genotipo.

7.7 La pérdida de función de Dmp52 y Dp53 incrementa la inestabilidad cromosomal.

Como se demostró anteriormente, la pérdida de función de Dmp52 y Dp53 generó apoptosis masiva. Considerando que Dmp52 y Dp53 participan en vías de reparación es posible que el aumento en la apoptosis se origine debido al aumento de DNA dañado sin reparar. Con el objetivo de determinar si el aumento en la apoptosis ocurre por un incremento en la inestabilidad cromosomal se utilizó el ensayo de pérdida de heterocigosidad (LOH), donde el marcador recesivo *mwh*¹ (*multiple wing hairs*) en homocigosis presenta el fenotipo de múltiples tricomas en cada célula (figura 30A); este fenotipo se manifiesta en aquellas células aneuploides que son heterocigas para el marcador pero que han perdido el alelo silvestre debido a rearrreglos cromosomales. Como se observa en la figura 30B, las alas de moscas *MS1096>Dmp52i* presentaron clonas *mwh*¹, las cuales se incrementaron significativamente con la pérdida de función de Dp53 indicando un aumento en la inestabilidad cromosomal.



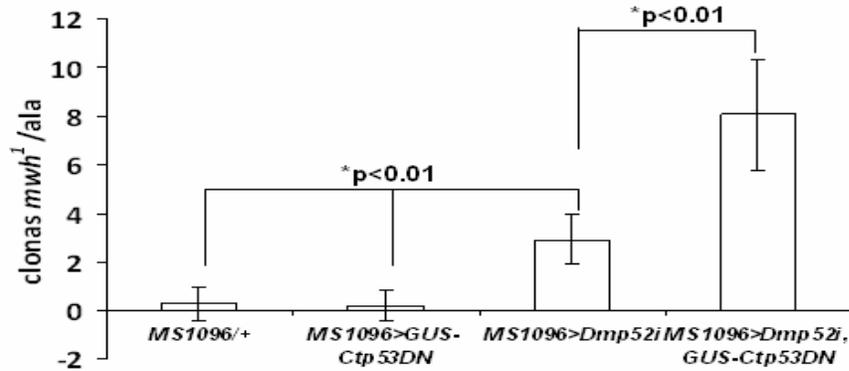
B

Figura 30. Las moscas con niveles reducidos de Dmp52 y Dp53 presentan inestabilidad cromosomal. A. Preparaciones de alas de los diferentes genotipos mostrando las clonas *mwh*¹ (flechas rojas). B. Cuantificación de clonas *mwh*¹ de los genotipos analizados. Para este ensayo se consideraron mínimo 15 alas y como análisis estadístico se utilizó una prueba de Chi cuadrada χ^2 . Las barras representan la desviación estándar.

El aumento de la inestabilidad cromosomal puede generarse debido a la acumulación de DNA dañado en la célula. Para evaluar esta posibilidad se decidió irradiar los discos de ala con UV para inducir daño y determinar los niveles de apoptosis después de la exposición. Como se observa en la figura 31, la apoptosis aumentó en los discos irradiados *MS1096>Dmp52i; GUS-Ctp53DN* comparados con los no irradiados, lo cual sugiere que el daño inducido por UV no está siendo reparado, lo cual incrementó la inestabilidad cromosomal y por tal aumenta la apoptosis.

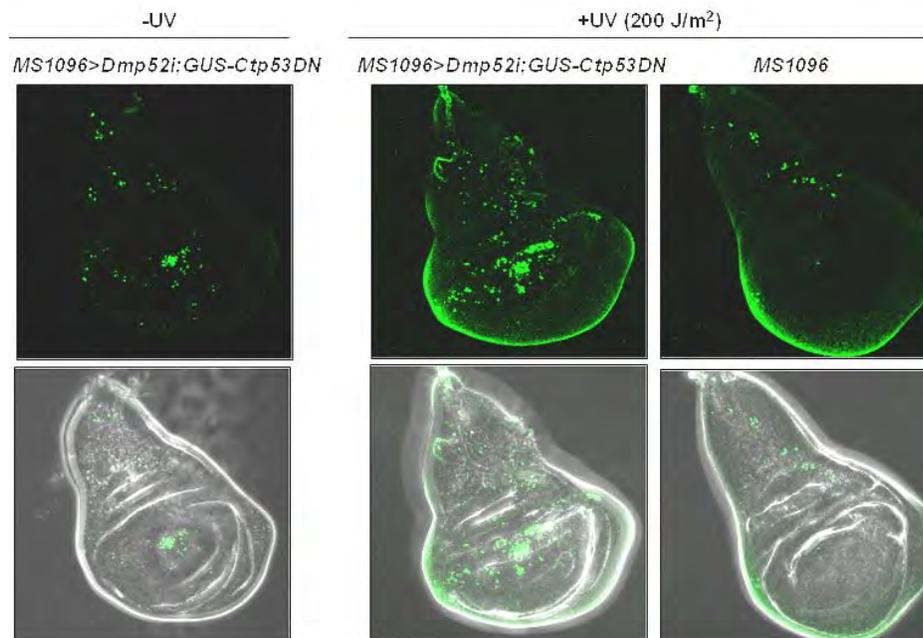


Figura 31. La irradiación con UV aumenta la apoptosis en discos con niveles reducidos de Dmp52 y Dp53. Ensayo de TUNEL (Panel superior). Contraste de fases (Panel inferior).

7.8 La incubación con triptolide fenocopia la apoptosis inducida en moscas *MS1096>Dmp52i, GUS-Ctp53DN*

El triptolide (TPL) es un diterpeno triepóxido derivado de la planta *Tripterygium wilfordii*, comúnmente utilizada en la medicina tradicional china como un potente antiinflamatorio, antiproliferativo y proapoptótico, utilizado en ensayos clínicos para combatir el cáncer. Interesantemente, otros trabajos han demostrado que el mecanismo de acción del TPL consiste en inducir apoptosis en las células cancerosas (Liu, 2011). Recientemente, se demostró que el TPL específicamente inhibe la actividad ATPasa de la subunidad XPB de TFIIH, atribuyéndole todas sus propiedades farmacológicas (Titov *et al.*, 2011). Con base en estos reportes, se decidió evaluar si era posible fenocopiar farmacológicamente la apoptosis masiva observada en los discos *MS1096>Dmp52i, GUS-Ctp53DN* al incubar discos *MS1096>GUS-Ctp53DN* con la droga TPL. La incubación de discos silvestres de *Ore R* a 3, 6 y 10 h utilizando una concentración de 100 μM de TPL mostró que a partir de las 3 h de incubación, los discos incubados con TPL exhibieron un incremento en la apoptosis con respecto a los controles. Asimismo, se observó que el incremento en la apoptosis fue dependiente del tiempo incubación ya que a tiempos mayores de incubación la apoptosis se incrementó notablemente (figura 32).

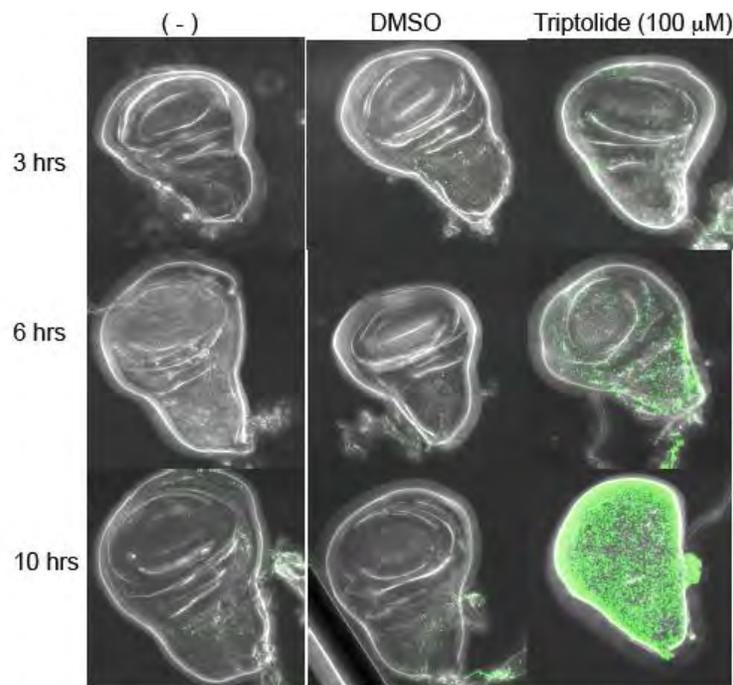


Figura 32. La incubación con triptolide induce apoptosis en discos imagales de ala. La apoptosis se generó a partir de las 3 h de incubación con TPL a una concentración de 100 μM y aumenta considerablemente a las 6 y 10 h. Obsérvese que la apoptosis fue inducida por la incubación con TPL ya que los controles de incubación sólo con medio y el vehículo (DMSO) no indujeron apoptosis incluso hasta las 10 h.

Posteriormente, se realizaron ensayos incubando durante 3 h con TPL discos de varios genotipos. Como se esperaba, los ensayos de TUNEL revelaron que en la incubación de discos control *MS1096/+* se generó apoptosis de manera similar a los discos expresando *Dmp52i* con el driver *MS1096* (figura 33, panel superior). Interesantemente, la incubación de discos sobreexpresando *GUS-Ctp53DN* mostraron apoptosis masiva específicamente en la región de expresión del driver *MS1096*, lo cual es consistente con lo observado en los discos con pérdida de función de *Dmp52* y *Dp53* (figura 33, panel central). Por otro lado, la apoptosis observada en los discos *MS1096>GUS-Ctp53DN* incubados con TPL fue reducida al coexpresar *Bski* siendo consistente con lo observado en discos con niveles reducidos de *Dmp52*, *Dp53* y *JNK* simultáneamente (figura 33, panel inferior). Todos estos datos demuestran que la incubación con TPL fenocopia todos los fenotipos observados anteriormente al reducir los niveles de *Dmp52*, *Dp53* y *JNK*, y además apoya que las propiedades farmacológicas del TPL están asociadas a la inhibición de XPB (Titov *et al.*, 2011).

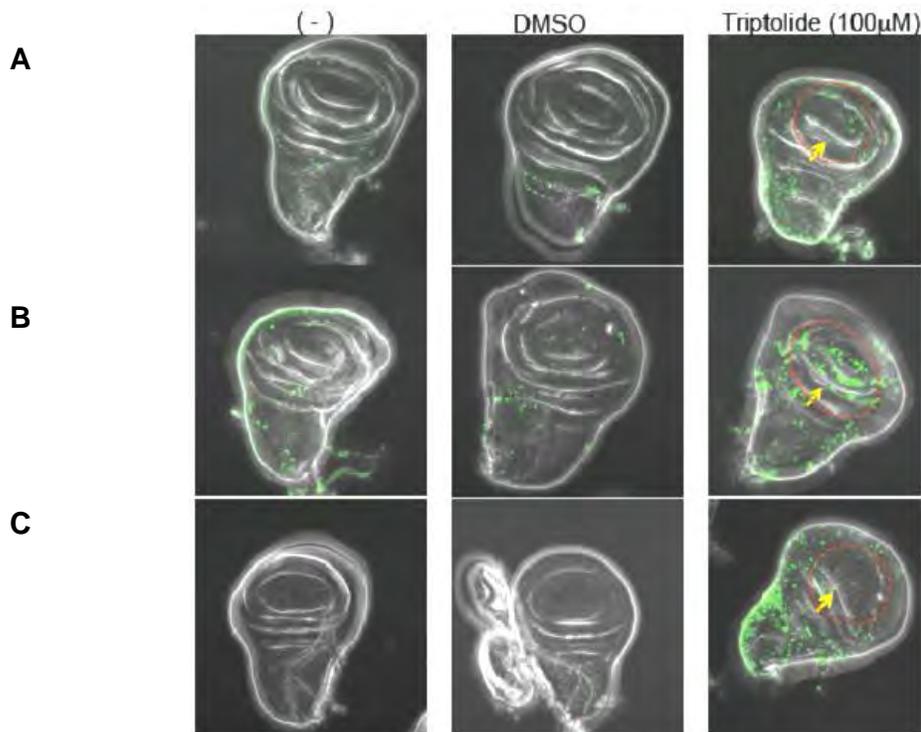


Figura 33. El triptolide fenocopia los fenotipos apoptóticos observados en los discos de ala con niveles reducidos de *Dmp52*. **A.** *MS1096/+*. El triptolide indujo apoptosis de manera similar a los discos con niveles reducidos de *Dmp52*. **B.** *MS1096>GUS-Ctp53DN*. Los ensayos de TUNEL revelaron que el TPL fenocopió la apoptosis masiva en discos con pérdida de función de *Dp53*. **C.** *MS1096>GUS-Ctp53DN, Bski*. La coexpresión de *Bski* en fondos expresando *GUS-Ctp53DN* provocó una reducción en el número de cuerpos apoptóticos en la región de expresión del driver *MS1096* confirmando que la apoptosis en discos con pérdida de función de *Dp53* y tratados con TPL fue dependiente de *JNK*. El círculo rojo indica el dominio de expresión del driver *MS1096* y la flecha el sitio donde se observó principalmente la apoptosis.

VIII. DISCUSIÓN

TFIIH está involucrado en al menos 3 procesos: la transcripción mediada por la RNAPol I y II, reparación del DNA por NER y el control del ciclo celular, por lo que la pérdida de función de TFIIH provoca una condición de estrés general en la célula afectando la supervivencia.

8.1. Los defectos en el crecimiento en las moscas con niveles reducidos de Dmp52

La disminución de los niveles de TFIIH en el ala de *Drosophila* generó alas pequeñas sugiriendo defectos en el crecimiento. Estos fenotipos coinciden con lo reportado para clonas somáticas en el ojo y en organismos mutantes de Dmp52, los cuales presentaron defectos en el crecimiento (Fregoso *et al.*, 2007; Matsuno *et al.*, 2007). Este tipo de defectos se conoce como *minute* y se han asociado a la reducción global en la transcripción y/o traducción y entre los genes asociados a este fenotipo se encuentran genes ribosomales, reguladores del crecimiento y genes involucrados en la reparación (Montagne *et al.*, 1999; Cui y Di Mario, 2007; Fregoso *et al.*, 2007). Asimismo, los defectos como la curvatura del ala debido al defecto en el crecimiento en las moscas *MS1096>Dmp52i* son consistentes con lo encontrado en moscas que expresan un dsRNA contra Dmp8 y Dmp18, otras subunidades que forman parte e interaccionan con TFIIH, respectivamente (Herrera-Cruz *et al.*, 2012).

Los defectos en el crecimiento de las alas con niveles reducidos de Dmp52 están ligados a una reducción en el número de células totales así como a una reducción en el volumen de cada célula. La reducción del volumen de cada célula se ha observado en varios reguladores del crecimiento como en la sobreexpresión del regulador negativo *foxo* así como en mutantes en S6K (Montagne *et al.*, 1999; Kramer *et al.*, 2003), lo cual puede sugerir que las vías de crecimiento que controlan el tamaño y el número de células se encuentra afectados en las moscas deficientes en Dmp52.

La pérdida de células en las alas no fue resultado de defectos en la proliferación celular sino a un aumento en la apoptosis en el disco, lo cual podría explicar la reducción en el número de células totales del ala. Este dato es consistente con lo reportado en mutantes *haywire* (XPB) donde los discos de ala de mutantes heteroalélicas mostraron apoptosis (Merino *et al.*, 2002). La inducción de la apoptosis podría estar relacionada a la transcripción general reducida ya que se ha

demostrado que provoca apoptosis (Andera y Wasylik, 1997) así como al daño ocasionado por estrés genotóxico (Meek, 2004). Se sabe que la inhibición farmacológica de la RNAPol I o la RNAPol II también puede inducir apoptosis dependiente de p53 o incluso autofagia (Ljungman *et al.*, 1999; Bywater *et al.*, 2012).

8.2 La inducción de apoptosis e inestabilidad cromosomal

La apoptosis es un proceso complejo y los estímulos así como la señalización que activa este proceso es dependiente del contexto. En trabajos previos se ha demostrado que la apoptosis inducida por la sobreexpresión de D Δ Np53 requiere de TFIIH funcional (Merino *et al.*, 2002). Sin embargo, en las moscas con niveles reducidos de Dmp52, la apoptosis se sigue observando e incluso se aumenta drásticamente cuando se pierde la función de Dp53 en este fondo, siendo totalmente dependiente de JNK (figura 28). Sin embargo, es importante mencionar que la expresión de *GUS-Ctp53DN* o *Dp53i* utilizados en este trabajo afectan ambas isoformas de Dp53, por lo que no es posible discernir cuales de los efectos observados en los discos corresponden a cada isoforma.

En la mosca, se sabe que Dp53 y JNK son factores que inducen apoptosis en diferentes situaciones de estrés e incluso se ha sugerido que establecen un circuito de retroalimentación (Sheklov y Morata, 2011). Sin embargo, otros trabajos han demostrado que las vías apoptóticas activadas por JNK o Dp53 funcionan como vías independientes que pueden activarse en diferentes contextos. La sobreexpresión del supresor tumoral LKB1 o la proteína ZBP-89 generan apoptosis dependiente de JNK pero independiente de Dp53, sugiriendo un papel importante de JNK como activador de la apoptosis (Bai *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2006). Incluso, se sabe que las sirtuinas pueden inducir apoptosis a través de la vía de JNK de manera independiente de p53 (Griswold *et al.*, 2008). En este trabajo se demostró que la apoptosis inducida en los discos de ala con niveles reducidos de Dmp52 y Dp53 es dependiente de JNK. Estos resultados son consistentes con lo observado en discos sometidos a IR que activan la apoptosis dependiente de JNK en ausencia de Dp53 (McNamee y Brodsky, 2009). En este reporte, la exposición a IR de discos deficientes en Dp53 y Chk1 (*Grapes* en *Drosophila*) indujo la activación de la apoptosis dependiente de JNK como una respuesta para eliminar células dañadas. Estas células se volvieron aneuploides debido a las aberraciones cromosomales ocasionadas por IR y por la ausencia del punto de control regulado por Chk1, que se encuentra inactivo. Otros

reportes también han demostrado que la aneuploidía induce apoptosis independiente de p53 pero que se requiere de JNK (Dekanty *et al.*, 2012).

La disminución de los niveles de Dmp52 indujo la fosforilación de JNK en bajos niveles con respecto a los controles; sin embargo, la apoptosis no es totalmente dependiente de JNK, ya que en los discos con niveles reducidos de Dmp52 y JNK aún se observaron cuerpos apoptóticos. Lo anterior nos sugiere que la activación de la apoptosis no es totalmente dependiente de JNK cuando TFIIH es deficiente, probablemente debido a que el programa apoptótico aún puede activarse por Dp53. Sin embargo, cuando las funciones de Dp53 y TFIIH se encuentran afectadas, la vía de JNK es sobre-activada para inducir apoptosis. Esta situación puede ser similar a lo observado en los discos deficientes en Dp53 y Chk1, donde la apoptosis principalmente se induce por DNA dañado generado por IR; la apoptosis inducida en los discos deficientes de Dmp52 puede ser resultado de la inestabilidad cromosomal generada por las funciones comprometidas de TFIIH. Esta suposición se apoya en la demostración de que los discos con niveles reducidos de Dmp52 mostraron aneuploidías utilizando el ensayo de pérdida de heterocigosidad así como también se ha reportado en mutantes puntuales de Dmp52 (Fregoso *et al.*, 2007; figura 30). Dado que TFIIH es un complejo que participa en la reparación y control del ciclo celular, es posible que los puntos de control no estén completamente operacionales dando lugar a inestabilidad genómica, por lo que esta condición podría ser equivalente a la generación de DNA dañado por IR. Otros reportes también han demostrado que la reducción de proteínas de NER como DDB1 también generan inestabilidad cromosomal (Shimanouchi *et al.*, 2006; Cang *et al.*, 2006).

La pérdida de función de Dmp52 y Dp53 resultó en un aumento en la pérdida de heterocigosidad del marcador *mwh*¹, lo cual sugiere que Dp53 se requiere para evitar la acumulación de DNA dañado probablemente activando la reparación, lo cual es apoyado por el hecho de que la apoptosis aumentó en los fondos deficientes en Dmp52 y Dp53 cuando se irradiaron con UV (figura 31). Esto podría estar asociado a la capacidad de p53 para activar la transcripción de XPC y DDB2, los cuales son genes involucrados en la reparación (Adimoolan y Ford, 2002; Tan y Chu, 2002). Por tal, la respuesta celular a la acumulación de DNA dañado en los discos deficientes en Dmp52 y Dp53 da lugar a la activación de la apoptosis a través de la vía de JNK para evitar la acumulación y propagación de las aberraciones cromosomales. De manera similar, se ha observado que células deficientes en p53 e

inhibidas en ATR son sensibles a sufrir muerte a través de PCC (condensación prematura de la cromatina) después de daño al DNA (Nghiem *et al.*, 2001), como una respuesta a la acumulación de DNA dañado. Los defectos en la reparación del DNA y/o transcripción reducida también pueden dar lugar a la activación de JNK generando apoptosis (Roos y Kaina, 2006), por lo que es probable que la inducción de la apoptosis masiva en los discos con niveles reducidos de Dmp52 y Dp53 ocurran en respuesta a la transcripción reducida y la acumulación de aberraciones cromosomales como se demostró por el ensayo LOH. Además, la transcripción del regulador negativo de JNK, Puckered, es dependiente de Dp53 (McEwen y Peifer, 2005), por lo que la expresión de Puckered sería deficiente en los discos expresando *GUS-Ctp53DN*, lo cual podría generar una activación sostenida de JNK generando apoptosis masiva en los discos con niveles reducidos de Dmp52 y Dp53.

La inhibición de la apoptosis al coexpresar p35 en los discos deficientes en Dmp52 no rescató los fenotipos de las alas sino que se generaron otros defectos diferentes a los observados en los discos con niveles reducidos solo de Dmp52 (figura 27A). Considerando que la reducción de los niveles de Dmp52 generó inestabilidad cromosomal, es posible que la ausencia de apoptosis permitiera la proliferación de células aneuploides comprometiendo el desarrollo del tejido y generando este fenotipo en particular. La importancia de la eliminación de células dañadas se ha demostrado en experimentos donde al suprimir la apoptosis con p35 en discos sometidos a IR se generaron aberraciones durante el desarrollo debido al crecimiento anormal del tejido inducido por la expresión continua y ectópica de *wingless (wg)* y *decapentaplegic (dpp)* (Pérez-Garijo *et al.*, 2004). Es probable que las células dañadas con niveles reducidos de Dmp52 y que coexpresan p35 continuamente emitan las señales Wg y Dpp, contribuyendo con las anomalías en el tejido. Similarmente, en ratones con deleciones en DDB1 se generó apoptosis, la cual al ser suprimida parcialmente en un fondo genético nulo para p53 no rescató los fenotipos sino que persistieron defectos morfológicos en el cerebro y la retina debido a la proliferación anormal de células dañadas (Cang *et al.*, 2006).

El hecho de que JNK pueda activar la apoptosis en discos con niveles reducidos de Dmp52 y Dp53 podría tener importantes implicaciones en la comprensión de la naturaleza de las enfermedades asociadas a deficiencias en TFIIH en humanos incluyendo el cáncer. La mayoría de los tumores sólidos son deficientes en p53 o en sus reguladores, por lo que la posible activación de la apoptosis a través de JNK al reducir las actividades de TFIIH podría ser un punto

estratégico para sensibilizar este tipo de tumores. Particularmente, estos resultados son relevantes debido al hecho de que la droga triptolide, la cual se ha utilizado en ensayos clínicos de tratamiento contra el cáncer por sus propiedades antiproliferativas, inmunosupresivas y antitumorales, se ha demostrado que es un inhibidor específico de la actividad ATPasa de XPB (Titov *et al.* (2011). En este trabajo se demostró que los discos imagales deficientes en Dp53 tratados con triptolide fenocopiaron el fenotipo apoptótico dependiente de JNK similar a lo observado en los discos que expresaron el dsRNA contra Dmp52. Este dato es consistente y apoya la conclusión de que las propiedades antitumorales del triptolide se encuentren directamente relacionadas con la inhibición de la actividad de XPB. De manera similar, algunas drogas como PRIMA han demostrado que son capaces de inducir apoptosis en líneas celulares cancerosas con mutaciones en p53 a través de la vía de JNK (Li *et al.*, 2005). No obstante, será importante determinar si las células cancerosas deficientes en p53 son más susceptibles a sufrir apoptosis que las células normales cuando TFIIH está afectado, para determinar si es un blanco *bona fide* para el diseño de drogas para futuras terapias contra el cáncer.

8.3 Interacciones físicas vs interacciones genéticas

Hasta este punto no sabemos si las interacciones genéticas mostradas entre Dmp52 y Dp53 están directamente relacionadas con las interacciones físicas detectadas entre ellas. No obstante, resulta interesante que las interacciones físicas entre Dmp52 y Dp53 fueron detectadas en un contexto sin inducir daño al DNA, sugiriendo que existen un comportamiento dinámico entre Dp53 con TFIIH, donde podría participar en la regulación del daño al DNA y la transcripción junto con otros factores. En líneas celulares humanas deficientes para XPB y XPD se ha reportado una supresión parcial de la apoptosis inducida por p53 cuando se induce daño con agentes como la doxorubicina o con la sobreexpresión de p53 (Wang *et al.*, 1996; Robles *et al.*, 1999). Incluso, reportes previos y datos generados en este trabajo coinciden con la supresión parcial de la apoptosis generada por la sobreexpresión de $\Delta\Delta p53$ en moscas mutantes en XPB (*haywire*) o Dmp52 (Merino *et al.*, 2002; figura 36), sugiriendo que se requiere de TFIIH intacto para la apoptosis mediada por Dp53. Sin embargo, los fenotipos observados por la sobreexpresión de Dp53 en fondos deficientes en TFIIH y la pérdida de función de TFIIH y Dp53 de manera simultánea no son fáciles de correlacionar e incluso pueden generar varias interpretaciones. Una posible explicación es que debido a que TFIIH se requiere

para la transcripción de la mayoría de los genes mediado por la RNAPol II y Dp53 se convierte en un factor transcripcional al ser activado para inducir la expresión de genes proapoptóticos, la reducción de la actividad de TFIIH podría afectar la expresión de estos genes proapoptóticos directamente debido a las interacciones físicas que presenta p53 con TFIIH. Sin embargo, la reducción de los niveles de Dmp52 en los discos indujo apoptosis e incluso aumentó considerablemente de manera dependiente de JNK en la ausencia de Dp53 funcional. Otra explicación es que la expresión ectópica de DΔNp53 sea más sensible a la reducción de la transcripción en general que otros genes. De hecho, se ha demostrado que embriones de mosca mutantes de TFIIH incubados con bajas dosis de α-amanitina suprimieron las transformaciones homeóticas causadas por la sobreexpresión de genes homeóticos sin afectar otros genes (Gutiérrez *et al.*, 2004). De manera similar, inhibidores de la transcripción en varios tipos de células tumorales principalmente afectan oncogenes que se están sobreexpresando (Stellretch y Chen, 2011). Sin embargo, aunque no sabemos si el aumento en la apoptosis inducida por la reducción simultánea de TFIIH y Dp53 está ligado a las interacciones físicas entre estos factores, lo que sí está claro es la asociación funcional entre TFIIH y p53 en células humanas y *Drosophila*. Estas interacciones funcionales son relevantes no sólo para entender los fenotipos asociados en los pacientes afectados en TFIIH sino también para entender su posible uso en futuras terapias contra el cáncer.

8.4 Modelo

Basados en los resultados obtenidos en este trabajo con el conocimiento existente, se propone el siguiente modelo. Las células que presentan niveles reducidos en la función de TFIIH (ya sea por la disminución de los niveles de Dmp52 o Dmp34) presentan transcripción reducida y fragilidad cromosomal. La transcripción reducida puede inducir la activación de vías apoptóticas mediadas por Dp53 y JNK. Por otro lado, la fragilidad cromosomal puede dar lugar a inestabilidad genética, la cual puede activar las vías de JNK y Dp53 ya sea para iniciar la reparación de DNA o inducir la apoptosis (figura 34A). Sin embargo, en el caso de células con niveles reducidos en TFIIH y deficientes en Dp53, además de la transcripción reducida pueden presentar un incremento en la fragilidad cromosomal ya que debido a que Dp53 se encuentra deficiente se induce muy poca reparación acumulándose el daño en el DNA. La acumulación de daño así como la transcripción reducida pueden generar una hiperactivación de la vía de JNK para inducir apoptosis y eliminar las células dañadas (figura 34B).

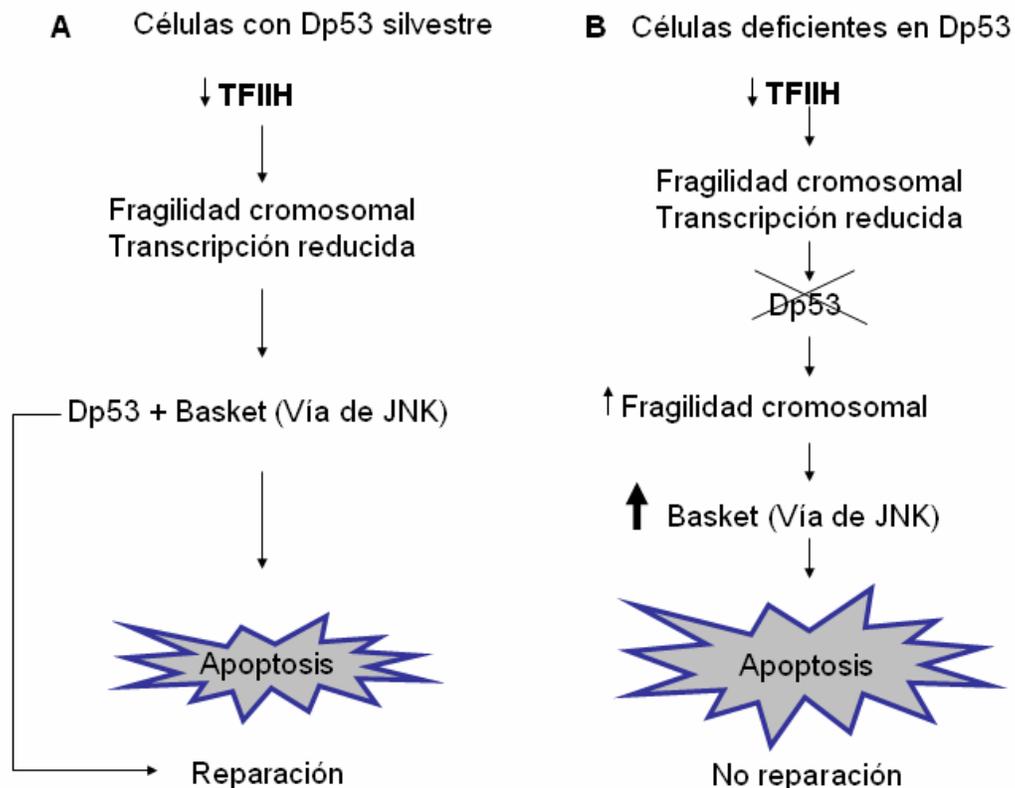


Figura 34. Modelo de las interacciones entre Dmp52 y Dp53. **A.** En un fondo genético con células que mantienen la función de Dp53 silvestre, la disminución de los niveles de Dmp52 (TFIIH) ocasiona una reducción en la transcripción así como inestabilidad cromosomal, activando a Dp53 y JNK para inducir apoptosis y reparación. **B.** Sin embargo, en células deficientes en Dp53, la reducción de los niveles de Dmp52 provoca apoptosis masiva dependiente de JNK en los discos de ala como resultado de un incremento en el DNA dañado e inestabilidad cromosomal para eliminar las células dañadas.

IX. CONCLUSIONES

- Dmp52 interactó físicamente con ambas isoformas de Dp53 en ensayos *in vitro* e *in vivo*.
- La disminución de los niveles de Dmp52 generó alteraciones en los patrones de venación y defectos en el crecimiento del ala asociados a una reducción en el tamaño de cada célula y una disminución en el número de células totales.
- La disminución de los niveles de Dmp34 en ala y en otros tejidos como el ojo generó fenotipos similares que la deficiencia en Dmp52, lo cual sugiere que los fenotipos se asocian a la pérdida de función de TFIIH.
- La disminución de los niveles de Dmp52 o Dmp34 indujo apoptosis, la cual aumentó cuando simultáneamente se pierde la función de Dp53.
- La atenuación de la apoptosis por p35 en el fondo genético *MS1096>Dmp52i* generó otros defectos en las alas no ligados a la apoptosis.
- La apoptosis independiente de Dp53 en moscas *MS1096>Dmp52i, GUS-Ctp53DN* se indujo por JNK (Basket), mientras que en moscas *MS1096>Dmp52i* participó parcialmente.
- La incubación de discos *MS1096>GUS-Ctp53DN* con la droga TPL fenocopió la apoptosis masiva observada en discos con niveles reducidos de Dmp52 y Dp53; además, se corroboró que es dependiente de JNK.
- La disminución de los niveles de Dmp52 ocasionó un aumento en la inestabilidad cromosomal, la cual se incrementó con la pérdida de función de Dp53.

X. PERSPECTIVAS

1. Determinar qué vía de señalización que regula el crecimiento se encuentra afectada en las células con niveles reducidos de Dmp52 en el ala de la mosca.
2. Evaluar qué ocurre con la activación de proteínas de respuesta al daño al DNA (mei-41/ATR, ATM) para determinar si contribuyen con la generación de inestabilidad.
3. Determinar si otros tipos de muerte celular pudieran estarse activando en los genotipos analizados en este trabajo (autofagia y necrosis).
4. Evaluar si es posible sensibilizar líneas tumorales humanas que sean nulas para p53 al disminuir los niveles de p52 humana.
5. Evaluar si la interacción física detectada entre Dmp52 y Dp53 participa directamente en la regulación de algún proceso celular.

XI. ANEXOS

Anexo I. Competencia del anticuerpo de Dmp52.

Para determinar la especificidad del anticuerpo contra Dmp52 generado por New England Peptide, se realizaron ensayos de competencia de los sueros inmunes utilizando el péptido con el cual fueron inmunizadas dos ratas. El péptido utilizado para las inmunizaciones tiene la secuencia -CDVKRYWKKYKSGV- y corresponde a los 14 aminoácidos de la región carboxilo terminal de Dmp52. A través de ensayos de western blot, ambos sueros inmunes generaron señal de una banda aproximadamente de 52 kDa (peso esperado de Dmp52), mientras que los sueros preinmunes no generaron señal (figura 35A). Por otro lado, la competencia del anticuerpo con el péptido demostró que la única banda observada por western blot es específica de Dmp52, ya que en el ensayo de competencia la banda desapareció mientras que en el mock (control sin péptido) la banda de 52 kDa se siguió observando (figura 35B).

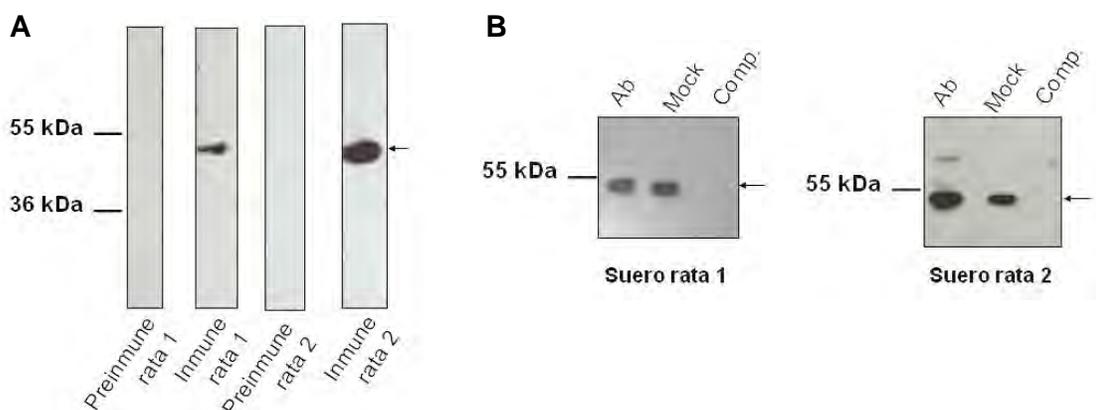


Figura 35. El anticuerpo de Dmp52 genera una sola banda y es específico en extractos totales de células S2R⁺. **A.** Western blot de los sueros preimmune e inmune de dos ratas inmunizadas con el péptido de Dmp52, dilución 1:500. **B.** Competencia del anticuerpo con el péptido específico para Dmp52, dilución 1:500. Ab, anticuerpo específico de Dmp52 como control positivo; Mock, control sin anticuerpo; Comp, competencia del anticuerpo con el péptido de Dmp52.

ANEXO II. Las mutaciones en Dmp52 suprimen parcialmente la apoptosis inducida por la sobreexpresión de DΔNp53

La inhibición de la apoptosis es uno de los primeros pasos para que una célula inicie el proceso tumorigénico. Los pacientes con XP presentan una alta incidencia de cáncer en la piel así como cáncer de pulmón. Varios trabajos han demostrado que líneas celulares humanas de pacientes XP con mutaciones en XPD y XPB son deficientes en la inducción de la apoptosis mediada por p53 mientras que líneas celulares de pacientes TTD con mutaciones en p8 o CS con mutaciones en CSB inducen de manera normal la apoptosis dependiente de p53 (Robles *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1996). En *D. melanogaster*, al sobreexpresar DΔNp53 en el ala en un fondo genético heterócigo para mutaciones en XPB (*haywire* en *D. melanogaster*) hubo una disminución en la apoptosis del ala con respecto a los fondos silvestres, lo cual concuerda con lo reportado en líneas humanas (Merino *et al.*, 2002). Sin embargo, dado que recientemente se han sugerido funciones independientes de TFIIH de las subunidades XPB y XPD, se decidió evaluar si en fondos deficientes para Dmp52 ocurría una supresión de la apoptosis al igual que XPB para descartar un efecto independiente de TFIIH.

Como se observa en la figura 36A, la sobreexpresión de DΔNp53 en el dominio dorsal del ala indujo deformaciones debido a la apoptosis masiva. Sin embargo, cuando se sobreexpresó DΔNp53 en un fondo heterócigo para los alelos mutantes Dmp52^{mm1}, Dmp52^{mm3}, y Dmp52^{EP3605} hubo una supresión parcial de la apoptosis observada por una disminución en las deformaciones del ala (figura 36B-D). Estos datos sugieren que se requiere que TFIIH se encuentre funcional para que la apoptosis dependiente de DΔNp53 se realice adecuadamente.

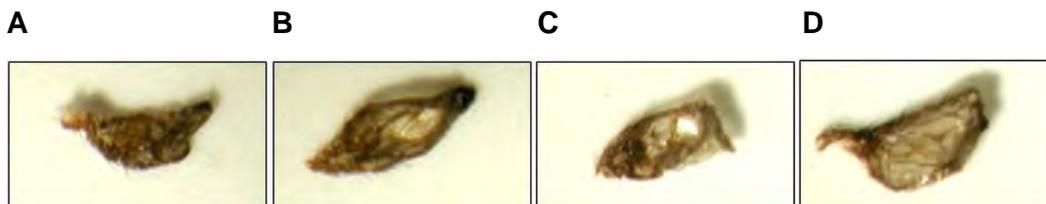


Figura 36. Supresión de la apoptosis inducida por la sobreexpresión de DΔNp53 en fondos deficientes de Dmp52. A. MS1096>DΔNp53. B. MS1096>DΔNp53, Dmp52^{EP3605}/+. C. MS1096>DΔNp53, Dmp52^{mm3}/+. D. MS1096>DΔNp53, Dmp52^{mm1}/+.

XII. REFERENCIAS

- Adimoolan, S. y J. Ford. 2002. p53 and DNA damage-inducible expression of the xeroderma pigmentosum group C gene. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 99(20):12985-12990
- Andera, L. y B. Wasylyk. 1997. Transcription abnormalities potentiates apoptosis of normal human fibroblast. **Molecular Medicine.** 3(12):852-863
- Andresoo, J. O., J. R. Mitchell, J. Wit, D. Hoogstraten, M. Volker, W. Toussaint, E. Speksnijder, R. B. Beems, H. V. Steeg, J. Jans, C. I. Zeeuw, N. G. J. Jaspers, A. Raams, A. R. Lehmann, W. Vermeulen, J. H. J. Hoeijmakers y G. T. J. van der Horst. 2006. An Xpd mouse model for the combined xeroderma pigmentosum/Cockayne syndrome exhibiting both cancer predisposition and segmental progeria. **Cancer Cells.** 10:121-132
- Assfalg, R., A. Lebedev, O. García-González, A. Schelling, S. Koch y S. Iben. 2011. TFIIH is an elongation factor of RNA polymerase I. **Nucleic Acids Res.** 40:1-10
- Bai, L., S. O. Yoon, P. D. King y J. L. Merchant. 2004. ZBP89-induced apoptosis is p53-independent and requires JNK. **Cell Death and Differentiation.** 11:663-673
- Bai, L., y W. Zhu. 2006. p53: structure, function and therapeutic applications. **J. Cancer Mol.** 2(4):141-153
- Bartek, J. y J. Lukas. 2001. Mammalian G1- and S-phase checkpoint in response to DNA damage. **Current Opinion in Cell Biology.** 13:738-747
- Bastien, J., S. Adam-Stitah, T. Riedl, J. M. Egly, P. Chambon y C. Rochette-Egly. 2000. TFIIH interacts with the retinoic acid receptor γ and phosphorylates its AF-1-activating domain through CDK7. **J. Biol. Chem.** 29(275):21896-21904
- Bogoyevitch, M. A. y B. Kobe. 2006. Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews.** 4(70):1061-1095
- Brodsky, M. H., W. Nordstrom, G. Tsang, E. Kwan, G. M. Rubin y J. M. Abrams. 2000. *Drosophila* p53 binds a damage response element at the *reaper* locus. **Cell.** Vol 101: 103-113
- Broughton, B. C., A. F. Thompson, S. A. Harcourt, W. Vermeulen, H. J. Hoeijmakers, E. Botta, M. Stefanini, M. D. King, C. A. Weber, J. Cole, C. F. Arlett y A. R. Lehmann. 1995. Molecular and cellular analysis of the DNA repair defect in a

- patient in Xeroderma pigmentosum complementation group D who has clinical features of Xeroderma pigmentosum and Cockayne syndrome. **Am. J. Hum. Genet.** 56:167-174
- Broughton, B. C., M. Berneburg, H. Fawcett, E. M. Taylor, C. F. Arlett, T. Nardo, M. Stefanini, E. Menefee, V. H. Price, S. Queille, A. Sarasin, E. Bohnert, J. Krutmann, R. Davidson, K. H. Kraemer y A. R. Lehmann. 2001. Two individuals with features of both xeroderma pigmentosum and trichothiodystrophy highlight the complexity of the clinical outcomes of mutations in the XPD gene. **Human Molecular Genetics.** 22(10):2539-2545.
- Bywater, M. J., G. Poortinga, E. Sanij, N. Hein, A. Peck, C. Cullinane, M. Wall, L. Cluse, D. Drygin, K. Anderes, N. Huser, C. Proffitt, J. Bliesath, M. Haddach, M. K. Schwaebe, D. M. Rickman, W. G. Rice, C. Schmitt, S. W. Lowe, R. W. Johnstone, R. B. Pearson, G. A. McArthur y R. D. Hannan. 2012. Inhibition of RNA polymerase I as a therapeutic strategy to promote cancer-specific activation of p53. **Cancer Cell.** 22:51-65
- Cang, Y., J. Zhang, S. A. Nicholas, J. Bastien, B. Li, P. Zhou y S. P. Goff. 2006. Deletion of DDB1 in mouse brain and lens leads to p53-dependent elimination of proliferating cells. **Cell.** 127:929-940
- Chakraborty, A., T. Uechi y N. Kenmochi. 2011. Guarding the translation apparatus: defective ribosome biogenesis and the p53 signaling pathway. **John Wiley & Sons, Ltd.**
- Chang. Y. C., K. Y. Jan, C. A. Cheng, C. B. Liao y Y. C. Liu. 2008. Direct involvement of the tumor suppressor in nucleotide excision repair. **DNA Repair.** 7:751-761
- Chen, D., T. Riedl, E. Washbrook, P. E. Pace, R. C. Coombes, J. M. Egly y S. Ali. 2000. Activation of estrogen receptor α by S118 phosphorylation involves a ligand-dependent interaction with TFIIH and participation of CDK7. **Molecular Cell.** 6:127-137
- Chen, J., S. Larochelle, X. Li y B. Suter. 2003. XPD-ERCC2 regulates CAK activity and mitotic progression. **Nature.** 10(424):228-232
- Christie, E., A. Trotter, Y. Rifat, A. Badrock, A. Parslow, H. Verkade, E. Ober, H. Field, D. Stainier, R. Hannan, G. Lieschke y J. Heath. 2009. A nonsense mutation in the TFIIH p52 gene causes abnormal rRNA processing in the zebrafish intestinal mutant, *scorax*. **Póster 09-P010**
- Chymkowitch, P., N. Le-May, P. Charneau, E. Compe y J. M. Egly. 2011. The phosphorylation of the androgen receptor by TFIIH directs the

- ubiquitin/proteasome process. **EMBO J.** 30:468-479
- Coin, F., V. Oksenyich y J. M. Egly. 2007. Distinct roles for the XPB/p52 and XPD/p44 subcomplexes of TFIIH in damaged DNA opening during nucleotide excision repair. **Mol. Cell.** 26:245-256
- Cui, Z. y P. J. DiMario. 2007. RNAi knockdown of Nopp140 induces *Minute*-like phenotypes in *Drosophila*. **Molecular Biology of the Cell.** 18:2179-2191
- Davis, R. J. 2000. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. **Cell.** 103:239-252
- De Andrade, H.H., Reguly, M.L., y M. Lehmann. 2004. Wing somatic mutation and recombination test. **Methods Mol. Biol.** 247, 389–412
- De Boer, J. y J. H. J. Hoeijmakers. 2000. Nucleotide excision repair and human syndromes. **Carcinogenesis.** 3(21): 453-460
- Dekanty, A., L. Barrio, L., Muzzopappa, M. Auer, H. y M. Milán. 2012. Aneuploidy-induced delaminating cells drive tumorigenesis in *Drosophila* epithelia. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 109:20549-20554.
- DiLello, P., L. M. M. Jenkins, C. Mas, C. Langlois, E. Malitskaya, A. Fradet-Turcotte, J. Archambault, P. Legault y J. G. Omichinski. 2008. P53 and TFIIH share a common binding site on the Tfb1/p62 subunit of TFIIH. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 105(1):106-111
- Donehower, L. A., M. Harvey, B. L. Slagle, M. J. McArthur, C. A. Jr. Montgomery, J. S Butel, y A. Bradley. 1992. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumors. **Nature.** 356:215-221
- Drané, P., E. Compe, P. Catez, P. Chymkowitch y J. M. Egly. 2004. Selective regulation of vitamin D receptor-responsive genes by TFIIH. **Mol. Cell.** 16:187-197
- Egly, J. M. 2001. TFIIH: from transcription to clinic. **FEBS Letters.** 24884:124-128
- Ford, J. M. y P. C. Hanawalt. 1995. Li-Fraumeni syndrome fibroblasts homozygous for p53 mutations are deficient in global DNA repair but exhibit normal transcription-coupled repair and enhanced UV resistance. **Proc. Natl. Acad. Sci.** (92):8876-8880
- Ford, J. M. y P. C. Hanawalt. 1997. Expression of wild-type p53 is required for efficient global genomic nucleotide excision repair in UV-irradiated human fibroblasts. **J. Biol. Chem.** 44(272):28073-28080
- Fousteri, M. y L. H. F. Mullenders. 2008. Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanism and biological effects. **Cell**

Research.18:73-84

- Fregoso, M. J. P. Lainé, J. Aguilar-fuentes, V. Mocquet, E. Reynaud, F. Coin, J. M. Egly y M. Zurita. 2007. DNA repair and transcriptional deficiencies caused by mutations in the *Drosophila* p52 subunit of TFIIH generate developmental defects and chromosome fragility. **Molecular and Cell biology**. 27(10): 3640-3650
- Fuss, J. O. y J. A. Tainter. 2011. XPB and XPD helicases in TFIIH orchestrate DNA duplex opening and damage verification to coordinate repair with transcription and cell cycle via CAK kinase. **DNA Repair**. 10:697-713
- Gerber, H., M. Hagmann, K. Seipel, O. Georgiev, M. A. L. West, Y. Litingtung, W. Schaffner, J. L. Corden. 1995. RNA polymerase II C-terminal domain required for enhancer-driven transcription. **Nature**. 374:660-662
- Giglia-Mari, G., F. Coin, J. A. Ranish, D. Hoogstratn, A. Theil, N. Wijgers, N. J. Jaspers, A. Raams, M. Argentini, P. J. van der Spek, E. Botta, M. Stefanini, J. M. Egly, R. Aebersold, J. H. Hoeijmakers y V, Vermeulen. 2004. A new, tenth suunit of TFIIH responsible for the DNA repair syndrome trichothiodystrophy A. **Nat. Genet**. 36:714-719
- Graham, J. M. Jr., K. Anyane-Yeboah, A. Raams, E. Appeldoorn, W. J. Kleijer, V. H. Garritsen, D. Busch, T. G. Edersheim y N. G. J. Jaspers. 2001. Cerebro-oculo-facia-skeletal syndrome with a nucleotide excision-repair defect and a mutated XPD gene with prenatal diagnosis in triplet pregnancy. **Am. J. Hum. Genet**. 69:291-300
- Griswold, A. J., K. T. Chang, A. P. Runko, M. A. Knight and K. Min. 2008. Sir2 mediates apoptosis through JNK-dependent pathways in *Drosophila*. **PNAS**. 105(25):8673-8678
- Gutiérrez, L., C. Merino, M. Vázquez. E. Reynaud y M. Zurita. 2004. RNA polymerase II ^{140wimp} mutant and mutations in the TFIIH subunit XPB differentially affect homeotic expression in *Drosophila*. **Genesis**. 40:58-66
- Hamel, B. C. J., A. Raams, A. R. Schuitema-Dijkstra, P. Simmons, I. van der Burgt, N. G. J. Jaspers y W. J. Kleijer. 1996. Xeroderma pigmentosum-Cockayne síndrome complex: a further case. **J. Med. Genet**. 33:607-610
- Helenius, K., Y. Yang, J. Alasaari y T. P. Makela. 2009. Mat1 inhibits peroxisome proliferator-activated receptor γ -mediated adipocyte differentiation. **Molecular and Cellular Biology**. 2(9):315-323
- Herrera-Cruz, M., G. Cruz, V. Valadez-Graham, M. Fregoso-Lomas, C. Villicaña, M.

- Vázquez, E. Reynaud y M. Zurita. 2012. Physical and functional interactions between *Drosophila* homologue of Swc6/p18Hamlet subunit of the SWR1/SRCAP chromatin-remodeling complex with the DNA-repair/transcription factor TFIIH. **J. Biol. Chem.** 287:33567-33580
- Huang, G., L. Zhichang y H. Chi. 2009. Regulation of JNK and p38 MAPK in the immune system: signal integration, propagation and termination. **Cytokine.** 48:161-160
- Hwang, B. J., J. M. Ford, P. C. Hanawalt y G. Chu. 1999. Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 96:424-428
- Iben, S., H. Tschochner, M. Bier, D. Hoogstraten, P. Hozak, J. M. Egly y I. Grummt. 2002. TFIIH plays an essential role in RNA polymerase I transcription. **Cell.** 109:297-306
- Igaki, T. 2009. Correcting developmental errors by apoptosis: lessons from *Drosophila* JNK signaling. **Apoptosis.** 14:1021-1028
- Ito, S., I. Kuraoka, P. Chymkowitch, E. Compe, A. Takedachi, C. Ishigami, F. Coin, J. M. Egly y K. Tanaka. 2007. XPG stabilizes TFIIH, allowing transactivation of nuclear receptors: implications for Cockayne syndrome in XP-G/CS patients. **Mol. Cell.** 26:231-243
- Ito, S., L. J. Tan, D. Andoh, T. Narita, M. Seki, Y. Hirano, K. Narita, I. Kuraoka, Y. Hiraoka y K. Tanaka. 2010. MMXD, a TFIIH-independent XPD-MMS19 protein complex involved in chromosome segregation. **Cell.** 39:632-640
- Jacinto, A., S. Woolner y P. Martin. 2002. Dynamic analysis of dorsal closure in *Drosophila*: from genetics to cell biology. **Developmental Cell.** 3:9-19
- Jawhari, A., J. P. Lainé, S. Dubaele, V. Lamour, A. Poterszman, F. Coin, D. Moras y J. M. Egly. 2002. p52 Mediates XPB function within the transcription/repair factor TFIIH. **J. Biol. Chem.** 35(277):31761-31777.
- Jin, S., S. Martinek, W. S. Joo, J. R. Wortman, N. Mirkovic, A. Sali, M. D. Yandell, N. P. Pavletich, M. W. Young y A. J. Levine. 2010. Identification and characterization of a p53 homolog in *Drosophila melanogaster*. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 13(97):7301-7306
- Joerger, A. C. y A. R. Fersht. 2008. Structural biology of the tumor suppressor p53. **Annu. Rev. Biochem.** 77:577-582
- Keriel, A., A. Sary, A. Sarasin, C. Rochette-Egly y J. M. Egly. 2002. XPD mutations prevent TFIIH-dependent transactivation by nuclear receptors and

- phosphorylation of RAR α . **Cell**. 109: 125-135
- Kraemer, K.H., Lee, M.M., y Scotto, J. 1987. Xeroderma pigmentosum. Cutaneous, ocular, and neurologic abnormalities in 830 published cases. **Arch. Dermatol.** 123:241-250.
- Kramer, J. M., J. T. Davidge, J. M. Lockyer yB. E. Staveley. 2003. Expression of *Drosophila* FOXO regulates growth and can phenocopy starvation. **BMC Developmental Biology**. 3:5
- Larochelle, S., K. A.Merrick, M. Terret, L. Wohlbold, N. M. Barboza, C. Zhang, K. M. Shokat, P. V. Jallepalli y R. P. Fisher. 2007. Requirements for CDK7 in the assembly of CDK1/Cyclin B and activation of CDK2 revealed by chemical genetics in human cells. **Mol. Cell**. 25:839-850
- Lee, J. H., H. Koh, M. Kin, J. Park, S. Y. Lee, S. Lee y J. Chung. 2006. JNK pathway mediates apoptotic cell death induced by suppressor LKB1 in *Drosophila*. **Cell Death and Differentiation**. 13:1110-1112
- Lee, S., B. Elenbaas, A. Levine J. Griffith.1995. p53 and its14 kDa C-terminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches. **Cell**. 81:1013–1020
- Lehman, A. R. 2001. The xeroderma pigmentosum group D (XPD) gene: one gene, two functions, three diseases. **Genes Dev**. 15:15-23
- Leveillard, T., L. Andera, N. Bissonnette, L. Schaeffer, L. Bracco, J. M. Egly y B. Wasylyk. 1996. Functional interaction between p53 and the TFIIH complex are affected by tumor-associated mutations. **EMBO J**. 15:1615-1624
- Levine, A. J. 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. **Cell**. 88:323-331
- Li Y, Y. Mao, P. W. Brandt-Rauf, A. C. Williams y R. L. Fine. 2005. Selective induction of apoptosis in mutant p53 premalignant and malignant cancer cells by PRIMA-1 through the c-Jun-NH2-kinase pathway. **Mol. Cancer Ther**. 4:901-909.
- Li, X., O. Urwyler y B. Suter. 2010. *Drosophila* XPD regulates CDK7 localization, mitotic kinase activity, spindle dynamics and chromosome segregation. **PLoS Genetics**. 6(3): 1-14
- Liu, Q. 2011. Triptolide and its expanding multiple pharmacological functions. **Int. Immunopharmacol**. 11:377-383
- Liu, Y. y M. Kulesz-Martin. 2001. p53 protein at the hub of cellular DNA damage response pathways through sequence specific and non-sequence-specific

- DNA binding. **Carcinogenesis**. 22:851-860
- Ljungman, M. 2005. Activation of DNA damage signaling. **Mutation Research**. 577:203-216
- Ljungman, M., F. Zhang, F. Chen, A. J. Rainbow y B. C. McKay. 1999. Inhibition of RNA polymerase II as a trigger for the p53 response. **Oncogene**. 18:583-592
- Lu, H. R. P. Fisher, P. Bailey y A. J. Levine. 1997. The CDK7-cycH-p36 complex of transcription factor IIH phosphorylates p53, enhancing its sequence-specific DNA binding activity *in vitro*. **Mol. Cell. Biol.** 17(10):5923-5934
- Luo, X., O. Puig, J. Hyun, D. Bohmann y H. Jasper. 2007. Foxo and Fos regulate the decision between cell death and survival in response to UV irradiation. **The EMBO Journal**. 26:380-390
- Mace, K. y A. Tugores. 2004. The product of the *split ends* gene is required for the maintenance of positional information during *Drosophila* development. **BMC Developmental Biology**. 4:15
- Mandal, S., W. A. Freije, P. Gustan y U. Banerjee. 2005. Metabolic control of G1-S transition: cyclin E degradation by p53-induced activation of the ubiquitin-proteasome system. **J. Cell. Biol.** 4(188):473-479
- Marcel, V., M. L. Dichtel-Danjoy, C. Sagne, H. Hafsi, D. Ma, S. Ortiz-Cuaran, M. Olivier, J. Hall, B. Mollereau, P. Hainaut y J. C. Bourdon. 2011. Biological functions of p53 isoforms through evolution: lessons from animal and cellular models. **Cell Death & Differ.** 18:1815-1824
- Martin-Blanco, E., A. Gampel, J. Ring, K. Virdee, N. Kirov, A. M. Tolkovsky y A. Martínez-Arias. 1998. puckered encodes a phosphatase that mediates a feedback loop regulating JNK activity during dorsal closure in *Drosophila*. **Genes & Development**. 12:557-570
- Matsuno, M., H. Kose, M. Okabe y Y. Hiromi. 2007. TFIIH controls developmentally-regulated cell cycle progression as a holo-complex. **Genes to cells**. 12:1289-1300
- McEwen, D. G. y M. Peifer. 2005. Puckered, a *Drosophila* MAPK phosphatase, ensure cell viability by antagonizing JNK-induced apoptosis. **Development**. 132:3935-3946.
- McNamee, L. M. y M. Brodsky. 2009. p53 independent apoptosis limits DNA damage-induced aneuploidy. **Genetics**. 182:423-435
- Meek, D. W. 2004. The p53 response to DNA damage. **DNA Repair**. 3:1049-1056
- Meira, L., J. M. Graham, Jr., C. R. Greenberg, D. B. Busch, A. T. B. Doughty, D. W.

- Ziffer, D. M. Coleman, I. Savre-Train y E. C. Friedberg. 2000. Manitoba aboriginal kindred with cerebro-oculo-facio-skeletal syndrome has a mutation in the Cockayne syndrome group B (CSB) gene. **Am. J. Hum. Genet.** 66:1221-1228
- Merino, C., E. Reynaud, M. Vázquez y M. Zurita. 2002. DNA repair and transcriptional effects on mutations in TFIIH in *Drosophila* development. **Molecular Biology of the Cell.** 13:3246-3256
- Mesquita, D., A. Dekanty y M. Milán. 2010. A dp53-dependent mechanism involved in coordinating tissue growth in *Drosophila*. **PLoS Biology.** 8(12):1-12
- Montagne, J., M. J. Stewart, H. Stocker, E. Hafen, S. C. Kozma y G. Thomas. 1999. *Drosophila* S6 kinase: a regulator of cell size. **Science.** vol 285:2126-2129
- Mounkes, L. C. y M. T. Fuller. 1999. Molecular characterization of mutant alleles of the DNA repair/Basal transcription factor *haywire/ERCC3* in *Drosophila*. **Genetics.** 152:291-297
- Murakami, K., B. J. Gibbons, R. E. Davis, S. Nagai, X. Liu, P. J. J. Robinson, T. Wu, C. D. Kaplan y R. D. Kornberg. 2012. Tfb6, a previously unidentified subunit of the general transcription factor TFIIH, facilitates dissociation of Ssl2 helicase after transcription initiation. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 1-6
- Nghiem, P., P. K. Park, Y. Kim, C. Vaziri y S. L. Schreiber. 2001. ATR inhibition selectively sensitizes G1 checkpoint deficient cells to lethal premature chromatin condensation. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 98(16):9092-9097
- Ohsawa, S., K. Sugimura, K. Takino, T. Xu, A. Miyawaki y T. Igaki. 2011. Elimination of oncogenic neighbors by JNK-mediated engulfment in *Drosophila*. **Developmental Cell.** 20:315-328
- Oksenysh, V. y F. Coin. 2010. The long unwinding road: XPB and XPD helicases in damaged DNA opening. **Cell Cycle.** 1(9):90-96
- Orphanides, G., T. Lagrange y D. Reinberg. 1996. The general transcription factors of RNA polymerase II. **Genes & Development.**10:2657-2687
- Pérez-Garijo, A. F. A. Martín y G. Morata. 2004. Caspase inhibition during apoptosis causes abnormal signalling and developmental aberrations in *Drosophila*. **Development.** 131:5591-5598
- Quijano, J. C., M. J. Stinchfield y S. J. Newfeld. 2011. Wg signaling via Zw3 and mad restricts selfrenewal of sensory organ precursor cells in *Drosophila*. **Genetics.** 189: 809-824.
- Rabut, G., G. Le Dez, R. Verma, T. Makhnevych, A. Knebel, T. Kurz, C. Boone, R. J.

- Deshai y M. Peter. 2011. The TFIIH subunit Tfb3 regulates cullin neddylation. **Cell**. 43:488-495
- Rebollar, E., V. Valadez-Graham, M. Vázquez, E. Reynaud y M. Zurita. 2006. Role of the p53 from *Drosophila melanogaster* in maintenance of histone H3 acetylation and response to UV-light irradiation. **FEBS Letters**. 580:642-648
- Repiso, A., C. Bergantiños, M. Corominas y F. Serras. 2011. Tissue repair and regeneration in *Drosophila* imaginal discs. **Develop. Growth Differ.** 53:177-185
- Robles, A. I., X. W. Wang y C. C. Harris. 1999. Drug-induced apoptosis is delayed and reduced in XPD lymphoblastoid cell lines: possible role of TFIIH in p53-mediated apoptotic cell death. **Oncogene**. 18:4681-4688
- Roos, P. W. y B. Kaina. 2006. DNA damage-induced cell death by apoptosis. **Trends Mol. Med.** 12:440-450.
- Rubbi, C. P. y J. Milner. 2003. p53 is a chromatin accessibility factor for nucleotide excision repair of DNA damage. **The EMBO Journal**. 4(22):975-986
- Saeboe-Larsen, S., M. Lyamouri, J. Merriam, M. P. Oksvold y A. Lambertsson. 1998. Ribosomal protein insufficiency and the minute syndrome in *Drosophila*: a dose-response relationship. **Genetics**. 148:1215-1224
- Schneider, E., M. Montenarh y P. Wagner. 1998. Regulation of CAK kinase activity by p53. **Oncogene**. 17:2733-2741
- Schultz, P., S. Fribourg, A. Poterszman, V. Mallouh, D. Moras y J. M. Egly. 2000. Molecular structure of human TFIIH. **Cell**. 102:599-607
- Sengupta, S. y C. C. Harris. 2005. p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. **Molecular Cell Biology**. 6:44-55
- Sheklov, E. y G. Morata. 2011. A p53/JNK-dependent feedback amplification loop is essential for the apoptotic response to stress in *Drosophila*. **Cell Death and Differentiation**. 1-10
- Shimanouchi, K., K. Takata, M. Yamaguchi, S. Muramaki, G. Ishikawa, R. Takeuchi, Y. Kanai, T. Ruike, R. Nakamura, Y. Abe y K. Sakaguchi. 2006. *Drosophila* damaged DNA binding protein 1 contributes to genome stability in somatic cells. **J. Biochem.** 139:5158
- Slee, E. A., D. J. O'Connor y X. Lu. 2004. To die or not to die: how does p53 decide?. **Oncogene**. 23:2809-2818
- Sogame, N., M. Kim y J. M. Abrams. 2003. *Drosophila* p53 preserves stability regulating cell death. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 100(8):4696-4701

- Stellrecht, C. M. y L. S. Chen. 2011. Transcription inhibition as a therapeutic target for cancer. **Cancers**. 3:4170-4190
- Takagi, Y., C. A. Masuda, W. H. Chang, H. Komori, D. Wang, T. Hunter, C. A. P. Joazeiro y R. D. Kornberg. 2005. Ubiquitin ligase activity of TFIIH and the transcriptional response to DNA damage. **Mol. Cell**. 18:237-243
- Tan, T. y G. Chu. 2002. p53 binds and activates the Xeroderma pigmentosum DDB2 gene in humans but not mice. **Mol. Cell. Biol.** 22(10):3247-3254
- Theodosiou, A. y A. Ashworth. 2002. Differential effects of stress stimuli on a JNK-inactivating phosphatase. **Oncogene**. 21:2387-2397
- Titov, D. V., B. Gilman, Q. He, S. Bhat, W. Low, Y. Dang, M. Smeaton, A. L. Demain, P. S. Miller, J. F. Kugel, J. A. Goodrich y J. O. Liu. 2011. XPB, a subunit of TFIIH, is a target of the natural product triptolide. **Nature Chemical Biology**. 7:182-188
- Villicaña, C., G. Cruz y M. Zurita. 2013. The genetic depletion or the triptolide inhibition of TFIIH in p53 deficient cells induce a JNK-dependent cell death in *Drosophila*. **J Cell Sci**. 126(11):2502-2515
- Wang, X. W., H. Yeh, L. Schaeffer, R. Roy, V. Moncollin, J. M. Egly, Z. Wang, E. C. Friedberg, M. K. Evans, B. G. Taffe, V. A. Bohr, G. Weeda, J. H. J. Hoeijmakers, K. Forrester y C. C. Harris. 1995. p53 modulation of TFIIH-associated nucleotide excision repair activity. **Nature genetics**. (10):188-195
- Wang, X. W., W. Vermeulen, J. D. Coursen, M. Gibson, S. E. Lupold, K. Forrester, G. Xu, L. Elmore, H. Yeh, J. H. J. Hoeijmakers y C. C. Harris. 1996. The XPB and XPD DNA helicases are the components of the p53-mediated apoptosis pathway. **Genes & Development**. 10:1219-1232
- Weber, A., H. Chung, E. Springer, D. Heitzmann y R. Warth. 2010. The TFIIH subunit p89 (XPB) localizes to the centrosome during mitosis. **Cellular Oncology**. 32:121-130
- Xiao, H., A. Pearson, B. Coulombe, R. Truant, S. Zhang, J. L. Regier, S. J. Triezenberg, D. Reinberg, O. Flores, C. J. Ingles y J. Greenblatt. 1994. Binding of basal transcription TFIIH to the acidic activation domains of VP16 and p53. **Molecular and Cellular Biology**. 14(10):7013-7024
- Yang J., Z. Xu, Y. Huang, H. E. Hamrick, P. J. Duerksen-Hughes y Y. Yu. 2004. ATM and ATR: Sensing DNA damage. **World J Gastroenterol**. 10(2):155-160
- Zurita, M. y C. Merino. 2003. The transcriptional complexity of the TFIIH complex. **TRENDS in Genetics**. 19(10):578-58

XIII. PUBLICACIÓN

The genetic depletion or the triptolide inhibition of TFIIH in p53-deficient cells induces a JNK-dependent cell death in *Drosophila*

Claudia Villicaña, Grisel Cruz and Mario Zurita*

Departamento de Genética del Desarrollo, Instituto de Biotecnología, Avenida Universidad 2001, Cuernavaca Morelos, 62250, México

*Author for correspondence (marioz@ibt.unam.mx)

Accepted 7 March 2013

Journal of Cell Science 126, 2502–2515

© 2013. Published by The Company of Biologists Ltd

doi: 10.1242/jcs.122721

Summary

Transcription factor IIIH (TFIIH) participates in transcription, nucleotide excision repair and the control of the cell cycle. In the present study, we demonstrate that the Dmp52 subunit of TFIH in *Drosophila* physically interacts with the fly p53 homologue, Dp53. The depletion of Dmp52 in the wing disc generates chromosome fragility, increases apoptosis and produces wings with a reduced number of cells; cellular proliferation, however, is not affected. Interestingly, instead of suppressing the apoptotic phenotype, the depletion of Dp53 in Dmp52-depleted wing disc cells increases apoptosis and the number of cells that suffer from chromosome fragility. The apoptosis induced by the depletion of Dmp52 alone is partially dependent on the JNK pathway. In contrast, the enhanced apoptosis caused by the simultaneous depletion of Dp53 and Dmp52 is absolutely JNK-dependent. In this study, we also show that the anti-proliferative drug triptolide, which inhibits the ATPase activity of the XPB subunit of TFIH, phenocopies the JNK-dependent massive apoptotic phenotype of Dp53-depleted wing disc cells; this observation suggests that the mechanism by which triptolide induces apoptosis in p53-deficient cancer cells involves the activation of the JNK death pathway.

Key words: Apoptosis, *Drosophila*, JNK, TFIH, Triptolide, p53

Introduction

To carry out their function, several multisubunit complexes involved in transcription and/or DNA repair establish multiple interactions with other factors. This interplay between different components is highly dynamic, and in many cases, the interactions are transitory although fundamental for different cellular processes. A typical example is the 10-subunit complex TFIH, which participates in RNA pol II- and RNA pol I-mediated transcription, in nucleotide excision repair (NER) and in the control of the cell cycle (Zurita and Merino, 2003). It has been reported that during transcription by RNA pol II, TFIH must interact with different components of the pre-initiation complex, including TFIIE, subunits of the mediator and RNA pol II (Egly and Coin, 2011). It has also been reported that TFIH interacts with different transcriptional activators (Esnault et al., 2008; Chymkowitch et al., 2011). These interactions are essential for the primary functions of TFIH in transcription, including the formation of the DNA bubble at the transcription initiation site that is catalysed by the 3'-to-5' helicase activity of the XPB subunit and the ATPase activity of XPD. In addition, the phosphorylation of serines 5 and 7 of the CTD domain of the large subunit of RNA pol II, which is necessary to initiate and elongate transcription, is catalysed by the transcription-specific kinase module (CAK) of TFIH, composed of Cdk7, CycH and MAT1 (Akhtar et al., 2009; Glover-Cutter et al., 2009). In NER, TFIH is recruited to the damaged site by the DDB and XPC-HR23-β centrin complex in untranscribed regions and by the stalled RNA pol II in transcribed chromatin (Coin et al., 2008).

The ATPase activity of XPB is required to anchor TFIH to the damaged DNA, and the XPD helicase melts the DNA in the 5' to 3' direction, thus allowing the incision of damaged strand by XPG and ERCC1-XPF endonucleases. TFIH maintains a close interaction with XPG and XPA, which stabilise the NER complex (Egly and Coin, 2011). In fact, it has been suggested that XPG forms a complex with TFIH that participates not only in NER but also in transcription (Ito et al., 2007).

A particularly relevant issue related to TFIH is its association with human diseases: mutations in its XPB, XPD and p8 subunits are linked to xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome, trichothiodystrophy and cancer (Bergoglio and Magnaldo, 2006). Mutations in other subunits of TFIH associated with syndromes have not yet been reported in humans. Using *Drosophila melanogaster* as a model to reveal the function of other subunits, it has been demonstrated that *Dmp52* mutations generate phenotypes associated with these three syndromes, indicating that Dmp52 plays an important role in regulating the entire activity of TFIH during several cellular processes (Coin et al., 2007; Fregoso et al., 2007).

One of the transcriptional activators that have been shown to interact with TFIH is the tumour suppressor p53 (Léveillard et al., 1996). After genotoxic stress, p53 is activated and can induce either cell cycle arrest, DNA repair or direct the cell toward apoptosis, depending on the severity of the DNA damage (Brady and Attardi, 2010). The transactivation domain (TAD) of p53 can interact with the PH domain of the p62 subunit of TFIH in human cells; this interaction is correlated with the ability of

these proteins to activate both the initiation and elongation of transcription (Okuda et al., 2008; Di Lello et al., 2008). In addition, the CAK complex phosphorylates p53 and enhances its DNA-binding activity (Ko et al., 1997). For UV-induced DNA damage, p53 is required for the recruitment of TFIIH to the damaged DNA sites (Wang et al., 1996). Genetically, it has been demonstrated that in human cells derived from patients whose XPD and XPB subunits have been mutated, the apoptotic effect caused by p53 overexpression is suppressed (Wang et al., 1996). In *Drosophila*, a similar result was obtained in XPB (*haywire*) mutant flies (Fuller et al., 1989; Merino et al., 2002). Although these results suggest that p53 requires the presence of intact TFIIH to promote apoptosis, these experiments were conducted in an artificial situation in which p53 was overexpressed. In addition to the established interactions between p62 and the XPB and XPD subunits of TFIIH, a previous report suggested that p53 may also interact with a 52-kDa protein that is present in the TFIIH complex (Léveillard et al., 1996); while this protein was not characterised at the time of the initial publication of its existence, the obvious candidate is the p52 subunit of TFIIH.

The reports of interactions between TFIIH and p53 suggest that these interactions play an important role at some point during the cell cycle and during the processes that occur after DNA damage. However, there is still limited information on the cross talk between p53 and TFIIH during animal development. Here, we present evidence that the fly homologue of p53 (Dp53) directly interacts with the fly p52 (Dmp52) subunit of TFIIH in the absence of genotoxic stress. The depletion of Dmp52 in the wing disc caused growth and differentiation defects during development as well as chromosomal aberrations that can induce apoptosis. Intriguingly, the simultaneous depletion of TFIIH and Dp53 increased the presence of chromosomal aberrations that activate apoptosis in a JNK-dependent manner. Furthermore, the specific inhibition of XPB by the natural product triptolide phenocopies the apoptotic response caused by the absence of p52. This discovery has important implications for the treatment of cell tumours deficient in p53.

Results

Dp53 physically interacts with the Dmp52 subunit of TFIIH

It has been reported that p53 interacts with the p62 subunit of TFIIH through its PH domain (Okuda et al., 2008; Di Lello et al., 2008). Intriguingly, published data also point to the existence of a possible direct contact between p53 and the p52 subunit of TFIIH (Léveillard et al., 1996). To gain insight into the physical interactions between Dp53 and Dmp52 in *Drosophila*, we constructed recombinant Dp53 short (DΔNp53) and large (Dp53) isoform proteins (Bourdon et al., 2005) with FLAG or V5 tags at the C-terminal end and Dmp52 tagged at the N-terminal end (FLAG-Dmp52). These constructions were expressed in S2R⁺ cells, and the expression of the recombinant Dp53 and Dmp52 proteins were verified by western blots and immunoprecipitation assays using specific antibodies (supplementary material Fig. S1).

Using total protein extracts from cells transfected with the Dp53-tag constructs, we performed co-immunoprecipitation (CoIP) assays. CoIP experiments using whole cell extracts against Dp53-FLAG and the DΔNp53-V5 recombinant proteins enabled the pulldown of the endogenous cellular Dmp52 (Fig. 1A,B, upper panels). In fact, by using a specific Dp53 antibody that recognises both isoforms (supplementary material

Fig. S5), CoIP of the endogenous Dmp52 using S2R⁺ total protein cell extracts was possible (Fig. 1A, lower panel). In the case of the DΔNp53-V5 immunoprecipitation experiments, we also analysed whether Cdk7 and DmXPB (other components of the TFIIH complex) immunoprecipitated with Dp53-V5. Surprisingly, we detected no Cdk7 and only very low levels of DmXPB (Fig. 1B). However, we cannot dismiss the idea that the location of the V5-epitope on the target protein may affect the CoIP results or our experimental conditions, thereby impeding or disaggregating the entire TFIIH complex.

Reciprocal CoIPs using DmXPB, Dp53 or Cdk7 antibodies on non-transfected S2R⁺ cells showed that the XPB antibody was able to co-immunoprecipitate Dp53 and p62 but not Cdk7 (Fig. 1C; supplementary material Fig. S1C). In addition, we did not detect any CoIP of Cdk7 with either the Dp53 or XPB antibodies. We have observed similar results in the protein extracts of these cells using antibodies against other TFIIH core subunits (unpublished results). Furthermore, CoIPs conducted with Cdk7 antibodies were not able to immunoprecipitate other analysed components of TFIIH (Fig. 1C). It is possible that the conditions used in our CoIP experiments were very strong, which could have resulted in a disrupted interaction between the CAK complex and the core of TFIIH. At this point, we decided to

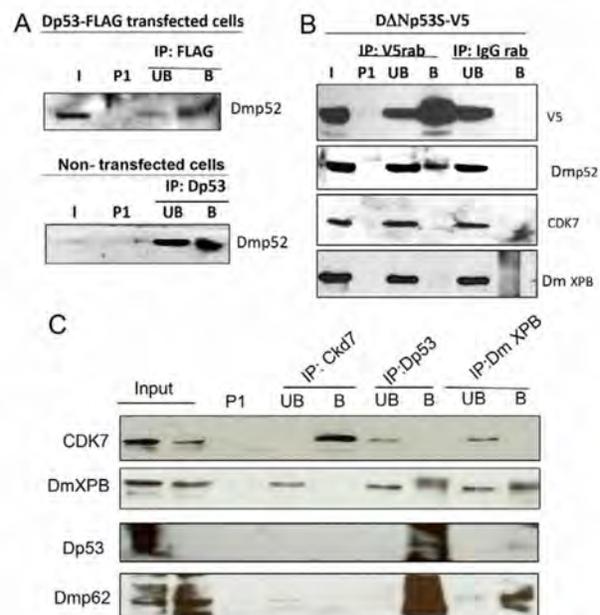


Fig. 1. Dp53 co-immunoprecipitates with TFIIH components. (A) Upper panel: endogenous Dmp52 co-immunoprecipitates with Dp53 in whole cell extracts of Dp53-FLAG S2R⁺ transfected cells. Immunoprecipitation (IP) was performed using FLAG antibody. Lower panel: S2R⁺ protein cell extracts were immunoprecipitated with the specific Dp53 antibody and the IP material analyzed by western blots using the Dmp52 antibody. (B) Endogenous Dmp52 co-immunoprecipitates with DΔNp53. CoIP assays were performed with whole cell extracts of DΔNp53-V5 transfected cells and DΔNp53 was pulled down with an antibody that recognizes V5. CoIP was revealed against other components of TFIIH with Cdk7 and XPB specific antibodies. (C) Endogenous Dp53 co-immunoprecipitates with XPB and p62 in wild type cell extracts. CoIP assays were performed with specific antibodies against XPB, Cdk7 and Dp53. I, input; P1, preclearing 1; UB, unbound; B, bound.

examine whether both Dp53 isoforms and Dmp52 interact with each other using extracts of S2R⁺ cells that had been co-transfected with both tagged proteins. We demonstrated that FLAG-Dmp52 can interact with both isoforms of V5-tagged Dp53 in CoIP assays (supplementary material Fig. S1). Together, these experiments strongly suggest that Dmp52 may interact with some TFIIH subunits, even in conditions in which DNA damage has not been induced.

We next analysed whether Dp53 and Dmp52 can interact directly. To achieve this goal, we expressed recombinant proteins containing different regions of Dmp52 fused to GST in *E. coli* (Fig. 2A). These GST-Dmp52 proteins were used in pulldown experiments against the Dp53 and DΔNp53 isoforms and against constructs that cover different regions of Dmp53 expressed *in vitro* in a coupled transcription translation system (Fig. 2A). Fig. 2B shows that DΔNp53 interacts with the complete Dmp52 protein. We next tested the interaction of the two Dp53 isoforms with the complete Dmp52 protein and the C-terminal domain (CTD-Dmp52) of Dmp52, which has been shown to be important for the interaction with the p8 subunit of TFIIH. We also tested a construct with a deletion of the Dmp52 CTD (Dmp52ΔCTD) (Fig. 2A). We found that both polypeptides (Dp53 and DΔNp53)

can interact with the complete Dmp52 protein (Fig. 2C). Intriguingly, we also observed that Dp53 contacts the CTD region of Dmp52 as well as the rest of the protein. Multiple contacts in different regions between p52 and XPB have been demonstrated (Jawhari et al., 2002), and, together with our data, these results suggest that Dmp52 can interact with different proteins simultaneously through different regions. We next analysed the two isoforms containing a deletion of the CTD of Dp53 and analysed the CTD alone for its interaction with Dmp52. We again found that both Dp53 isoforms interact with Dmp52 but that Dp53 CTD, which contains the complete oligomerisation domain, does not recognise Dmp52 (Fig. 2D, lower panel). In summary, these results demonstrate that Dp53 most likely interacts with Dmp52 through its DBD even in the absence of genotoxic stress and that Dmp52 can be added to the list of factors that may have direct physical contact with Dmp53.

Depletion of TFIIH in the wing imaginal disc affects growth and cell number in the adult wing

In *Drosophila*, mutant alleles of the *Dmp52* gene are lethal, but heteroallelic combinations of these mutants may generate adult organisms that are smaller than wild-type flies with melanotic

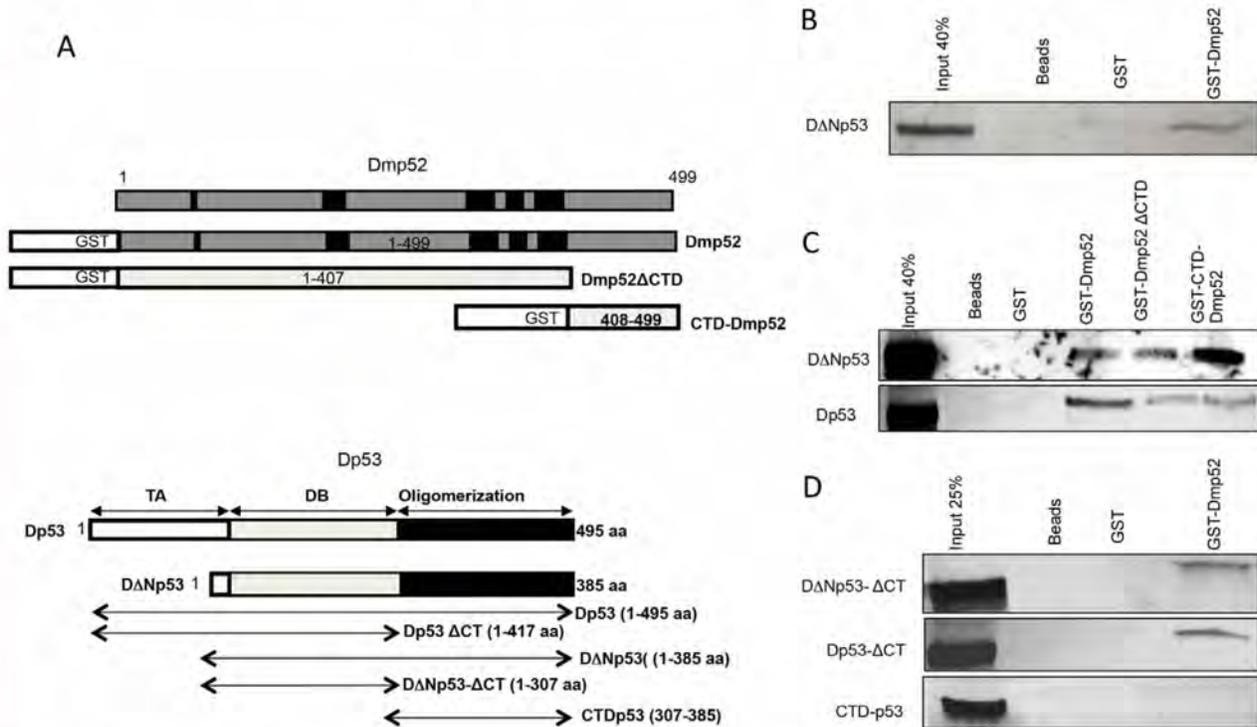


Fig. 2. Dmp52 interacts physically with both isoforms of Dp53. (A) Schematic representation of Dmp52 and Dp53 proteins. Upper panel: Dmp52 scheme showing full length protein and fragments of recombinant GST-tagged Dmp52 used to perform pulldown assays. Dmp52 fragments include a CTD domain and protein excluding this domain fused to GST (GST-Dmp52ΔCTD). Lower panel: Dp53 scheme showing full length protein of both isoforms in addition to protein fragments transcribed and translated *in vitro* and marked with radioactive ³⁵S. Fragments of Dp53 consist in CTD-domain of Dp53, which is the same in both isoforms, and their respective fragments with truncated CTD eliminating the oligomerisation domain. (B) Pulldown assay demonstrating that recombinant GST-Dmp52 protein interacts physically with DΔNp53 isoform. Although a weak signal is detected for GST-only, DΔNp53 signal is stronger on incubation with GST-Dmp52, indicating an interaction between these proteins. (C) Pulldown assay of Dmp52 and its fragments with both isoforms of Dp53. Both Dp53 isoforms interact physically with full length Dmp52, the CTD domain and GST-Dmp52ΔCTD, indicating at least two binding sites on Dmp52. (D) Pulldown assay of Dp53 fragments and full length Dmp52. Dmp52 interacts with Dp53 through a region that excludes its oligomerisation domain.

tumours and chromosomal instabilities (Fregoso et al., 2007). These phenotypes are pleiotropic and may be caused by the accumulation of defects during development; it is therefore difficult to determine the contribution of the genetic interaction of factors such as Dp53. Therefore, we decided to analyse the effect of the depletion of Dmp52 in a particular tissue at a specific time. To achieve this objective, we decided to use dsRNA against Dmp52 specifically directed to the wing disc using the UAS-GAL4 system. The wing disc is a monolayer epithelium that grows several thousand-fold in mass and cell number during larval development and is an excellent model for the study of cell growth, proliferation and differentiation (Martin et al., 2009). Thus, to direct the expression of *Dmp52i*, we first used the *MS1096* driver, which directs the expression of Gal4 in the dorsal domain of the wing pouch; we then crossed these flies with flies carrying dsRNA against Dmp52 (*Dmp52i*) from the Vienna Resource Center. Consistent with results from our previous work using *Dmp52* mutant alleles (Fregoso et al., 2007), we observed a reduction in the size of adult wings in flies expressing *Dmp52i* compared with flies carrying only the driver (Fig. 3). We also observed deformation of the wing shape and the presence of extra veins in the wing (Fig. 3).

To confirm these results and to determine if the expression of *Dmp52i* in a different wing disc domain generates similar phenotypes, we used an *engrailed* driver (*en-Gal4*) that directs the expression of *Dmp52i* to the posterior domain of the wing disc (Fig. 3). A reduction in wing size and the presence of extra veins (indicated by arrows in Fig. 3) were also observed with the *en-Gal4* driver. In addition, the posterior cross vein was so highly reduced that it almost disappeared. Interestingly, in the case of the *en-GAL4* driver, we observed that the proportion of the wing territories was relatively well maintained, even in regions where *Dmp52i* was not expressed, although the reduction in size was stronger in the posterior domain than in the anterior domain

(supplementary material Fig. S2). In addition, the presence of extra veins was also detected in territories outside the driver expression. It has been recently reported that stressful conditions that reduce the cell size in a particular territory in the wing disc generate a non-autonomous effect to coordinate cell growth in adjacent cell populations (Mesquita et al., 2010; Wells and Johnston, 2012); it appears that this scenario also applied in the case of the depletion of the Dmp52 subunit of TFIIH in the posterior wing disc.

To confirm that the observed phenotypes are caused by the depletion of Dmp52 in the dorsal wing disc domain, we created flies that contain the *MS1096-Gal4* driver, *Dmp52i* and *Gal80^{ts}*, which is an inhibitor of Gal4. We found that the phenotype of reduced wing size and extra wing veins reverted, confirming that those phenotypes are caused by the expression of *Dmp52i* in the wing disc (supplementary material Fig. S3A). Furthermore, we also showed that the levels of Dmp52 protein were reduced in salivary glands expressing *Dmp52i*, reinforcing the specificity of the dsRNA (supplementary material Fig. S3B). However, different phenotypes were observed in the wing when we previously used the *MS1096-Gal4* driver to express dsRNA against different targets (unpublished results), indicating that the wing phenotypes observed by depleting Dmp52 are specific.

Recently, reports have suggested that subunits of TFIIH could associate with other complexes, independent of TFIIH. This description is true for XPD, which has been shown to interact with the MMS19 complex involved in chromosome segregation (Ito et al., 2010). Thus, we evaluated whether the phenotypes generated by the depletion of Dmp52 were due to an independent TFIIH functional effect on Dmp52 or to a generalised effect on TFIIH. We also decided to evaluate whether these phenotypes are also caused by the depletion of other TFIIH subunits. We directed the expression of a dsRNA against the *Drosophila* p34 subunit of TFIIH (*Dmp34* in the fly) using the *MS1096* driver. The depletion

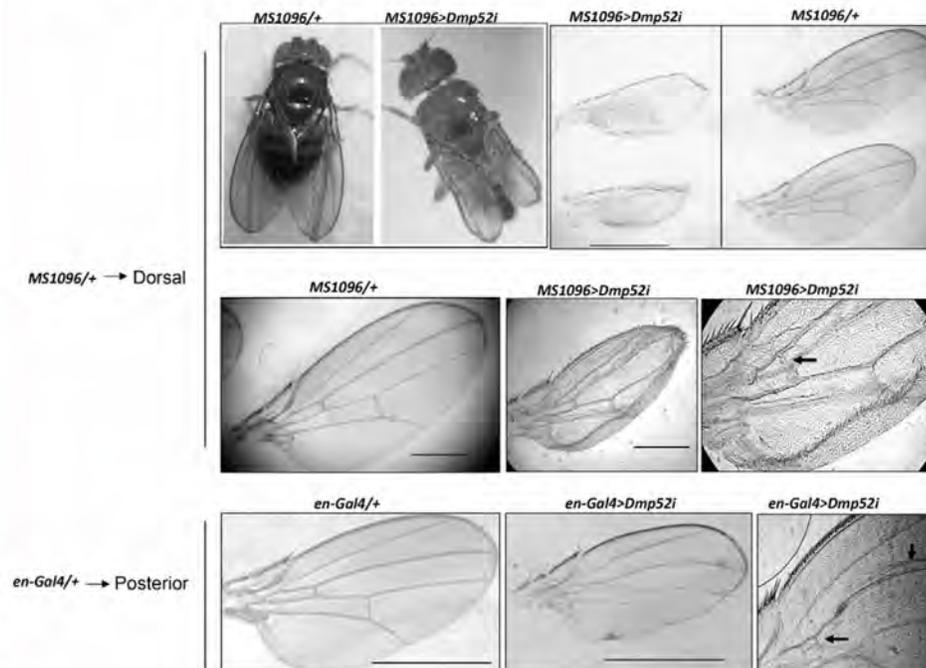


Fig. 3. Expression of dsRNA against Dmp52 (*Dmp52i*) reduces wing size and causes rising of extra veins.

Dmp52 depletion in the wing on the dorsal domain causes a 'bent out' phenotype in wings (upper left-hand panel) and a marked wing size reduction compared with controls (upper right-hand panel). Analysis by light microscopy of wings Dmp52 depleted shows extra veins on the wing blade (indicated by an arrow). Expression of *Dmp52i* with *en-Gal4* driver shows similar phenotypes to those observed with *MS1096* driver. Extra veins are also formed in regions outside of Gal4 expression (arrows). The bars in the wing images indicate an equivalent real size.

of *Dmp34* shows similar phenotypes to those observed for the depletion of *Dmp52*, although phenotypes were more severe in the wing when using *MS1096-Gal4* driver and identical when using the *en-GAL4* driver, indicating that the observed defects in the wing are caused by a reduction in the activity of TFIH (supplementary material Fig. S4). The differences in the severity of phenotypes associated with *Dmp34i* and *Dmp52i* using *MS1096* as the driver could be due to differences in RNAi efficiency, as was observed when the temperature was modulated (supplementary material Fig. S4A). Furthermore, using an *eyeless-Gal4* driver that directs Gal4 expression to the eyes, we found that similar growth defects were also observed in both *Dmp52i* and *Dmp34i* (supplementary material Fig. S4C).

The reduction in the wing size and the appearance of extra veins suggest that the depletion of *Dmp52* may be affecting cell proliferation and/or cell growth as well as cell differentiation. To determine if the reduction in the wing size was due to fewer or smaller wing cells, we counted the number of hairs in the wing; these hairs are nonsensory apical projections that form from single cells present in a specific area (Quijano et al., 2011). Fig. 4A shows a comparison of control wings and *Dmp52i* wings. The knockdown wing clearly has more hairs per area, a disorganised hair pattern and deformations in the longitudinal and cross veins (indicated by an arrow in Fig. 4A; Fig. 4B). Likewise, the overall size of the *Dmp52i* wing is approximately half the size of the control wing (Fig. 4C). In addition, the

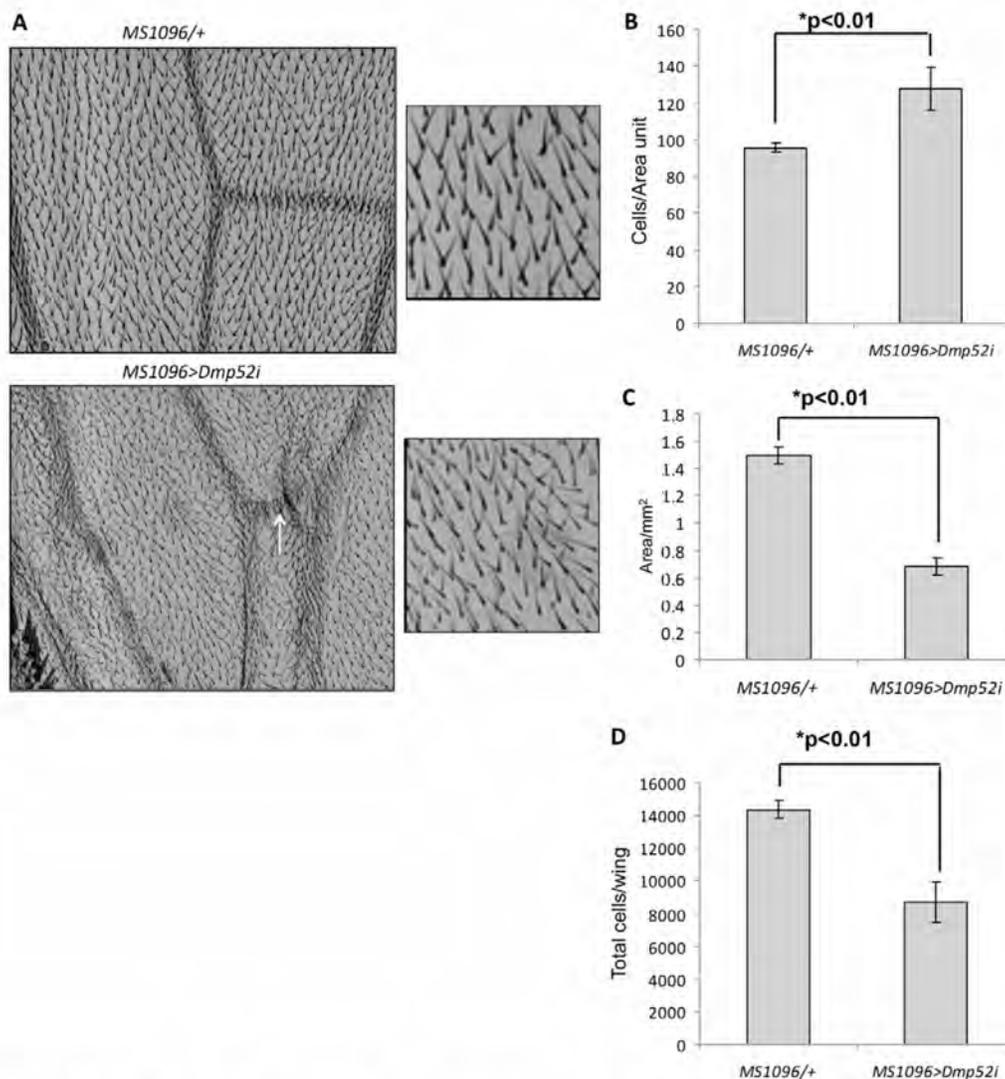


Fig. 4. *Dmp52* depletion generates a higher cell density per area and wings that have a lower number of total cells. (A) *MS1096 >Dmp52i* wings showed a higher density of bristles per unit area. The arrow indicates a deformation in the wing vein. (B) Quantification of cells per unit area in *Dmp52* depleted wings reveals a higher cell density, indicating that cell size is smaller compared with controls. (C) Quantification of wing area. The blade wing is reduced by approximately 50% in *MS1096 >Dmp52i*. (D) Quantification of number of total cells per wing indicates that although *MS1096 >Dmp52i* exhibits a higher cell density, the number of total cells is lower if compared with the *MS1096/+* control. Results in B–D are means \pm s.e.m.

number of cells per specific area is ~20% greater in the *Dmp52i* wing than in controls, indicating that every cell is smaller and that a defect is present in the growth of each individual cell (Fig. 4B). However, even though the number of cells per unit area is higher in the *Dmp52i* wing than in the control wing, the total number of cells in the whole wing is lower in the *Dmp52i* wing than in the control wing (Fig. 4D). Therefore, the depletion of *Dmp52* in the wing disc affects both the cell size and the total number of cells, indicating that both cell growth and total cell number are affected. In addition, the presence of extra veins suggests alterations in the differentiation process that establishes the vein pattern in the wing when TFIH is not completely functional.

Dmp52 interacts genetically with Dp53, and its simultaneous depletion enhances a JNK-dependent massive cell death

The reduction in the total cell number observed in the wings depleted in *Dmp52* may be caused either by a reduction in proliferation or by an increase in cell death during wing development. To determine which of these processes was

involved in the generation of this phenotype, wing discs were analysed for apoptosis using TUNEL assays, the incorporation of BrdU to visualise DNA replication and the detection of H3Pser10 to visualise the entry into mitosis. Interestingly, we observed that the incorporation of BrdU in DNA and the distribution and number of nuclei that were positive for H3Pser10 were not affected in wing discs with reduced levels of *Dmp52* at any developmental stage (Fig. 5A and data not shown). However, *Dmp52*-depleted wing discs showed higher rates of apoptotic cell death than discs carrying only the driver (Fig. 5A). This result suggests that the reduction in the cell number is at least in part due to an increase in apoptosis during development of the wing disc.

In a previous analysis of mutant alleles in *Dmp52*, we discovered the presence of chromosomal aberrations in neuroblast metaphasic chromosomes (Fregoso et al., 2007). This defect may be related to the increase in apoptosis observed in the wing discs that have reduced levels of *Dmp52*. Therefore, we analysed the presence of aberrant chromosomes in these discs with a loss of heterozygosity assay (LOH) using the *mwh¹* marker. Homozygous *mwh¹/mwh¹* clones form groups of three

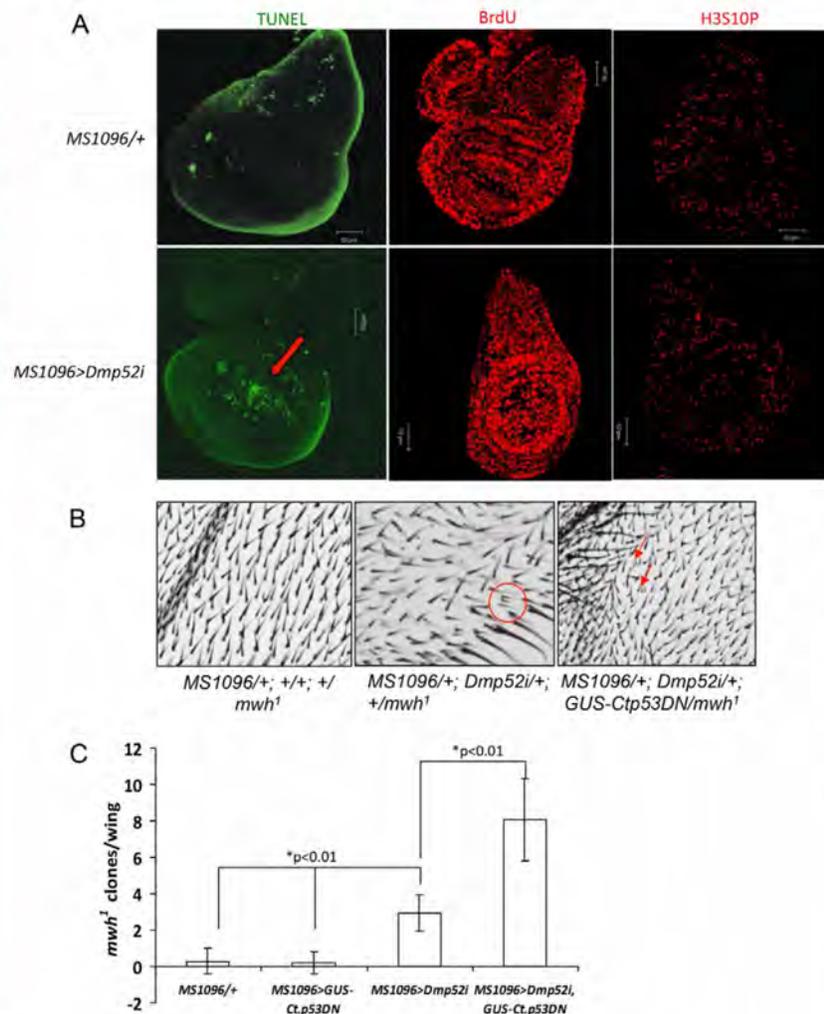


Fig. 5. Reduction of levels of *Dmp52* induces apoptosis in wings and generates chromosomal instability. (A) BrdU incorporation, H3S10P immunostaining and TUNEL labeling of wing discs. *Dmp52* depleted wing discs exhibit more apoptotic bodies than controls; no changes in BrdU or H3S10P were observed, indicating that cell cycle progression is not perturbed. The arrow indicates apoptotic bodies. Scale bars: 50 μ m. (B) Reducing levels of *Dmp52* causes genomic instability in wings. Control and *GUS-Ctp53DN* expressing wings exhibit almost no *mwh¹* clones, but *MS1096 >Dmp52i* wings showed a higher number of *mwh¹* clones; interestingly, the highest number of *mwh¹* clones was present in *MS1096 >Dmp52i, GUS-Ctp53DN* wings. (C) Quantification of *mwh¹* clones per wing. The genotypes are indicated in the figure. Results are means \pm s.e.m.

bristles in the wing, and thus, when heterozygous *mwh*^{1/+} individuals suffer chromosomal rearrangements (loss of the wild-type allele by deletions of segments or the complete loss of the chromosome), they generate this particular phenotype (de Andrade et al., 2004). Using this assay, we found a higher frequency of *mwh*¹ homozygous clones in wings of *Dmp52*-depleted flies than in wings of flies heterozygous for the *mwh*¹ allele carrying only the driver *MS1096* (Fig. 5B,C). These results indicate that when TFIH is not completely functional, aberrant chromosomes are generated; the increase in apoptosis in the wing disc could therefore be generated by the presence of these chromosomal aberrations.

Because Dp53 and *Dmp52* interact directly with each other, we decided to analyse the interaction between these two factors at the genetic level by taking advantage of the specific apoptotic phenotype observed in the wing when the levels of *Dmp52* are reduced. Genetic interactions between TFIH and p53 have been demonstrated in human cells derived from patients afflicted with xeroderma pigmentosum who carry mutations in XPD and XPB as well as in *Drosophila* XPB mutants (Robles et al., 1999; Wang et al., 2003; Merino et al., 2002). These studies were performed by overexpressing p53 to induce apoptosis in backgrounds

deficient for XPD or XPB. However, no studies have been performed *in vivo* using mutants or RNAi that affect both TFIH and p53 functions simultaneously. To determine the developmental effect of depleting both TFIH and p53 in a particular tissue at the same time, we expressed *Dmp52i* together with a dominant negative mutant form of Dp53 (*GUS-Ctp53DN*) that has been used as a bona fide inhibitor of Dp53 (Brodsky et al., 2000; Shlevkov and Morata, 2012), again using the UAS-GAL4 system and the *MS1096* driver. The expression of the dominant negative form of Dp53 does not have an effect on the development of the wing (Brodsky et al., 2000) (Fig. 6C). Intriguingly, *Dmp52i* in combination with the *GUS-Ctp53DN* mutant enhanced the defects that were produced in the wing by the depletion of *Dmp52* (Fig. 6D). Similar results were observed with an inducible dsRNA that covers the two Dp53 isoforms (*Dmp53i*) together with the simultaneous expression of *Dmp52i* (supplementary material Fig. S5A,C). These results suggest that the depletion of *Dmp52* generates defects that require a functional Dp53 to reduce the effects caused by a defective TFIH.

Because the depletion of *Dmp52* induces apoptosis, we analysed the wing discs of *MS1096 >Dmp52i,GUS-Ctp53DN*

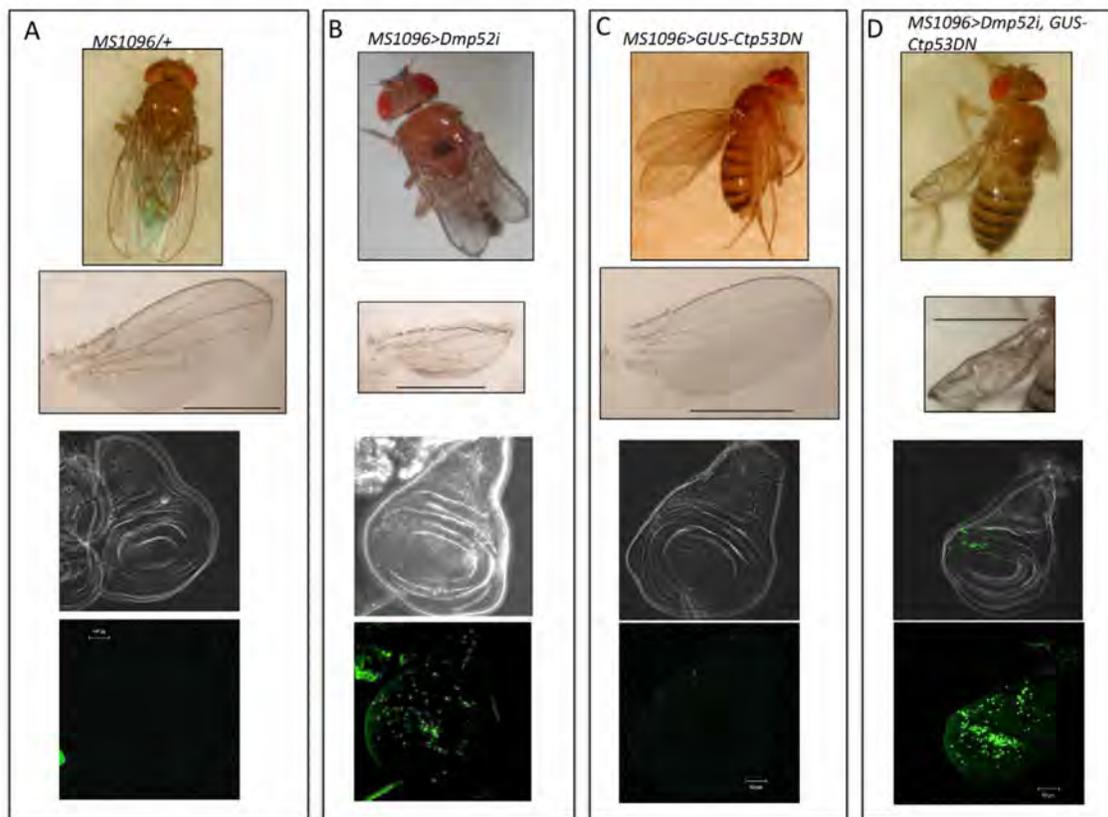


Fig. 6. Loss of function of *Dmp52* and *Dp53* causes a massive cell death in wing discs. (A) Control wings show a wild-type phenotype (top two panels) and reduced number of apoptotic bodies on wing discs (bottom panel). (B) *MS1096 >Dmp52i* wings show a bent out phenotype and reduction in size as previously described in Fig. 4 and several apoptotic bodies on wing discs. (C) *MS1096 >GUS-Ctp53DN* wings show a wild-type phenotype (top two panels) and reduced number of apoptotic bodies in wing discs. (D) *MS1096 >Dmp52i,GUS-Ctp53DN* wings showed enhanced morphological defects compared with *MS1096 >Dmp52i* (top two panels) and causes a massive apoptotic cell death in wing discs. The bars in the wing images (second row) indicate an equivalent real size. Scale bar: 50 μ m (bottom panels).

flies using TUNEL assays and acridine orange staining. Intriguingly, we observed a dramatic increase in cell death in these discs, explaining the enhancement of the wing defects in the *Dmp52i* adult flies when Dp53 was not functional (Fig. 6; supplementary material Fig. S5B). Furthermore, the same enhancement in apoptosis was observed in flies expressing the *Dmp34 RNAi* in conjunction with the expression of *GUS-Ctp53DN* (supplementary material Fig. S5C). Thus, the inactivation of Dmp53 does not suppress cell death but instead enhances it when Dmp52 or Dmp34 (TFIIH) is depleted. We also evaluated DNA synthesis and the mitotic status in these flies and did not find any difference from the control organisms (supplementary material Fig. S6). Interestingly, when we analysed the wings of *MS1095 >Dmp52i; GUS-Ctp53DN* flies for LOH, we found a higher number of *mwh^l* clones than in the wings of *Dmp52i* flies (Fig. 5C). These data suggest that in the absence of Dmp52 and Dp53, there is an increase in chromosome fragility that cannot be repaired, resulting in the generation of a higher rate of chromosomal aberrations. This hypothesis is supported by the fact that UV-induced DNA damage enhances the apoptotic phenotype in flies with depleted Dp53 and Dmp52 (supplementary material Fig. S7A).

The next focus was to corroborate the hypothesis that the enhancement of the *Dmp52i* phenotype by the absence of a functional Dp53 is linked to apoptosis. We therefore first expressed the p35 inhibitor of caspases that inhibit apoptosis, together with *Dmp52i* in the wing and found that the defects in the adult wing were increased, but the appearance of the wing was different than that of the wings of flies in which Dmp52 and Dp53 were simultaneously depleted (Fig. 7A). The adult wings exhibited a large blister in which the dorsal and ventral wing surfaces were separated. Furthermore, the expression of the caspase inhibitor p35 abolished the apoptosis induced by the depletion of Dmp52, indicating that the cell death generated by the reduction of Dmp52 detected by TUNEL is caspase-dependent and confirming that the TUNEL assay was detecting apoptosis (Fig. 7B). We next investigated whether the enhancement of apoptosis in *MS1096 >Dmp52i; GUS-Ctp53DN* discs is also caspase-dependent by co-expressing p35. Fig. 7C shows that blocking the caspase Drice by p35 suppressed the massive apoptosis generated by the co-depletion of Dmp52 and Dp53 in the wing disc. We also determined if the depletion of Dmp52 in combination with the expression of p35 in the wing disc caused alterations in the control of the cell cycle. Again, we

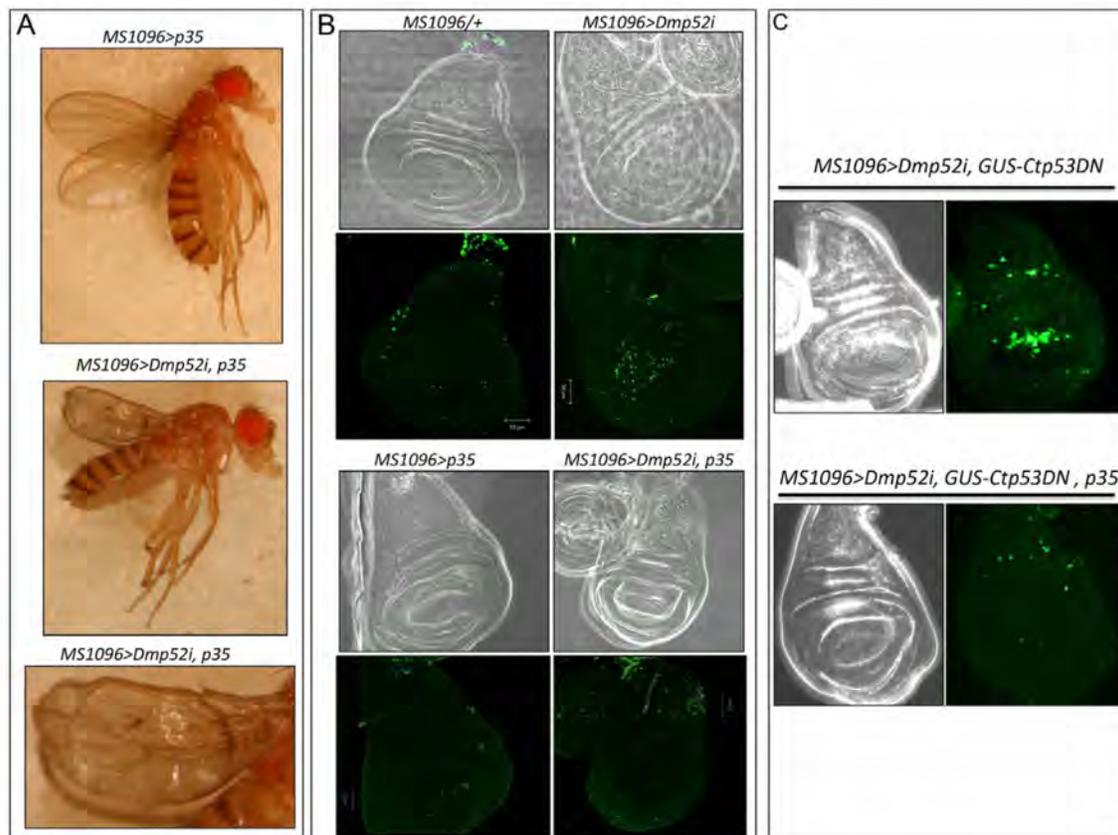


Fig. 7. Coexpression of p35 abolishes cell death, indicating a caspase-dependent pathway. (A) Coexpression of p35 in *MS1096 >Dmp52i* background causes blisters and altered wing morphology. (B) TUNEL assay demonstrating that apoptosis generated in *MS1096 >Dmp52i* is abolished when p35 is co-expressed on this genetic background. (C) The massive cell death detected by TUNEL on *MS1096 >Dmp52i, GUS-Ctp53DN* wing discs is also caspase-dependent. Apoptotic bodies are abolished when p35 is co-expressed on *MS1096 >Dmp52i, GUS-Ctp53DN* wing discs. The genotypes are indicated in each panel. Scale bars: 50 μm.

analysed the incorporation of BrdU in the S phase and of H3Pser10 for the entry into M phase. Intriguingly, we did not detect any change in the number of cells in the S phase or M phase of the cell cycle (supplementary material Fig. S6). These results suggest that when Dmp52 is not functional in the dorsal region of the wing disc in the absence of Dp53 or when apoptosis is inhibited, the different checkpoints are not responding to the cellular stress present in this condition; these data suggest that TFIIH plays a direct role in the checkpoint response.

It is known that *Drosophila* responds to stress stimuli through the Dp53 and JNK pathways, thereby activating the expression of pro-apoptotic genes (Brodsky et al., 2000; Luo et al., 2007). In fact, it has been recently demonstrated that Dp53 and JNK establish a feedback loop that amplifies the initial apoptotic stimuli (Shlevkov and Morata, 2012). However, it has also been reported in a p53 mutant context that a p53-independent apoptosis mechanism is activated in response to ionising radiation and that this mechanism depends on the JNK pathway (McNamee and Brodsky, 2009). Based on these reports, we decided to analyse the effect of the depletion of JNK (*basket* in *Drosophila*) on apoptosis in wing discs that were also depleted of Dmp52 and Dp53. To achieve this goal, we used the *MS1096* driver to direct the expression of a dsRNA against the JNK transcript. Interestingly, the depletion of Dmp52 increased the levels of phosphorylated JNK (P-JNK), although apoptosis was not completely abolished when JNK was depleted (Fig. 8A,B). These results suggest that the increase in cell death in Dmp52-depleted wing discs, although linked to the activation of JNK, is

not completely suppressed by the absence of JNK and does not produce the same response as the depletion of Dp53 when Dmp52 is not present. However, when we analysed Dmp52-, Dp53- and JNK-depleted flies, apoptosis was practically abolished (Fig. 8A,B; supplementary material Fig. S7B). These results correlate with the fact that the levels of P-JNK are dramatically enhanced in discs depleted in Dmp52 and Dmp53 (Fig. 8B). Together, these results indicate that the enhancement of apoptosis observed in Dmp52- and Dp53-depleted wing discs depends on the JNK pathway.

Inhibition of the ATPase activity of XPB using triptolide phenocopies the massive apoptotic phenotype in Dmp52-Dp53- depleted cells

Triptolide is a diterpene triepoxide derived from *Tripterygium wilfordii*, a plant used in traditional medicine in China that has been shown to have a potent antiproliferative effect on different types of cancers in preclinical studies. Recently, it has been demonstrated that triptolide specifically inhibits the ATPase activity of the XPB subunit of TFIIH, accounting for most of the pharmacological effects of this natural product (Titov et al., 2011). Interestingly, most of the studies using triptolide report that apoptosis is the principal cause of death in cancer cells (Liu, 2011). Therefore, we decided to determine if the treatment of third instar larvae wing discs with triptolide in a Dp53-deficient context phenocopies the apoptotic phenotype generated by the simultaneous depletion of functional Dmp52 and Dp53. To determine the effect of triptolide on third instar larvae wing discs,

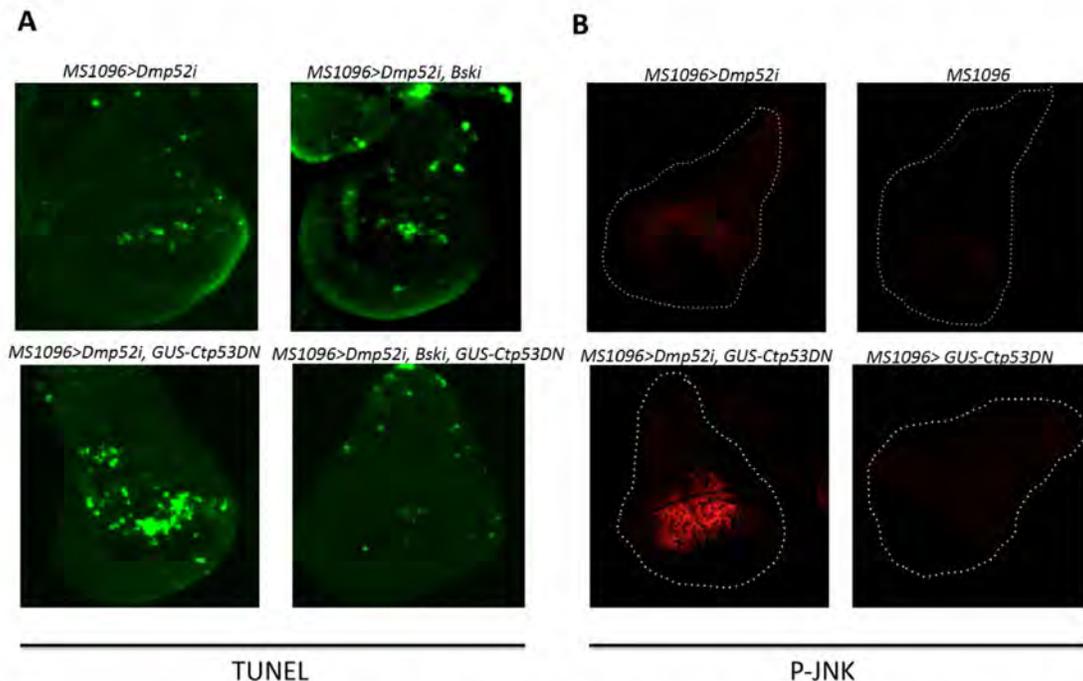


Fig. 8. Massive apoptotic cell death in *MS1096 >Dmp52i, GUS-Ctp53DN* discs is JNK-dependent. (A) The expression of dsRNAi against *Basket* (*Bski*) abolishes apoptosis induced in wing discs by loss of function of Dmp52 and Dp53 (lower panels), indicating that apoptosis in this background is JNK-dependent. However, apoptosis induced in Dmp52 depleted wing discs is partially *Bski*-independent, shown by the observation that it is not completely abolished when *Bski* is co-expressed in *MS1096 >Dmp52i* background (upper panels). (B) The depletion of Dmp52 activates the JNK pathway. However, the simultaneous depletion of Dmp52 and Dp53 induce an enhancement of JNK phosphorylation. Note that no signal is detected in the control genotypes.

we incubated wing discs *in vitro* with different concentrations of the compound at different times. We found that the incubation of same-age wild-type third instar larvae wing discs generated apoptosis in a dose- and time-dependent manner (supplementary material Fig. S8). From these studies, we decided to incubate the wing discs with 100 μ M triptolide for 3 hours. Under these conditions, the rate of apoptosis in all wing discs was similar to that observed in discs expressing the dsRNA against Dmp52 in the dorsal domain of the wing pouch using *MS1096* as a driver. We next incubated wing discs expressing the *GUS-Ctp53DN* dominant-negative form of Dp53 using the *MS1096* driver with triptolide and found that as in the case of the double depletion of Dmp52 and Dp53 in this wing compartment, an increase in apoptosis occurred (Fig. 9). Thus, the inhibition of the ATPase activity of the XPB subunit of TFIIH by triptolide in cells deficient in functional Dmp53 generates the same phenotype as when the TFIIH subunit Dmp52 and Dp53 are simultaneously depleted. We determined if the increase in apoptosis generated by the combined action of triptolide and the depletion of functional Dp53 was also JNK-dependent. We found that the depletion of JNK in wing discs treated with triptolide in a Dp53-deficient context reduced the number of apoptotic cells (Fig. 9). Therefore,

treatment with triptolide phenocopies all of the phenotypes produced by depleting Dmp52, Dp53 and JNK and supports the recent report that the target for this natural product is TFIIH (Titov et al., 2011). Reciprocally, these results also confirm that the phenotypes observed by the depletion of Dmp52 and Dmp34 using RNAi are indeed caused by deficiencies in TFIIH activities.

Discussion

TFIIH subunits play a role in at least three mechanisms that are critical for the cell: transcription by RNA pol II, DNA repair by NER and the control of the cell cycle. Therefore, disruption of TFIIH may cause a dramatic and generalised stressful situation for the cell. The depletion of TFIIH in the *Drosophila* wing disc produces wings that contain smaller and fewer cells per wing. The defects in growth may be produced by the global reduction of transcription, making this defect a minute-like phenotype, as we have previously described (Fregoso et al., 2007). However, the reduction in the total cell number is not due to a defect in cell proliferation or in delays in the entry to mitosis. As was documented in this work, the most obvious response to the absence of TFIIH is the induction of apoptosis, which may explain the deformation of the wing shape and the reduction in

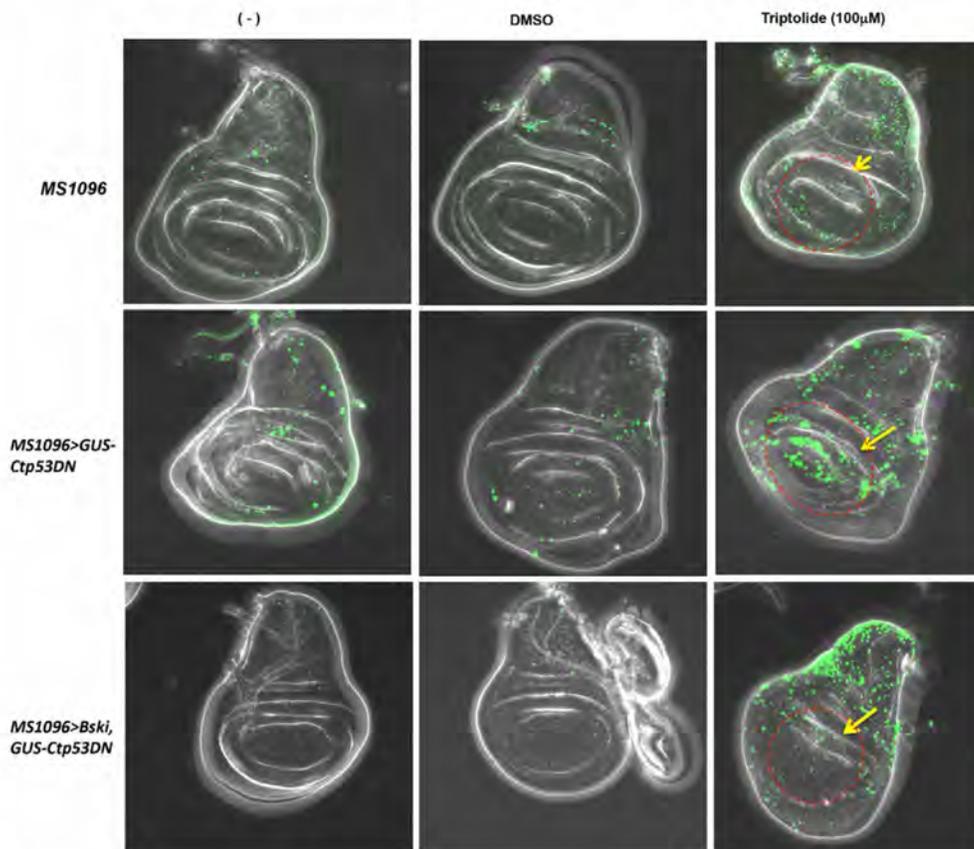


Fig. 9. Triptolide phenocopies the apoptotic induction in Dp53 depleted cells. Third instar imaginal wing discs carrying the *MS1096* driver or in combination with the Dp53 dominant negative (*GUS-Ctp53DN*) or the *GUS-CTP53DN* plus the *Bsk* RNAi were incubated for 3 hours in insect medium (see the Materials and Methods and supplementary material Fig. S8), alone or with DMSO (vehicle) or 100 μ M of triptolide, and tested for apoptosis by TUNEL assays. An increase in apoptotic bodies in the *MS1096 >GUS-CTP53DN* disc, in the *GAL4* expression domain (indicated by an arrow and a red circle), is observed. This phenotype is suppressed by the presence of the dsRNA that depletes *Bsk* at the same wing domain. Phenotypes are indicated in the figure.

the total number of cells in the wings depleted of Dmp52 or Dmp34.

Stimuli- and signalling-activated apoptosis is complex and context-dependent. In *Drosophila*, factors that induce apoptosis under different stress situations converge to produce an activation of caspases that cause the death of the cell (Shlevkov and Morata, 2012). Recently, it has been reported that E2F plays a dual role in apoptosis, as it is anti-death in Dp53-independent apoptosis and pro-death in Dp53-dependent apoptosis. Moreover, E2F and Dp53 are involved in inducing apoptosis in an independent manner during development, but both are required for apoptosis when DNA is damaged (Moon et al., 2008). However, in previous works, it has been reported that the apoptosis that is generated by the overexpression of p53 requires the presence of a functional TFIH (Robles et al., 1999; Merino et al., 2002). In this study, we found that when both TFIH and Dp53 were not functional in the wing imaginal disc, apoptosis was dramatically enhanced. This apoptosis is dependent on JNK, as the simultaneous depletion of Dmp52 and Dp53 induced the activation of JNK (P-JNK) at very high levels and the depletion of JNK abolished apoptosis. However, it is important to take in account that Ctp53DN or the *Dp53i* used in this work affects both Dp53 isoforms, and since both are capable to induce apoptosis (Dichtel-Danjoy et al., 2013), we can not differentiate if the effects that we are observing are due to the depletion of the activity of both Dp53 isoforms or just one.

Although Dp53 is a regulator of several processes (including the apoptotic response), some signals that activate apoptotic programmes are dependent on other proteins. The overexpression of the tumour suppressor LKB1 or the ZBP-89 protein generates an apoptotic cell death that is p53-independent but JNK-dependent, suggesting that this kinase may be an apoptosis instigator (Bai et al., 2004; Lee et al., 2006). Furthermore, it has been demonstrated that sirtuins can induce apoptosis mediated by JNK signalling independent of Dp53 (Griswold et al., 2008). Our results are consistent with previous reports that demonstrate that the response to ionising radiation (IR) in discs deficient in Dp53 and the checkpoint protein Chk1 (GRP in *Drosophila*) generates a strong JNK-dependent apoptotic phenotype (McNamee and Brodsky, 2009). In this situation, IR generates chromosomal aberrations, and the checkpoint controls mediated by Chk1 are not functional; cells that are still able to progress in the cell cycle but that contain chromosomal abnormalities (including aneuploidy) are thereby generated. The activation of JNK subsequently eliminates these cells by activating the apoptotic programme. On the other hand, it has been recently reported that aneuploidy induces a Dp53-independent apoptosis that requires JNK (Dekanty et al., 2012). However, the initial apoptosis that we observed to be caused by the depletion of Dmp52 was partially dependent on JNK, as in the absence of JNK, apoptotic bodies could still be detected in the wing discs. In other words, our results suggest that the initial absence of Dmp52 activates an apoptotic programme that does not completely depend on JNK but that likely depends on Dp53. Therefore, it appears that JNK is not a limiting factor required for the apoptosis that is induced by the depletion of Dmp52 but that when Dp53 function is compromised and TFIH activities are affected, the JNK pathway is over-activated to induce apoptosis. This pathway is likely similar to the pathway induced by IR in a Dp53- and Chk1-deficient cell. This point is supported by the demonstration that the absence of Dmp52 generates a loss of heterozygosity and

chromosomal aberrations (Fig. 5C) (Fregoso et al., 2007). Somehow, this condition may be equivalent to the generation of DNA damage by IR, and because TFIH also participates in DNA repair and the control of the cell cycle, it is possible that the checkpoint controls may not be completely operational. Other works have also demonstrated that a reduction in the number of repair proteins such as DDB1 generates chromosomal instability (Shimanouchi et al., 2006). Therefore, we propose that in the cells that are deficient in TFIH and Dp53, more chromosomal aberrations are generated because Dp53 also participates in the activation of DNA repair genes such as XPC and DDB2 (Adimoolam and Ford, 2002) and the response by the organism to avoid the propagation of these defects is to over-activate the JNK pathway and thereby induce apoptosis (Fig. 10). This model is supported by the fact that UV irradiation enhances the apoptosis observed in Dmp52- and Dp53-depleted cells. Furthermore, the reported evidence that defects in DNA repair and/or the reduction in transcription increases the levels of activated JNK, thus inducing a sustained apoptotic phenotype, supports this hypothesis (Roos and Kaina, 2006). Thus, the induction of massive cell death in the Dmp52 and Dp53 double-depleted cells may be a response to the accumulation of chromosomal aberrations, as we demonstrated in the LOH assay and by the reduction in transcription caused by the depletion of TFIH activities (Fig. 10). In addition the regulation of the active JNK (P-JNK) is mediated by the phosphatase Puckered (Puc); the expression of Puc is Dp53-dependent and therefore deficient in Dp53-depleted cells (McEwen and Peifer, 2005). All of these findings support the hypothesis of an induction of a JNK-dependent massive apoptosis in cells depleted of TFIH and Dp53.

In human p53-deficient cells undergoing DNA damage, treatment with caffeine for ATR inhibition sensitises cells to lethal Premature Chromatin Condensation, which is a process that has been shown to be independent of p53 function (Nghiem et al., 2001; Chanoux et al., 2009). Indeed, the elimination of apoptosis

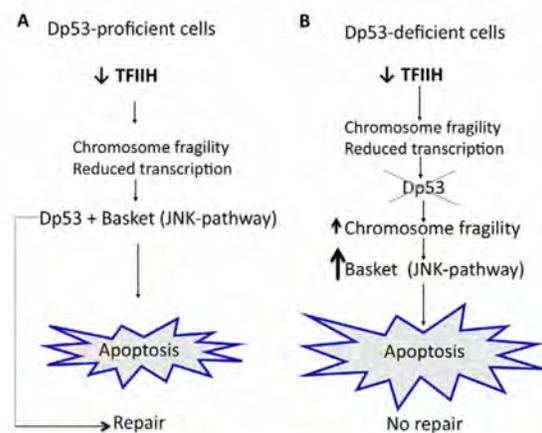


Fig. 10. Model of TFIH and Dmp53 interactions. (A) In a background of Dp53-proficient cells, reducing levels of TFIH relay a signal activating Dp53 and JNK. Activation of Dp53 could be involved in repair and to induce apoptosis. (B) However, in a background of Dp53-deficient cells, reducing levels of Dmp52 causes massive apoptosis on wing discs caused by an enhancement of P-JNK. The increment in apoptotic cell death could be due to an increment on DNA damage by the loss of function of Dmp52 and Dp53.

in wing cells depleted of Dmp52 by the expression of p35 generates a different phenotype than that observed in the wings of flies that were only Dmp52-depleted (Fig. 7). Because the depletion of Dmp52 causes chromosomal instability, it is possible that the absence of apoptosis allows for the proliferation of cells with chromosomal aberrations that generate this particular phenotype. Pérez-Garijo et al. (Pérez-Garijo et al., 2004) have demonstrated that the suppression of apoptosis by the caspase inhibitor p35 in irradiated wing discs generates developmental aberrations due to abnormal growth induced by the invasion and persistent misexpression of *wingless* (*wg*) and *decapentaplegic* (*dpp*) signalling. It is possible that the remaining damaged cells that were Dmp52-depleted and that expressed the caspase inhibitor p35 continued dividing and constantly emitted Wg and Dpp signals, thus contributing to the developmental abnormalities.

As mentioned above, our results suggest that the first response to the stress caused by the absence of a functional TFIIH is the induction of apoptosis by Dp53 and partially by the JNK pathway, in agreement with the feedback loop between Dmp53 and JNK that has been suggested to be essential for the apoptotic response to stress. However, when both TFIIH and Dp53 activities are depleted, this feedback loop may not be operating because Dp53 is not present (Shlevkov and Morata, 2012); this possibility suggests that if the feedback loop is affected by the absence of Dp53, the JNK pathway is over activated by the DNA repair and transcriptional stress generated by the absence of TFIIH and Dp53.

The results presented in this study have important implications for the understanding of the diseases associated with TFIIH mutations in humans, including cancer. Furthermore, the fact that the wing disc cells deficient in Dmp52 and Dp53 suffer massive cell death may have implications for the treatment of cancer cells. This observation is particularly relevant because of the recent discovery that the drug triptolide, which has potent antiproliferative and immunosuppressive activities and has been tested to be effective against cancer in preclinical trials, specifically targets the XPB subunit of TFIIH (Titov et al., 2011). In fact, we demonstrated that triptolide treatment of wing imaginal discs that are deficient in functional Dp53 phenocopied the JNK-dependent apoptotic phenotype observed in Dmp52-depleted discs. Most of the solid tumours in humans are deficient in p53 or in some of the modulators involved in p53-related functions; thus, it is possible that the treatment of different types of cancer cells with triptolide induces apoptosis through the JNK pathway, thus explaining the mechanism of the killing of cancer cells that has been demonstrated for this natural product. Similarly, drugs such as PRIMA have been shown to induce cell death in p53-mutated cancer cell lines through a JNK pathway (Li et al., 2005). Therefore, to search for possible targets for future cancer therapies, it will be important to determine if p53-deficient cancer cells are more susceptible to apoptosis than normal cells when TFIIH is affected.

The manner in which the phenotypes caused by the genetic interaction between Dmp52 and Dp53 are related to the physical interactions between the two molecules is not clear at this point. However, it is interesting that we can detect these physical interactions in fly cells without causing DNA damage, suggesting a dynamic behaviour between TFIIH and Dp53, two factors that establish interactions with other factors involved in DNA damage and transcription. Also relevant is the report that human cells deficient in the TFIIH subunits XPD and XPB are deficient in the

induction of apoptosis by the overexpression of p53 (Robles et al., 1999). Our own research has shown that the same condition occurs when Dp53 is overexpressed in flies with a mutated version of the *Drosophila* homologue of XPB (Merino et al., 2002). Interestingly, we found that the depletion of Dmp52 induced apoptosis, and that, in the absence of Dp53, this apoptosis is not suppressed but rather enhanced in a JNK-dependent manner. Thus, the data concerning p53 overexpression and the lack of function of Dp53 in a TFIIH-deficient context are not easy to reconcile. The analysis of the overexpression experiments can generate many different interpretations. In this particular case, because TFIIH is essential for the expression of most of the RNA pol II-transcribed genes and because p53 is a transcription factor that activates the expression of pro-apoptotic genes and physically interacts with TFIIH, the reduction in the activity of TFIIH may affect the expression of these pro-apoptotic genes directly. An explanation may be that the expression of genes induced by the ectopic expression of a transcription factor such as p53 is more sensitive to the general reduction in transcription. Indeed, the incubation of fly embryos with low doses of α -amanitin suppresses the homeotic transformations caused by the overexpression of homeotic genes without affecting other genes (Gutiérrez et al., 2004). However, we cannot rule out the possibility that the enhancement in apoptosis by the simultaneous depletion of TFIIH and Dp53 may be related to the direct interaction between these two factors. Nevertheless, there is a clear functional link between TFIIH and p53 in human and *Drosophila* cells, and these interactions are relevant not only for understanding the manifestations present in humans with affected TFIIH but also for the understanding of cancer and the possible targeting of these interactions in future therapies.

Materials and Methods

Drosophila stocks

Flies were grown in standard meal to 25°C, unless another temperature was indicated. The *Drosophila* strains include: *en-gal4*, *MS1096^{ox}*, *eyeless-Gal4*, *Sgs3-Gal4*, *UAS-DicerIII*, *UAS-p35*, *TubP-Gal80^D*, *GUS-Ctp53DN/TM6B*, *UASp53i*, *UAS-p53* and *mwh¹* were obtained from Bloomington *Drosophila* Stock Center. Stock generating RNAi against *Dmp52* (v39069), *Dmp34* (v101309) and *Basket* (v34138) was provided by Vienna *Drosophila* RNAi Center.

Pulldown assay

For interaction assays, overexpression of Dmp52 fused to GST in bacteria was induced with 0.4 mM IPTG during 4 h. GST-Dmp52 was purified using Glutathione-Sepharose (Amersham). Pulldown assays were performed as reported in Valadez-Graham et al. (Valadez-Graham et al., 2012).

Cell culture, transfection and co-immunoprecipitation

Dmp52, DANp53 and Dp53 were cloned into *EcoRI/XhoI* sites of pAc5.1/V5-HisA vector (Invitrogen). 3 \times -FLAG was cloned in pAc5.1/HisA generating a carboxy- and amino-termini 3 \times -FLAG where Dmp52, Dp53 and DANp53 were cloned.

Drosophila S2R¹ cells were maintained in Schneider medium with 10% fetal bovine serum and 100 μ g streptomycin/0.25 μ g amphotericin. Cells were cotransfected with 10 μ g of each construction by calcium method. Forty-eight hours after transfection, the cells were collected and lysed. Lysates were clarified to 13,000 rpm at 4°C. CoIPs were performed as indicated in Herrera-Cruz et al. (Herrera-Cruz et al., 2012).

Antibodies

Antibodies used were Dp53: D-200 and H3 (both antibodies recognize the two Dp53 isoforms), p62 Q-19, p89 S-19 and Cdk7 ds-17 (Santa Cruz); Dp53-H3 and Anti-BrdU G3G4 (Hybridoma Bank). Dmp52 antibody was raised using a carboxy-terminal peptide (-CDVKRYWKKYKSGV-) by New England Peptides.

TUNEL assay in wing discs

Third instar imaginal discs wing were dissected in PBS and fixed in 4% formaldehyde during 20 min. Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL) assay was performed using the In-Situ-Cell-Death-Detection-kit (Roche). For the quantitative analysis all discs were treated in the

same conditions. The region of interest was then selected and then the number particles at the highest intensity (255 arbitrary units) were quantified using the Image-J software (NIH). In each image analysed a high-density threshold corresponding with the labeling of the TUNEL reaction was adjusted. Standard Deviations were calculated using Microsoft Excel.

Wing disc immunostaining

For BrdU immunostaining, imaginal wing disc was incubated in 75 µg/ml BrdU in complete Schneider medium for 30 min at room temperature. Tissue was fixed with 4% formaldehyde, permeabilised 30 min in PBS with 0.6% Triton X-100 and DNA was denatured for 30 min with 2N HCl. BrdU was detected by mouse anti-BrdU at dilution 1:5,000. For other immunostaining, wing disc was dissected in PBS, fixed in 4% formaldehyde in PBS during 30 min and permeabilised 30 min in PBS with 0.6% Triton X-100. Rabbit anti-H3Pser10 was used at 1:1,000. Secondary antibodies Alexa Fluor 568 goat anti-mouse and goat anti-rabbit (Invitrogen) were used at 1:250 dilutions. Rabbit anti-pJNK (Abcam) was used 1:100.

Phenotypic analyses of wings and bristle counting

Female wings were collected in ethanol and fixated with lactic acid:ethanol 6:5 and mounted. Cell density and total number cells was calculated as described by Moon et al. considering the number of hairs per defined area of 0.01 mm² (Moon et al., 2008). Wing area was measured using ImageJ 1.28u. For determining anterior and posterior areas with *en-GAL4*, we considered veinL4 as the boundary between both compartments. A minimum of 10 wings were analyzed per genotype. Two-sided *t*-tests were performed to determine significant differences.

Loss of heterozygosity assay

Larvae heterozygous for *mwh¹* were obtained by crossing MS1096;+/+; *mwh¹* females with *Dmp52i* males. All surviving flies were collected and wings were dissected and mounted. Only cells with three or more hairs were scored as the *mwh¹* phenotype (de Andrade et al., 2004).

Total extracts and western blot

Total extracts from salivary glands was performed as described previously (Palomera-Sanchez et al., 2010). Gels were transferred into nitrocellulose membranes and were revealed for western blot using an ECL chemiluminescence detection kit (Amersham).

Triptolide treatment

Third instar larval wing imaginal discs from *Ore R*, MS1096, MS1096; *Bski*, MS1096;+/+; *GUS-ctp53DN* or MS1096; *Bski*; *GUS-ctp53DN* dissected in PBS were incubated in Shields and Sang M3 insect medium (Sigma) supplemented with 2% fetal bovine serum and 1% penicillin-streptomycin (Gibco) in presence or absence of 100 µM TPL (Biovision) or DMSO at 25°C for different times periods. Discs were washed once with the same medium without drug, fixed in 4% formaldehyde in PBS for 20 minutes and washed three times for 10 minutes with PBST (PBS with 0.3% Triton X-100). Then apoptosis was determined by TUNEL assay as described.

Acknowledgements

We thank Andrés Saralegui for his advice in microscopy. We also thank Dr Martha Vazquez and Dr Viviana Valadez-Graham for discussions about this work.

Author contributions

C.V. and G.C. performed experimental work, C.V., G.C. and M.Z. designed the project and analyzed the results and wrote the paper.

Funding

This study was supported by the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)/Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) [grant number IN 20109-3]; the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) [grant number 127440]; Ixtli/UNAM; and the Fundación Miguel Alemán.

Supplementary material available online at

<http://jcs.biologists.org/lookup/suppl/doi:10.1242/jcs.122721/-/DC1>

References

Adimoolam, S. and Ford, J. M. (2002). p53 and DNA damage-inducible expression of the xeroderma pigmentosum group C gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 12985-12990.

- Akhtar, M. S., Heidemann, M., Tietjen, J. R., Zhang, D. W., Chapman, R. D., Eick, D. and Ansari, A. Z. (2009). TFIH kinase places bivalent marks on the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Mol. Cell* **34**, 387-393.
- Bai, L., Yoon, S. O., King, P. D. and Merchant, J. L. (2004). ZBP-89-induced apoptosis is p53-independent and requires JNK. *Cell Death Differ.* **11**, 663-673.
- Bergoglio, V. and Magnaldo, T. (2006). Nucleotide excision repair and related human diseases. *Genome Dyn.* **1**, 35-52.
- Bourdon, J. C., Fernandes, K., Murray-Zmijewski, F., Liu, G., Diot, A., Xirodimas, D. P., Saville, M. K. and Lane, D. P. (2005). p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev.* **19**, 2122-2137.
- Brady, C. A. and Attardi, L. D. (2010). p53 at a glance. *J. Cell Sci.* **123**, 2527-2532.
- Brodsky, M. H., Nordstrom, W., Tsang, G., Kwan, E., Rubin, G. M. and Abrams, J. M. (2000). Drosophila p53 binds a damage response element at the reaper locus. *Cell* **101**, 103-113.
- Chanoux, R. A., Yin, B., Urtishak, K. A., Asare, A., Bassing, C. H. and Brown, E. J. (2009). ATR and H2AX cooperate in maintaining genome stability under replication stress. *J. Biol. Chem.* **284**, 5994-6003.
- Chymkowitch, P., Le May, N., Charneau, P., Compe, E. and Egly, J. M. (2011). The phosphorylation of the androgen receptor by TFIH directs the ubiquitin/proteasome process. *EMBO J.* **30**, 468-479.
- Coin, F., Oksenysh, V. and Egly, J. M. (2007). Distinct roles for the XPB/p52 and XPD/p44 subcomplexes of TFIH in damaged DNA opening during nucleotide excision repair. *Mol. Cell* **26**, 245-256.
- Coin, F., Oksenysh, V., Mocquet, V., Groh, S., Blattner, C. and Egly, J. M. (2008). Nucleotide excision repair driven by the dissociation of CAK from TFIH. *Mol. Cell* **31**, 9-20.
- de Andrade, H. H., Reguly, M. L. and Lehmann, M. (2004). Wing somatic mutation and recombination test. *Methods Mol. Biol.* **247**, 389-412.
- Dekanty, A., Barrio, L., Muzzopappa, M., Auer, H. and Milán, M. (2012). Aneuploidy-induced delaminating cells drive tumorigenesis in Drosophila epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 20549-20554.
- Di Lello, P., Miller Jenkins, L. M., Mas, C., Langlois, C., Malitskaya, E., Fradet-Turcotte, A., Archambault, J., Legault, P. and Omichinski, J. G. (2008). p53 and TFIIE alpha share a common binding site on the Tfb1/p62 subunit of TFIH. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 106-111.
- Dichtel-Danjoy, M.-L., Ma, D., Dourlen, P., Chatelain, G., Napoletano, F., Robin, M., Corbet, M., Levet, C., Hafs, H., Hainaut, P. et al. (2013). Drosophila p53 isoforms differentially regulate apoptosis and apoptosis-induced proliferation. *Cell Death Differ.* **20**, 108-116.
- Egly, J. M. and Coin, F. (2011). A history of TFIH: two decades of molecular biology on a pivotal transcription/repair factor. *DNA Repair (Amst.)* **10**, 714-721.
- Esnault, C., Ghavi-Helm, Y., Brun, S., Soutourina, J., Van Berkum, N., Boschiero, C., Holstege, F. and Werner, M. (2008). Mediator-dependent recruitment of TFIH modules in preinitiation complex. *Mol. Cell* **31**, 337-346.
- Fregoso, M., Lainé, J. P., Aguilar-Fuentes, J., Mocquet, V., Reynaud, E., Coin, F., Egly, J. M. and Zurita, M. (2007). DNA repair and transcriptional deficiencies caused by mutations in the Drosophila p52 subunit of TFIH generate developmental defects and chromosome fragility. *Mol. Cell Biol.* **27**, 3640-3650.
- Fuller, M. T., Regan, C. L., Green, L. L., Robertson, B., Deuring, R. and Hays, T. S. (1989). Interacting genes identify interacting proteins involved in microtubule function in Drosophila. *Cell Motil. Cytoskeleton* **14**, 128-135.
- Glover-Cutter, K., Larochelle, S., Erickson, B., Zhang, C., Shokat, K., Fisher, R. P. and Bentley, D. L. (2009). TFIH-associated Cdk7 kinase functions in phosphorylation of C-terminal domain Ser7 residues, promoter-proximal pausing, and termination by RNA polymerase II. *Mol. Cell Biol.* **29**, 5455-5464.
- Griswold, A. J., Chang, K. T., Runko, A. P., Knight, M. A. and Min, K. T. (2008). Sir2 mediates apoptosis through JNK-dependent pathways in Drosophila. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 8673-8678.
- Gutiérrez, L., Merino, C., Vázquez, M., Reynaud, E. and Zurita, M. (2004). RNA polymerase II 140wimp mutant and mutations in the TFIH subunit XPB differentially affect homeotic gene expression in Drosophila. *Genesis* **40**, 58-66.
- Herrera-Cruz, M., Cruz, G., Valadez-Graham, V., Fregoso-Lomas, M., Villicaña, C., Vázquez, M., Reynaud, E. and Zurita, M. (2012). Physical and functional interactions between Drosophila homologue of Swc6/p18Hamlet subunit of the SWR1/SRCAP chromatin-remodeling complex with the DNA repair/transcription factor TFIH. *J. Biol. Chem.* **287**, 33567-33580.
- Ito, S., Kuraoka, I., Chymkowitch, P., Compe, E., Takedachi, A., Ishigami, C., Coin, F., Egly, J. M. and Tanaka, K. (2007). XPG stabilizes TFIH, allowing transactivation of nuclear receptors: implications for Cockayne syndrome in XP-G/CS patients. *Mol. Cell* **26**, 231-243.
- Ito, S., Tan, L. J., Andoh, D., Narita, T., Seki, M., Hirano, Y., Narita, K., Kuraoka, I., Hiraoka, Y. and Tanaka, K. (2010). MMXD, a TFIH-independent XPD-MMS19 protein complex involved in chromosome segregation. *Mol. Cell* **39**, 632-640.
- Jawhari, A., Lainé, J. P., Dubaele, S., Lamour, V., Poterszman, A., Coin, F., Moras, D. and Egly, J. M. (2002). p52 Mediates XPB function within the transcription/repair factor TFIH. *J. Biol. Chem.* **277**, 31761-31767.
- Ko, L. J., Shieh, S. Y., Chen, X., Jayaraman, L., Tamai, K., Taya, Y., Prives, C. and Pan, Z. Q. (1997). p53 is phosphorylated by CDK7-cyclin H in a p36MAT1-dependent manner. *Mol. Cell Biol.* **17**, 7220-7229.
- Lee, J. H., Koh, H., Kim, M., Park, J., Lee, S. Y., Lee, S. and Chung, J. (2006). JNK pathway mediates apoptotic cell death induced by tumor suppressor LKB1 in Drosophila. *Cell Death Differ.* **13**, 1110-1122.

- Léveillard, T., Andera, L., Bissonnette, N., Schaeffer, L., Bracco, L., Egly, J. M. and Wasyluk, B. (1996). Functional interactions between p53 and the TFIIH complex are affected by tumour-associated mutations. *EMBO J.* **15**, 1615-1624.
- Li, Y., Mao, Y., Brandt-Rauf, P. W., Williams, A. C. and Fine, R. L. (2005). Selective induction of apoptosis in mutant p53 premalignant and malignant cancer cells by PRIMA-1 through the c-Jun-NH2-kinase pathway. *Mol. Cancer Ther.* **4**, 901-909.
- Liu, Q. (2011). Triptolide and its expanding multiple pharmacological functions. *Int. Immunopharmacol.* **11**, 377-383.
- Luo, X., Puig, O., Hyun, J., Bohmann, D. and Jasper, H. (2007). Foxo and Fos regulate the decision between cell death and survival in response to UV irradiation. *EMBO J.* **26**, 380-390.
- Martin, F. A., Pérez-Garijo, A. and Morata, G. (2009). Apoptosis in Drosophila: compensatory proliferation and undead cells. *Int. J. Dev. Biol.* **53**, 1341-1347.
- McEwen, D. G. and Peifer, M. (2005). Puckered, a Drosophila MAPK phosphatase, ensures cell viability by antagonizing JNK-induced apoptosis. *Development* **132**, 3935-3946.
- McNamee, L. M. and Brodsky, M. H. (2009). p53-independent apoptosis limits DNA damage-induced aneuploidy. *Genetics* **182**, 423-435.
- Merino, C., Reynaud, E., Vázquez, M. and Zurita, M. (2002). DNA repair and transcriptional effects of mutations in TFIIH in Drosophila development. *Mol. Biol. Cell* **13**, 3246-3256.
- Mesquita, D., Dekanty, A. and Milán, M. (2010). A dp53-dependent mechanism involved in coordinating tissue growth in Drosophila. *PLoS Biol.* **8**, e1000566.
- Moon, N. S., Di Stefano, L., Morris, E. J., Patel, R., White, K. and Dyson, N. J. (2008). E2F and p53 induce apoptosis independently during Drosophila development but intersect in the context of DNA damage. *PLoS Genet.* **4**, e1000153.
- Nghiem, P., Park, P. K., Kim, Y., Vaziri, C. and Schreiber, S. L. (2001). ATR inhibition selectively sensitizes G1 checkpoint-deficient cells to lethal premature chromatin condensation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 9092-9097.
- Okuda, M., Tanaka, A., Satoh, M., Mizuta, S., Takazawa, M., Ohkuma, Y. and Nishimura, Y. (2008). Structural insight into the TFIIH-TFIIH interaction: TFIIH and p53 share the binding region on TFIIH. *EMBO J.* **27**, 1161-1171.
- Palomera-Sanchez, Z., Bucio-Mendez, A., Valadez-Graham, V., Reynaud, E. and Zurita, M. (2010). Drosophila p53 is required to increase the levels of the dKDM4B demethylase after UV-induced DNA damage to demethylate histone H3 lysine 9. *J. Biol. Chem.* **285**, 31370-31379.
- Pérez-Garijo, A. F., Martin, F. A. and Morata, G. (2004). Caspase inhibition during apoptosis causes abnormal signalling and developmental aberrations in Drosophila. *Development* **131**, 5591-5598.
- Quijano, J. C., Stinchfield, M. J. and Newfeld, S. J. (2011). Wg signaling via Zw3 and mad restricts self-renewal of sensory organ precursor cells in Drosophila. *Genetics* **189**, 809-824.
- Robles, A. L., Wang, X. W. and Harris, C. C. (1999). Drug-induced apoptosis is delayed and reduced in XPD lymphoblastoid cell lines: possible role of TFIIH in p53-mediated apoptotic cell death. *Oncogene* **18**, 4681-4688.
- Roos, W. P. and Kaina, B. (2006). DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol. Med.* **12**, 440-450.
- Shimanouchi, K., Takata, K., Yamaguchi, M., Murakami, S., Ishikawa, G., Takeuchi, R., Kanai, Y., Ruike, T., Nakamura, R., Abe, Y. et al. (2006). Drosophila damaged DNA binding protein 1 contributes to genome stability in somatic cells. *J. Biochem.* **139**, 51-58.
- Shlevkov, E. and Morata, G. (2012). A dp53/JNK-dependant feedback amplification loop is essential for the apoptotic response to stress in Drosophila. *Cell Death Differ.* **19**, 451-460.
- Titov, D. V., Gilman, B., He, Q. L., Bhat, S., Low, W. K., Dang, Y., Smeaton, M., Demain, A. L., Miller, P. S., Kugel, J. F. et al. (2011). XPB, a subunit of TFIIH, is a target of the natural product triptolide. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 182-188.
- Valadez-Graham, V., Yoshioka, Y., Velazquez, O., Kawamori, A., Vázquez, M., Neumann, A., Yamaguchi, M. and Zurita, M. (2012). XNP/dATR interacts with DREF in the chromatin to regulate gene expression. *Nucleic Acids Res.* **40**, 1460-1474.
- Wang, X. W., Vermeulen, W., Coursen, J. D., Gibson, M., Lupold, S. E., Forrester, K., Xu, G., Elmore, L., Yeh, H., Hoeijmakers, J. H. et al. (1996). The XPB and XPD DNA helicases are components of the p53-mediated apoptosis pathway. *Genes Dev.* **10**, 1219-1232.
- Wang, Q. E., Zhu, Q., Wani, M. A., Wani, G., Chen, J. and Wani, A. A. (2003). Tumor suppressor p53 dependent recruitment of nucleotide excision repair factors XPC and TFIIH to DNA damage. *DNA Repair (Amst.)* **2**, 483-499.
- Wells, B. S. and Johnston, L. A. (2012). Maintenance of imaginal disc plasticity and regenerative potential in Drosophila by p53. *Dev. Biol.* **361**, 263-276.
- Zurita, M. and Merino, C. (2003). The transcriptional complexity of the TFIIH complex. *Trends Genet.* **19**, 578-584.