



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EL EFECTO DE LA DISMINUCION DE TnaA EN EL DESARROLLO DE
Drosophila melanogaster

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
MARCO ANTONIO ROSALES VEGA

DRA. MARTHA VERÓNICA VÁZQUEZ LASLOP
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

DRA. SVETLANA SHISHKOVA
DR. JOSÉ LUIS REYES TABOADA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

Ciudad de México. Mayo, 2016



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.

A mis padres, y hermano

Por ser el motivo de inspiración para
hacer esta tesis por cuidarme y
quererme cuando mas
lo necesitaba.

Gracias.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a Sofía. Por todo, por tu amor, tu paciencia y comprensión. Por escucharme cuando lo necesitaba y por hablar cuando era necesario.

A mi papá Juan Antonio porque siempre has tenido fe en mi y me has impulsado a seguir adelante desde que era un niño. Gracias por educarme con el ejemplo, con respeto y amor por los demás.

A mi mamá Micaela, quien todos los días me enseña algo nuevo, aun cuando no se lo proponga, gracias por ser un ejemplo y por ayudarme a dar lo mejor de mi

A mi hermano y amigo Mauricio Antonio, quien me inspira desde pequeño a ser quien soy. Para un hermano pequeño, las cosas que compartes con tu hermano nunca se olvidan. Gracias por ser como eres y por dar lo mejor de ti desde que era pequeño.

Por otro lado, quisiera agradecer de corazón mi mamá Académica Martha Vázquez, mi tutora de tesis, quien me dio la magnífica oportunidad de trabajar con ella. Gracias por darme motivación cuando más la necesitaba, gracias por empujarme cuando era necesario y por discutir mis datos con tanta emoción y alegría.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio Maritere, Alyeri, Silvia, Grisel, Sara, Cynthia, Adriana, Andrea, Joselyn, Juan Manuel, Samantha.

A todos los amigos y familiares que pudiera estar omitiendo, gracias.

Dejo para el final, por ser el agradecimiento más importante a Dios, por trazar el sendero por el que mi espíritu avanza, por darme sabiduría y paciencia durante todo este tiempo. GRACIAS.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

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

Durante este trabajo se obtuvo apoyo económico por parte del Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) para la asistencia al congreso de genética de *Drosophila* con sede en Chicago en Marzo de 2014.

Este trabajo recibió apoyos de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) no. IN202613 e IN208316 y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) no. 99654.

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

Dra. Martha Verónica Vázquez Laslop	Instituto de Biotecnología, UNAM
Dra. Dra. Svetlana Shishkova	Instituto de Biotecnología, UNAM
Dr. Dr. José Luis Reyes Taboada	Instituto de Biotecnología, UNAM

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

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

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Los genes homeóticos	2
1.2 La regulación de la expresión de los genes <i>Hox</i>	2
1.3 Los complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP en <i>Drosophila</i>	4
1.4 El papel de las subunidades Osa y Brahma en la remodelación de la cromatina.....	5
1.5 La SUMOilación y su papel en la regulación de la expresión de los genes <i>Hox</i>	5
1.6 Desarrollo de los discos de halterio en <i>Drosophila</i>	7
1.7 <i>Ubx</i> y su importancia en el desarrollo de las quetas del halterio	9
1.8 Formación y eversión de la cabeza durante la etapa de pupa en <i>Drosophila</i>	10
2. ANTECEDENTES.....	11
2.1 TnaA en la regulación de la expresión de los genes <i>Hox</i>	11
3. HIPÓTESIS	12
4. JUSTIFICACIÓN.....	13
5. OBJETIVOS.....	13
5.1 Objetivo General	13
5.2 Objetivos Particulares	14
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
6.1 Medios utilizados para la alimentación y mantenimiento de las moscas.	15
6.2 Genética general: cruzas, cuidado de las moscas y conteo de moscas adultas.	15
6.3 El sistema de expresión génica <i>UAS-GAL4</i> para la expresión de los <i>RNAi-tna</i>	16
6.4 Líneas de moscas que producen GAL4 en patrones específicos (“drivers”) y RNAs de interferencia contra <i>tna</i>	17
6.5 Características de las mutantes de la vía de SUMOilación y del <i>RNAi-smt318</i>	
6.6 Ensayo para determinar la viabilidad de las moscas con disminución ubicua de <i>tna</i>	20
6.7 Preparación de cutículas de halterios disecados	20
6.8 Análisis de proteínas por ensayo tipo Western	21

6.8.1	Obtención de extractos y muestras.....	21
6.8.2	Separación de las proteínas del extracto o muestra por SDS/PAGE.	22
6.8.3	Transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa	23
6.8.4	Inmunodetección de las proteínas de interés	24
6.8.5	Revelado de la película radiográfica por quimioluminiscencia	24
6.9	Purificación de las proteínas GST y GST-XSPRING producidas a partir de un cultivo de <i>E. coli</i>	25
7.	RESULTADOS	28
7.1	Los <i>RNAi-tna</i> tienen una alta probabilidad de promover únicamente la disminución de los mRNAs de <i>tna</i>	29
7.2	La disminución ubicua de <i>tna</i> con el <i>RNAi-tna^{TRiP}</i> causa letalidad en la etapa adulta.....	29
7.3	La disminución ubicua de TnaA en combinación con mutantes de la vía de SUMOilación rescata al fenotipo de letalidad.....	32
7.4	La expresión ubicua del <i>RNAi-tna^{TRiP}</i> abate la expresión de TnaA en larvas de tercer instar.	34
7.5	La disminución ubicua de <i>tna</i> con el <i>RNAi-tna^{TRiP}</i> causa letalidad en la etapa de pupa y la aparición de defectos en la eversión de la cabeza.....	35
7.6	La disminución de TnaA provoca transformaciones homeóticas parciales de halterio a ala.....	39
7.7	La disminución de TnaA y de SUMO en el disco del halterio aumenta la expresividad de la transformación de halterio a ala.	43
7.8	Disminución de TnaA en glándulas salivales de larvas de tercer instar	47
8.	DISCUSIÓN	49
8.1	TnaA en la supervivencia de <i>D. melanogaster</i>	49
8.2	TnaA en el desarrollo y la eversión de la cabeza.....	49
8.3	TnaA y la vía de SUMOilación en la expresión de <i>Ubx</i>	50
8.4	TnaA y la vía de SUMOilación en la supervivencia de las moscas adultas ..	52
9.	CONCLUSIONES	53
10.	PERSPECTIVAS	54
	REFERENCIAS	55
	ANEXOS	61
1.	Secuencias blanco de los <i>RNAi-tna</i>	61
2.	Los <i>RNAi-tna</i> tienen una alta probabilidad de promover únicamente la disminución de los mRNAs de <i>tna</i>	62

3. El anticuerpo Anti-TnaA_{XSPRING} reconoce a TnaA en extractos proteicos de larvas completas y de glandulas salivales.63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Expresión de los genes <i>Hox</i> durante el desarrollo de <i>Drosophila melanogaster</i>	3
Figura 2. Los complejos remodeladores de la cromatina BAP y PBAP en <i>Drosophila melanogaster</i>	4
Figura 3. Desarrollo y anatomía del halterio.	8
Figura 4. Eversión de la cabeza en la pupa de <i>Drosophila</i>	9
Figura 5. Características de los mRNAs de <i>tna</i> y de las proteínas codificadas. ...	12
Figura 6. Estrategia para la disminución de los niveles de expresión de TnaA.	17
Figura 7. Mapa molecular, transcritos, RNAi y alelos del gen <i>smt3</i>	19
Figura 8. Mapa molecular de <i>lwr</i> , alelos y transcritos.	20
Figura 9. Las moscas con bajas dosis de TnaA viven menos.	31
Figura 10. Disminución ubicua de TnaA en larvas de tercer instar que expresan al <i>RNAi-tna^{TRiP}</i> a 28°C.	34
Figura 11. Las larvas de tercer instar machos son más sensibles a la disminución ubicua de TnaA que las hembras.	35
Figura 12. Algunas pupas con disminución ubicua de TnaA mueren durante el proceso de eversión de la cabeza.	38
Figura 13. TnaA se expresa en el disco del halterio y del ala.	40
Figura 14. La expresión del <i>RNAi-tna^{TRiP}</i> causa una transformación homeótica parcial de halterio en ala.	42
Figura 15. La disminución de TnaA y SUMO con el “driver” <i>A9-GAL4</i> en el disco de halterio provoca aparición de quetas ectópicas y defectos en el desarrollo del capitel.	44
Figura 16. La disminución de TnaA y de SUMO con el “driver” <i>MS1096-GAL4</i> en el disco de halterio provoca defectos en el desarrollo del capitel.	45
Figura 17. La disminución de TnaA y SUMO con el “driver” <i>MS1096-GAL4</i> en el disco de ala provoca defectos en el desarrollo de las alas y de las macroquetas del tórax.	46
Figura 18. Disminución de TnaA en glándulas salivales de larvas de tercer instar que expresan el <i>RNAi-tna^{TRiP}</i> a 28°C.	48

Figura 19. Posible localización de la célula con bajos niveles de Ubx.	51
Figura S1. Los RNAi-tnaTRiP y RNAi-tnaVIII complementan específicamente secuencias del mRNA de tna.	62
Figura S2. El anticuerpo anti-TnaA _{XSPRING} purificado reconoce a TnaA.	63

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Letalidad de las moscas que expresan el <i>RNAi-tna</i> de manera ubicua...30	30
Tabla 2. Supresión de la letalidad causada por la expresión ubicua del <i>RNAi-tna^{TRiP}</i> en individuos defectuosos en la vía de SUMOilación.32	32
Tabla 3. La expresión ubicua del <i>RNAi-smt3</i> es letal.....33	33
Tabla 4. Los individuos con bajos niveles de TnaA mueren en etapa de pupa.37	37
Tabla 5. La expresión del <i>RNAi-tna^{TRiP}</i> y/o del <i>RNAi-smt3</i> dirigido(s) al disco del halterio causa transformaciones homeóticas parciales de halterio en ala.41	41

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

abd-A. *abdominal A*

Abd-B. *Abdominal B*

Antp. *Antennapedia*

APF. After Puparium Formation

brm. *brahma*

Dfd. *Deformed*

lab. *labial*

lwr. *lesswright*

pb. *proboscipedia*

PcG. Grupo Polycomb

PRE "Polycomb Responsive Element"

Scm. *Sex combs on midleg*

Scr. *Sex combs reduced*

smt3. *Supressor of Mif Two 3*

SUMO. Small Ubiquitin Modifier

tna. *tonalli*

TrxG. Grupo Trithorax

Ubx. *Ultrabithorax*

RESUMEN

Las proteínas del grupo trithorax regulan positivamente la expresión de los genes homeóticos. TnaA es una proteína del grupo trithorax presente en *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) que regula la expresión de los genes homeóticos *Antennapedia*, *Ultrabithorax* y *Sex combs reduced*. *tna* fue identificado por su interacción genética con *brahma* (*brm*) que codifica a la subunidad ATPasa de los complejos remodeladores de la cromatina del tipo BRAHMA y con *osa* que codifica a una subunidad exclusiva del complejo BRAHMA BAP. TnaA es una proteína con un dominio XSPRING que contiene un dedo de zinc tipo SP-RING, característico de un tipo de E3-ligasas de SUMO. La SUMOilación es una modificación postraduccional de proteínas que causa cambios en su función y/o localización. La caracterización de TnaA producida por diferentes alelos mutantes de *tna*, que incluyen mutaciones puntuales, mutaciones por inserción de transposones y deleciones mostró que en ningún caso se producen bajas dosis de TnaA. Entonces, para poder estudiar el efecto de la falta de función de TnaA en el desarrollo de *D. melanogaster*, en este trabajo se disminuyó la dosis de TnaA utilizando RNA de interferencia en individuos vivos. Se utilizaron dos diferentes RNAs contra regiones similares de los mRNAs de *tna*, el *RNAi-tna^V* y el *RNAi-tna^{TRIP}* y encontramos mejores efectos con el segundo. El *RNAi-tna^{TRIP}* promovió una disminución de TnaA en larvas de tercer instar, lo cual causó letalidad en etapas posteriores. Las pupas con dosis disminuidas de TnaA murieron tanto en el período temprano como en el tardío de esta etapa. Algunos de estos individuos presentaron un defecto en la eversión de la cabeza y la frecuencia del defecto aumentó conforme disminuye TnaA. Las moscas adultas con bajas dosis de TnaA vivieron menos que las moscas silvestres y cuando el *RNAi-tna^{TRIP}* se expresó únicamente en el disco de halterio se observaron transformaciones homeóticas parciales de halterio a ala. Notoriamente, cuando se disminuyeron las dosis de TnaA y de SUMO en el disco del halterio, la expresividad del fenotipo aumentó, lo cual podría indicar una mayor disminución de los niveles de *Ubx*. Con este sistema, obtuvimos larvas de tercer instar cuyas glándulas salivales tenían dosis muy disminuidas de TnaA para estudiar posteriormente el papel de TnaA en el reclutamiento de Osa a la cromatina.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Los genes homeóticos

Los genes homeóticos (*Hox*) de *Drosophila* determinan la identidad de los segmentos corporales. Cada gen *Hox* se expresa sólo en los segmentos corporales correspondientes desde sus primordios en etapas embrionarias. El desbalance de la función de los genes *Hox* provoca el cambio de identidad de los segmentos de la mosca, lo que se conoce como transformación homeótica. Por ejemplo, las mutaciones de ganancia de función en el gen *Antennapedia* (*Antp*) promueven el desarrollo de patas en la cabeza en vez de antenas (revisado en Kennison, 2004; y en Maeda y Karch, 2010). Otro ejemplo importante es el del gen *Ultrabithorax* (*Ubx*). Cuando se pierde su función, el tercer segmento torácico se desarrolla incorrectamente lo que permite el desarrollo de un segundo par de alas en lugar de halterios (revisado en Kennison, 2004; y en Maeda y Karch, 2010). Por lo tanto, la regulación de la expresión de estos genes en el tiempo y en el espacio debe ser muy precisa para alcanzar el desarrollo apropiado de las estructuras corporales.

1.2 La regulación de la expresión de los genes *Hox*

Durante las primeras etapas embrionarias de *Drosophila*, los genes de efecto materno y los genes de segmentación actúan para segmentar al embrión. Las proteínas codificadas por los genes de herencia materna establecen los ejes antero-posterior y dorso-ventral del embrión. Posteriormente actúan los genes de segmentación que se dividen en genes “gap”, genes “pair-rule” y genes “segment-polarity” (Figura 1). Las proteínas codificadas por el grupo de genes “gap” subdividen al embrión en regiones amplias mientras que las codificadas por el grupo de genes “pair-rule” especifican el número de segmentos pares y nones. Después, las proteínas codificadas por el grupo de genes “segment-polarity” determinan la polaridad antero-posterior de cada segmento (revisado en Akam, 1987). Además, los productos codificados por los genes de herencia materna y los genes de segmentación promueven la expresión de los genes *Hox*. No obstante, cuando los genes *Hox* comienzan a expresarse, decae la expresión de los genes de herencia materna y de segmentación. Para mantener la expresión apropiada de los genes *Hox* en cada segmento, las proteínas del grupo trithorax (*trxG*) mantienen un estado activo de la expresión de los genes *Hox* en los segmentos correspondientes mientras que las proteínas del grupo Polycomb (*PcG*) mantienen reprimida la expresión de los genes *Hox* en los segmentos donde no deben activarse (revisado en Kennison, 2004). Muchas proteínas del *PcG* participan en

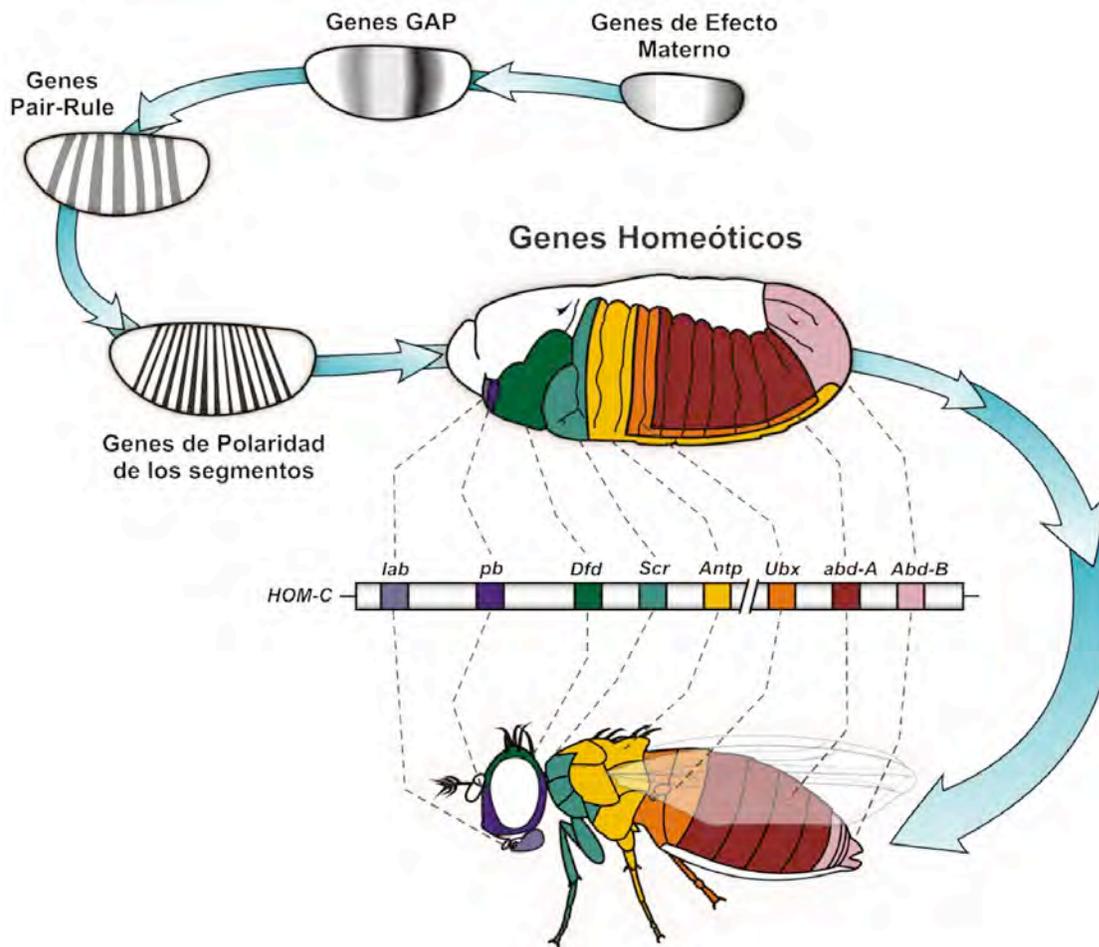


Figura 1. Expresión de los genes *Hox* durante el desarrollo de *Drosophila melanogaster*. Se muestra la cascada de expresión génica que conlleva a la expresión de los genes *Hox*. Estos genes se expresan (indicados con un color distinto) en segmentos específicos desde las etapas embrionarias hasta la etapa adulta. Entre el embrión y el adulto se muestran el complejo Antennapedia (conformado por los genes *labial* (*lab*), *proboscipedia* (*pb*), *Deformed* (*Dfd*), *Sex combs reduced* (*Scr*) y *Antennapedia* (*Antp*)) y el complejo bithorax (conformado por los genes *Ultrabithorax* (*Ubx*), *abdominal A* (*abd-A*), *Abdominal B* (*Abd-B*)) separados por dos líneas diagonales //.

complejos multiméricos que regulan la expresión génica mediante el control de la estructura de la cromatina, principalmente mediante la modificación postraduccional de las histonas (revisado en Müller y Verrijzer, 2009). Algunos miembros del PcG pueden asociarse a elementos de DNA conocidos como PREs (del inglés "Polycomb Response Elements") que son sitios de ensamblaje de los complejos Polycomb (revisado en Müller y Kassis, 2006). Por otro lado, las proteínas del trxB tienen funciones heterogéneas y pueden participar principalmente en complejos modificadores de histonas y en complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP como el complejo BRAHMA

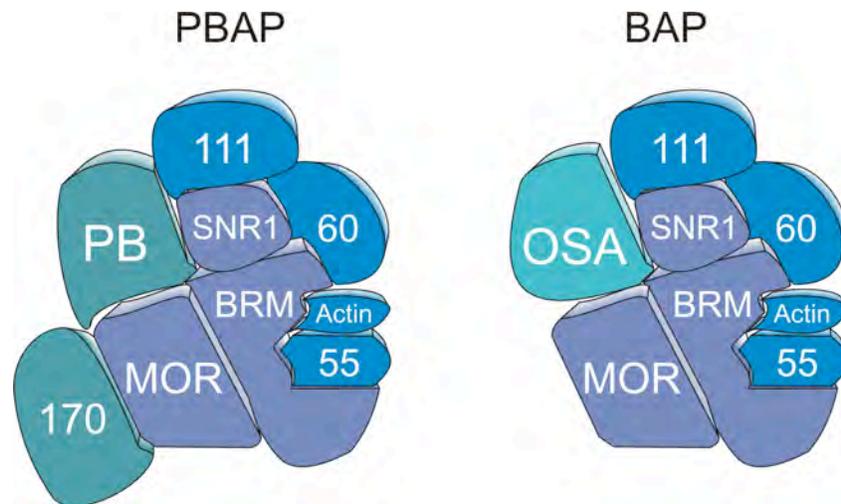


Figura 2. Los complejos remodeladores de la cromatina BAP y PBAP en *Drosophila melanogaster*. Ambos complejos están presentes en *Drosophila* y pueden regular la expresión de los mismos genes o de genes distintos. Las subunidades centrales del complejo se muestran en morado. Las subunidades características de cada complejo se encuentran de color verde (modificado de Chalkley *et al.*, 2008).

BAP (revisado en Schuettengruber *et al.*, 2011).

1.3 Los complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP en *Drosophila*.

Los complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP generan cambios en la estructura de la cromatina que promueven su cierre o su apertura. La ATPasa es la subunidad central de estos complejos ya que es necesaria y suficiente para remodelar la cromatina *in vitro* (revisado en Flaus y Owen-Hughes., 2004). Hasta ahora se han identificado cuatro familias de remodeladores de la cromatina conocidos como SWI/SNF, ISWI, Mi-2 e INO80 clasificados de acuerdo a su ATPasa. Todos estos complejos tienen funciones biológicas específicas distintas. Por ejemplo, los complejos ISWI se requieren para mantener la estructura de la cromatina del cromosoma X de *Drosophila* (Deuring *et al.*, 2000) y el complejo INO80 está involucrado en la regulación de secuencias teloméricas, y en la segregación cromosomal (revisado en Morrison y Shen, 2009). En *Drosophila* existen dos complejos tipo SWI/SNF que se conocen como BAP (del inglés “Brahma Associated Proteins”) y PBAP (del inglés “Polybromo associated BAP”). Ambos complejos comparten siete subunidades estructurales conocidas como Brahma (Brm), Moira (Mor), Snr1, Bap60, Bap55, Bap111 y actina (Figura 2). Sin embargo, cada complejo puede identificarse por sus subunidades características. Osa es la subunidad única de BAP mientras que Polybromo y

Bap170 son las subunidades características de PBAP (Chalkley *et al.*, 2008). El complejo BAP es un complejo remodelador de la cromatina en *Drosophila* que preferencialmente facilita el reclutamiento de la RNA polimerasa II (Armstrong *et al.*, 2002), en la elongación de la transcripción (Zrally y Dingwall, 2012). En contraste, se ha observado que el complejo BAP también se requiere para reprimir la expresión de algunos genes, por ejemplo, los genes blanco de Wingless (Collins y Treisman, 2000).

1.4 El papel de las subunidades Osa y Brahma en la remodelación de la cromatina.

brahma (brm) y *osa (osa)* se identificaron en un análisis genético para encontrar genes supresores o “enhancers” de mutaciones de falta de función en *Polycomb (Pc)* y/o *Antp* (Kennison y Tamkun, 1988). Brahma es una proteína del trxG con actividad de ATPasa dependiente de DNA. El bromodominio presente en Brahma, y en otras proteínas reconoce proteínas acetiladas, en particular a las histonas (Dhalluin *et al.*, 1999), aunque el bromodominio no es esencial para la unión del complejo a la cromatina (Elfring *et al.*, 1998). Por otro lado, se ha propuesto que Osa está implicada en el reclutamiento del complejo BAP a la cromatina, aunque no está claro si es propiamente una subunidad esencial del complejo, si recluta al complejo a regiones específicas o si modifica funciones del mismo (Vázquez *et al.*, 1999; Hargreaves y Crabtree, 2011). Las alteraciones en la función de los complejos remodeladores de la cromatina, como el complejo BAP, podrían resultar en la alteración de la expresión de los genes *Hox*. Por lo que los mecanismos que permiten un funcionamiento apropiado del complejo BAP son importantes para la expresión correcta de los genes *Hox*. Estos mecanismos incluyen el transporte del citoplasma al núcleo de las subunidades que lo conforman, la regulación del ensamblaje y desensamblaje apropiado del complejo; así como los mecanismos que permiten controlar su actividad en el tiempo y el espacio.

1.5 La SUMOilación y su papel en la regulación de la expresión de los genes *Hox*.

La SUMOilación es una modificación postraduccional que puede aumentar la estabilidad, alterar la función y/o modificar la interacción de las proteínas SUMOiladas (revisado en Gareau y Lima, 2010). SUMO (Small Ubiquitin MOdifier) es una proteína pequeña estructuralmente similar a la ubiquitina. La conjugación de SUMO se lleva a cabo en residuos de lisina de la proteína blanco con motivos consenso [Ψ -K-x-D/E], donde “ Ψ ” es un aminoácido hidrofóbico, “K” una lisina, “x”

es cualquier aminoácido y “E/D” puede ser ácido aspártico o ácido glutámico (Rodríguez *et al.*, 2001). Además del motivo canónico de SUMOilación se han descrito otras secuencias consenso que pueden unir a SUMO (revisado en Da Silva-Ferrada *et al.*, 2012). En la actualidad se conoce la existencia de un motivo consenso invertido (ICM) [D/E-x-K-ψ], un motivo de SUMOilación dependiente de fosforilación (PDSM) [ψ-K-x-(D/E)-x-x-pS-P], donde una serina fosforilable se encuentra localizada a cinco aminoácidos de distancia de la lisina modificada (Hietakangas *et al.* 2006; Yamashita *et al.* 2004), un motivo de SUMOilación dependiente de aminoácidos cargados negativamente (NDSM) [ψ-K-x-E-x-x-E-E-E-E] donde una secuencia de E o D se encuentra adyacente a la lisina aceptora (Yang *et al.*, 2006) y un motivo de SUMOilación hidrofóbico (HCSM) [ψ-ψ-ψ-K-x-(D/E)-x-x-E], el cual incrementa la eficiencia de la SUMOilación en blancos como RanGAP1 (Matic *et al.*, 2010)

La SUMOilación es un proceso reversible que inicia con la generación de una proteína SUMO madura mediante un corte proteolítico mediado por las proteasas de la familia Ulp/SENP. Posteriormente, SUMO se conjuga a una cisteína de la enzima activadora-E1 en un proceso dependiente de ATP. Después, SUMO se transfiere a la enzima E2-conjugante Ubc9 que a su vez, transfiere SUMO a la proteína blanco. Las E3-ligasas de SUMO juegan un papel importante en este proceso, al estimular la actividad de Ubc9 o al facilitar la formación del complejo Ubc9-sustrato. Una vez SUMOiladas, las proteínas pueden reconocer a sus blancos celulares. Finalmente, las proteasas de la familia Ulp/SENP remueven a SUMO, lo que permite que el proceso se lleve a cabo nuevamente (Gareau y Lima, 2010).

En *Drosophila*, SUMO es codificada por un solo gen llamado *smt3* (del inglés “Supressor of Mif Two 3”), el cual fue descubierto inicialmente en levadura por ser supresor de mutaciones del gen *Mif-2*, un homólogo a la proteína centromérica CENP-C de mamíferos (Meluh y Koshland, 1995). La SUMOilación juega un papel importante en *Drosophila* desde etapas embrionarias tempranas (revisado en Lomelí y Vázquez, 2011). SUMO y las enzimas de la vía de la SUMOilación se encuentran particularmente enriquecidas durante etapas tempranas del desarrollo de *Drosophila* (revisado en Talamillo *et al.*, 2008a). SUMO se hereda por vía materna y se acumula en embriones en etapa de preblastodermo y aparece distribuido uniformemente en el embrión durante las etapas de blastodermo y gastrulación. Además, estudios con RNAi contra SUMO sugieren que puede tener un papel importante en la síntesis de hormonas ecdisteroides requeridas para la metamorfosis (Talamillo *et al.*, 2008b). Por otro lado, el gen *lesswright* (*lwr*) codifica a la proteína Ubc9. En *Drosophila*, la distribución de Ubc9 es

preferentemente nuclear y se expresa uniformemente durante la embriogénesis (Bhaskar et al., 2000).

La SUMOilación puede tener un impacto profundo en el funcionamiento correcto de los complejos remodeladores de la cromatina ya que puede favorecer la interacción de alguna subunidad del complejo con el DNA o puede favorecer la interacción interproteica, lo que regula el ensamblaje de los complejos. Además, podría favorecer la subcompartimentalización de las proteínas necesarias para la función del complejo al promover, por ejemplo, el transporte entre el núcleo y el citoplasma.

1.6 Desarrollo de los discos de halterio en *Drosophila*.

Durante el desarrollo de la pupa de *D. melanogaster*, los discos imagales son los que formarán la mayor parte de los tejidos de la mosca adulta. Los discos imagales se forman desde etapas embrionarias tardías y crecen durante las etapas larvianas posteriores. Existen 19 discos imagales durante las etapas larvianas, nueve vienen en pares excepto el disco que dará lugar a la genitalia.

En *Drosophila*, las moscas adultas requieren de un par de apéndices dorsales llamados halterios, importantes para el equilibrio de las moscas durante el vuelo. Estos apéndices se desarrollan a partir de un par de discos de halterio. Cada uno de ellos está compuesto por dos monocapas de tejido epitelial distintas. La membrana peripodial es una capa de tejido epitelial escamoso que recubre a la capa de tejido columnar (Figura 3A). La capa de tejido epitelial columnar es la que dará lugar al halterio mientras que las células de la capa de tejido epitelial escamoso regulan la expresión de las células del tejido epitelial columnar mediante la liberación de moléculas señalizadoras.

El disco de halterio en las larvas de tercer instar se puede dividir en regiones distintas. En el cuerpo de la mosca adulta, el notum II dará origen a parte del mesotórax y los discos concéntricos que conforman el “pouch” del disco darán lugar al escabelo, pedicelo, y al capitelo del halterio (Figura 3B y C) (Van der Meer y Ouweneel, 1974). Durante la etapa de pupa, los discos de halterio evierten desde la región del capitelo hacia afuera, dando lugar al primordio del halterio que posteriormente se convertirá en un halterio completamente formado.

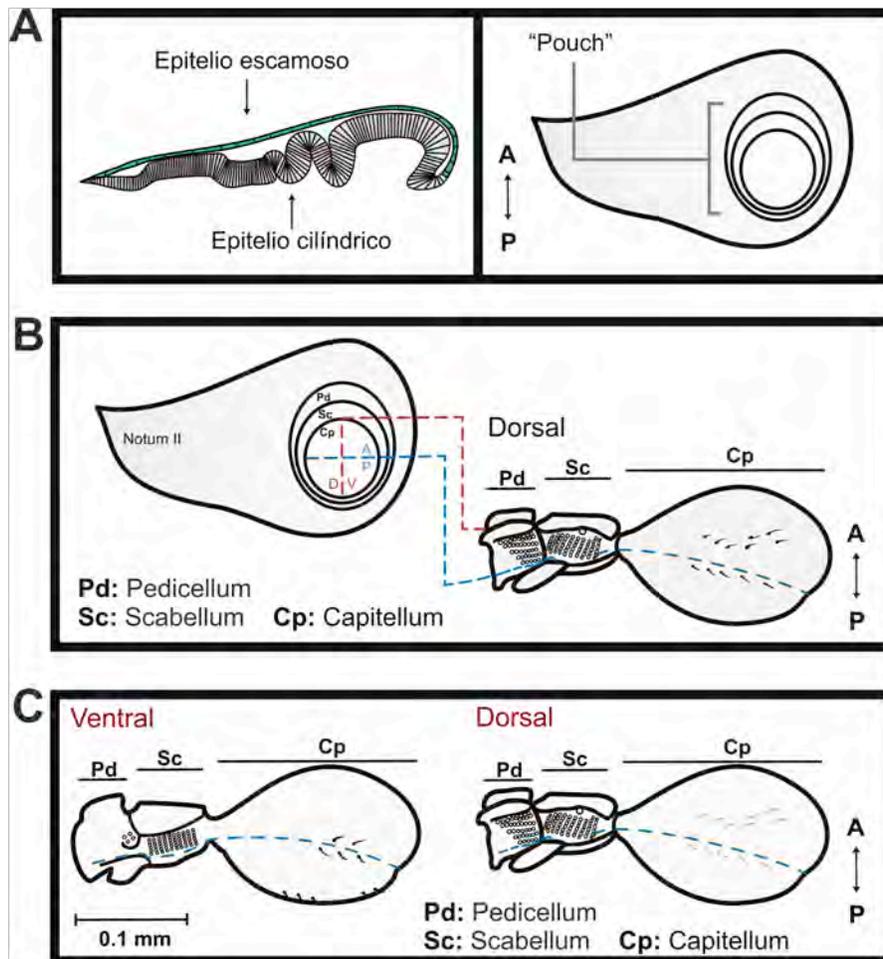


Figura 3. Desarrollo y anatomía del halterio. A) Corte longitudinal del disco de halterio para mostrar los epitelios escamoso y cilíndrico (izq.). Disco de halterio que muestra la región del "pouch" (der.). B) Mapa de destino del disco del halterio. El disco de halterio (izq.) da lugar a la estructura adulta (der.). C) Anatomía del halterio, se observan las tres regiones funcionales del halterio: el pedicelo (Pd), el escabelo (Sc) y el capitulo (modificada de González-Gaitán *et al.*, 1990).

Los genes *Hox* juegan un papel importante para establecer el destino de las células de los discos de halterio. En especial, *Ubx* es importante para establecer su identidad, ya que mutaciones de pérdida de función de *Ubx* ocasionan que el halterio se transforme en ala (Struhl, 1982). *Ubx* se expresa prácticamente en todo el disco del halterio y ésta es más fuerte en la región del "pouch" que en el resto del disco. Por otro lado, en el disco del ala, *Ubx* se expresa únicamente en la membrana peripodial y no se requiere para el desarrollo apropiado del disco (Struhl, 1982).

Experimentos previos de nuestro laboratorio mostraron que las combinaciones heteroalélicas de las mutantes de *tna* presentan transformaciones

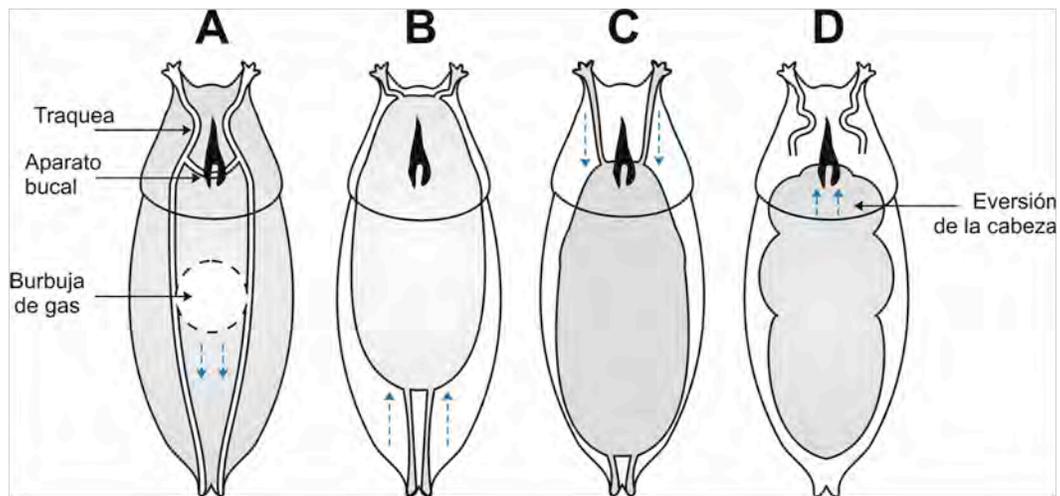


Figura 4. Eversión de la cabeza en la pupa de *Drosophila*. La eversión comienza con la formación de una burbuja de gas en el centro de la parte abdominal de la pupa (A). La burbuja se desplaza hacia la parte posterior, lo que desplaza a la pupa preformada hacia la parte anterior (B). Finalmente, la burbuja se mueve hacia la parte anterior (C), lo que genera una cavidad que ocupará la cabeza cuando everta (D) (modificada de Bainbridge y Bownes, 1981).

homeóticas de halterio a ala (Gutiérrez *et al.*, 2003) lo cual podría indicar pérdida de función de *Ubx*.

1.7 *Ubx* y su importancia en el desarrollo de las quetas del halterio

Ubx codifica al menos seis transcritos distintos por "splicing" alternativo y su expresión está finamente regulada a lo largo del desarrollo desde etapas embrionarias (Akam *et al.*, 1985). La regulación de la expresión de *Ubx* está determinada se determina y se expresa en un patrón espacio-temporal definido durante el desarrollo embrionario (Casares *et al.*, 1987, Hogness *et al.*, 1985). En el disco del halterio, *Ubx* se expresa mayoritariamente en la región del "pouch". *Ubx* también está regulado negativamente por *Scm*, una proteína del grupo Polycomb encargada de reclutar a PRC1 y PRC2 (Kang *et al.*, 2015). Estudios previos muestran que la SUMOilación de *Scm* impide su unión a una de las PRES de *Ubx*, evitando su represión (Smith *et al.*, 2011).

En *Drosophila*, las quetas sensoriales se generan por rondas de división asimétrica de una célula progenitora sensorial. Primero, SOP se divide en PIIa y PIIb y posteriormente, PIIa se divide en una célula "socket" y en una célula que dará origen a la queta del ala (revisado por Neumüller y Knoblich, 2009). Esta célula sufre una reorganización del citoesqueleto, formando focos de actina en las superficies apicales, hecho que marca el inicio del desarrollo de la queta 32 horas

después de la formación de la pupa (Roch y Akam, 2000). Hasta antes de este paso, las células que darán origen a las quetas del ala y del halterio son prácticamente indistinguibles. Posteriormente las células de la queta del ala se aplanan dramáticamente adquiriendo una forma de estrella mientras que las del halterio permanecen con forma cuboidal. En las células progenitoras del halterio, *Ubx* reprime los genes de diferenciación hacia queta de ala y activa los genes de diferenciación hacia halterio. Por lo tanto, las células SOP de halterio con falta de función de *Ubx* darán lugar a quetas de ala (Roch y Akam, 2000).

1.8 Formación y eversión de la cabeza durante la etapa de pupa en *Drosophila*.

En las pupas, la formación de la cabeza comienza con la fusión de los discos imagales labial, clipeolabrum, protórax dorsal y ojo-antena (Posnien y Bucher, 2010). Además, el primordio de la cabeza debe fusionarse con el tórax en algún momento del desarrollo aunque el proceso no se comprende con detalle. Este proceso ocurre durante las primeras 12 horas después del inicio de la pupación (APF, por sus siglas "After Puparium Formation"). Una vez que los discos se encuentran fusionados parcialmente se forma el saco de la cabeza, el cual evierte entre las 12 a 13.5 horas APF a 25°C (Bainbrigde y Bownes, 1981).

La eversión de la cabeza es un proceso controlado hormonalmente por un pulso de la hormona ecdisona, aunque la hormona juvenil también parece jugar un papel importante (Riddiford *et al.*, 2010). Físicamente, la cabeza evierte con ayuda de contracciones abdominales. Inicialmente, se genera una burbuja de gas en el centro de la parte abdominal de la pupa (Figura 4A). La burbuja se desplaza hacia la parte posterior de la pupa, lo que desplaza al individuo hacia la parte anterior (Figura 4B). Posteriormente, los músculos abdominales se contraen y empujan al saco de la cabeza hacia afuera. Además de empujar a la cabeza, estas contracciones promueven el desplazamiento de la burbuja de gas hacia la parte anterior, generando la cavidad que ocupará la cabeza (Figuras 4C y D). En cuestión de unos pocos minutos, el cerebro y otros órganos son desplazados dentro del saco de la cabeza. Después de varias horas los ojos, antenas y la proboscis se desarrollarán por completo (Bainbrigde y Bownes, 1981).

2. ANTECEDENTES

2.1 TnaA en la regulación de la expresión de los genes *Hox*

tonalli (tna) se identificó en un análisis genético para encontrar genes que interaccionaran con *brahma (brm)* (Gutiérrez *et al.*, 2003). Algunas mutaciones en *tna* provocan transformaciones homeóticas de pérdida de función de los genes *Hox Antp*, *Ubx* y *Sex combs reduced (Scr)* lo que genera fenotipos de extensión de alas, transformación de halterios en alas y una disminución en el número de peines sexuales, respectivamente. *tna* codifica a la proteína TnaA para la cual determinamos que hay más de un mRNA producido por este *locus* (Gutiérrez *et al.*, 2003) y que existen por lo menos tres isoformas que se expresan diferencialmente durante el desarrollo (Monribot-Villanueva *et al.*, 2013). Por otro lado, los análisis de predicciones bioinformáticas y de las secuencias de EST (del inglés “Expressed Sequence Tags”) de los genes codificados por el genoma de *D. melanogaster* depositados en la base de datos del Flybase (St. Pierre *et al.*, 2014) identifican tres transcritos distintos provenientes del *locus tna* nombrados A, B y D (donde los transcritos B y D tienen mayor probabilidad de ocurrencia). Cada uno de estos mRNAs tendría diez exones en su región codificante (CDS) y exones 5' y 3' que contienen secuencias no traducidas (UTR) (Figura 5). El primer exón traducido de estos transcritos sería un poco diferente entre cada uno de ellos, lo que da lugar a tres isoformas con un amino-terminal distinto. Esto es congruente con las isoformas encontradas por Monribot-Villanueva *et al.* (2013).

Existen evidencias que muestran que TnaA es una E3 ligasa de SUMO que puede facilitar la SUMOilación de Osa (Monribot-Villanueva *et al.*, 2013). Se ha propuesto que la función de TnaA sobre la expresión de los genes *Hox* podría estar relacionada directamente con la biología del complejo BAP o bien con la inactivación mediada por la SUMOilación de la proteína Sex Comb on Midleg (Scm) del PcG (Monribot-Villanueva *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2011). Por otro lado la SUMOilación de Scm impide su reclutamiento a su sitio blanco y promueve la expresión del gen homeótico *Ubx* y se ha sugerido que TnaA podría estar involucrada en la SUMOilación de Scm (Smith *et al.*, 2011).

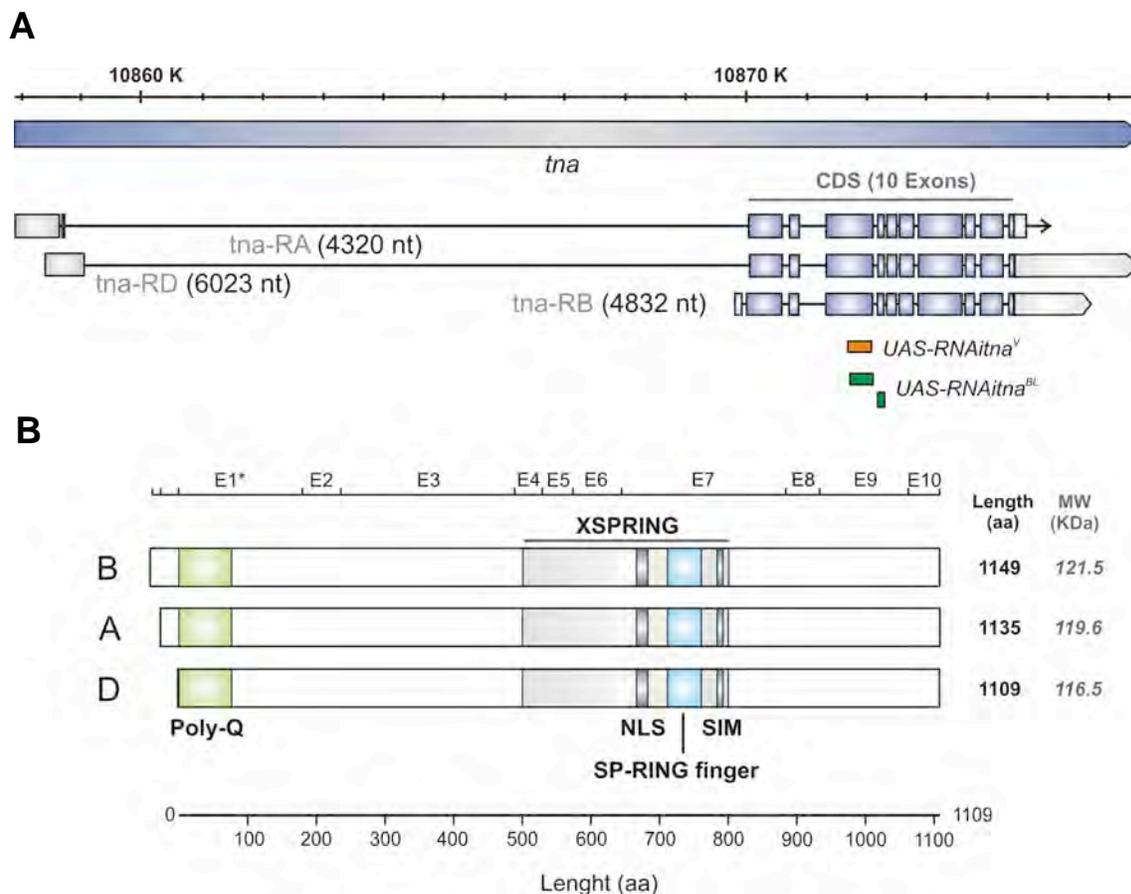


Figura 5. Características de los mRNAs de *tna* y de las proteínas codificadas. A) Se muestra a *tna* y los tres transcritos A, D y B descritos en Flybase (St. Pierre *et al.*, 2014). Los transcritos A o B y D están descritos por Gutiérrez *et al.*, 2003. Se muestran los diez exones de la región codificante (CDS) (cajas azules) y los exones que contienen las regiones no traducidas (UTR) en los extremos 5' y 3' (cajas grises). Se indican las regiones que son blanco de los RNAi contra *tna* (*RNAi-tna^{VIII}* y *RNAi-tna^{TRIP}*, cajas anaranjada y verde respectivamente). B) Las tres isoformas de TnaA, que varían en su amino-terminal. Los exones están marcados en la parte superior (E1-10) y la longitud se muestra en la parte inferior. NLS (Nuclear Localization Sequence), SIM (SUMO-Interacting Motif), XSPRING (eXtended SP-RING). Estos datos fueron tomados de Flybase y de Gutiérrez *et al.*, 2003.

3. HIPÓTESIS

Si TnaA es importante para el funcionamiento apropiado del complejo BAP (trxG) y/o de alguna proteína del PcG, observaremos transformaciones homeóticas de pérdida de función en animales con bajas dosis de TnaA. Además, si TnaA es importante para el reclutamiento del complejo BAP a la cromatina, los animales con bajas dosis de TnaA presentarán perfiles alterados de asociación del complejo a la cromatina.

4. JUSTIFICACIÓN

En trabajo previo del grupo se han analizado individuos con diferentes alelos mutantes de *tna*, que incluyen mutaciones puntuales, mutaciones por inserción de transposones y deleciones de la región donde se encuentra *tna* (Gutiérrez *et al.*, 2003 y Monribot-Villanueva *et al.*, 2013). En estos trabajos, se han caracterizado los fenotipos homeóticos y la etapa donde los individuos mutantes mueren por no tener las dosis o las versiones funcionales de *tna*. La caracterización de TnaA producida por los diferentes alelos analizados (Monribot-Villanueva *et al.*, 2013 y Monribot y Vázquez, datos no publicados), indica que en ningún caso provocó una clara falta de función de *tna*. El alelo puntual produce una versión dominante negativa de *tna* (Monribot-Villanueva *et al.*, 2013) y los alelos por inserción incluso producen más TnaA que el alelo silvestre probablemente por usar secuencias promotoras dentro del transposón utilizado para hacer las mutagénesis. Por otro lado, las deleciones cromosómicas empleadas no son las candidatas ideales para analizar los efectos de la falta de función de *tna* pues carecen de otros genes aledaños que pueden tener efectos en los fenotipos que pudieran presentar individuos mutantes en *tna*.

Para continuar con el estudio de la función de TnaA, será de gran utilidad contar con condiciones donde se obtenga una clara falta de función de TnaA. Primero, porque no conocemos las consecuencias de la falta de TnaA en la mosca adulta, pues los individuos portadores de las combinaciones heteroalélicas de *tna* mueren en etapas de larvas de tercer instar y pupa, mostrando que TnaA es esencial en el desarrollo. En segundo lugar, quisiéramos saber si TnaA se requiere para el reclutamiento en la cromatina de las subunidades del complejo BAP Brm y Osa con las que *tna* interacciona genéticamente (Gutiérrez *et al.*, 2003). Para esto debemos tener condiciones donde no haya TnaA en glándulas salivales de larvas de tercer instar, pues es aquí donde podemos obtener cromosomas politénicos que tienen cromatina interfásica que es el sustrato donde actúa el complejo BAP. Por lo tanto, en este trabajo se utilizó un sistema de RNA de interferencia para abatir las dosis de TnaA de forma controlada y dirigida en diferentes etapas del ciclo de vida y en órganos específicos de *Drosophila*.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Determinar el efecto de la disminución de la expresión de TnaA en el desarrollo de *D. melanogaster* y en el reclutamiento de subunidades del complejo BAP a la cromatina.

5.2 Objetivos Particulares

1. Determinar los efectos de la disminución ubicua de la expresión de TnaA

Se determinará el efecto de la disminución ubicua con los RNAs de interferencia porque los alelos mutantes de *tna* no muestran una clara falta de función. En particular se determinarán los efectos en el desarrollo de estructuras corporales y en la supervivencia. Lo anterior se determinará al comparar la proporción de adultos con una disminución ubicua de TnaA en relación con moscas control.

2. Determinar el efecto de la disminución de la expresión de TnaA en el disco del halterio.

Se determinará su efecto en el halterio porque la disminución de SUMO en el halterio y algunas mutantes de *tna* provocan transformaciones homeóticas de halterio a ala. Esto se determinará en preparaciones de cutícula de halterios y en ensayos para medir los niveles de expresión de TnaA en el disco del halterio.

3. Determinar si TnaA afecta los perfiles de asociación a la cromatina de Brahma y Osa en cromosomas politénicos.

Se determinarán los perfiles de la asociación de Osa y Brahma porque presentan una interacción genética fuerte con *tna* y en el caso de Osa, por su colocalización con TnaA en cromosomas politénicos. Esto se determinará al hacer inmunotinciones de los perfiles de Osa y/o Brm en cromosomas politénicos de larvas de tercer instar donde se ha disminuido la expresión de TnaA.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Medios utilizados para la alimentación y mantenimiento de las moscas.

Las moscas se crecieron en medio estándar para su mantenimiento. El medio se preparó de acuerdo a la siguiente receta:

50 gr de levadura en polvo
50 gr de piloncillo
8 gr de agar
5 mL de ácido propiónico

Se calentó el piloncillo en 400 mL de agua destilada hasta disolverse, se agregó levadura, se transfirió a un recipiente cerrado y se esterilizó en la autoclave a 120°C por 30 minutos a 15 psi. Se dejó enfriar hasta 60°C y se añadió el ácido propiónico. Finalmente, el medio se vertió en los viales y se dejó solidificar.

6.2 Genética general: cruzas, cuidado de las moscas y conteo de moscas adultas.

Todas las moscas se mantuvieron en medio estándar (descrito arriba) a 18, 25 y 28°C a menos que se especifique otra condición. Las cruzas se realizaron en una proporción 5:3 (hembras: machos). Para esto, se limpiaron los viales de las moscas de interés y se colectaron hembras vírgenes a 25°C durante las primeras ocho horas post-eclosión. Una vez colectada la cantidad suficiente de hembras, se anestesiaron suavemente con CO₂ sobre una cámara con fondo de polietileno y se transfirieron a un vial con medio nuevo junto con los machos de interés.

Para contar las moscas es necesario tener un vial que no tenga demasiadas moscas ya que pueden pegarse al fondo del vial, lo que introduce errores durante el conteo. Por otro lado, el vial tampoco puede estar demasiado poco poblado ya que dificulta la alimentación de las larvas y promueve el crecimiento de hongos y/o bacterias. Por lo tanto, se necesita de una cantidad apropiada de moscas que les permita un desarrollo óptimo dentro del medio. Para lograr esto, las moscas se dejan aparear por un periodo de tiempo limitado, impidiendo que se acumulen demasiados individuos. Este tiempo fue distinto para cada temperatura ya que *Drosophila* es un organismo ectotermo y su ciclo de vida varía con la temperatura (Ashburner *et al.*, 2005). A 18°C, las moscas silvestres eclosionan aproximadamente a los 27 días post-ovoposición, por lo cual se dejaron aparear

por aproximadamente siete días. Posteriormente, estas moscas se pueden cambiar a un vial nuevo sin anestesiarlas. Este vial puede ser útil posteriormente para complementar los datos de esta cruce en caso de no tener individuos suficientes. Por otro lado, a 25°C las moscas silvestres eclosionan a los 10 días post-ovoposición y las moscas se dejaron aparear únicamente por cuatro días antes de cambiarlas. Finalmente, a 28°C las moscas eclosionan a los siete días post-ovoposición y se dejaron aparear por aproximadamente dos o tres días antes de cambiarlas.

Una vez que las moscas comenzaron a eclosionar se contaron diariamente, en especial a 28°C, donde las moscas son más susceptibles a pegarse al medio. Es importante resaltar que las moscas se sacaron para hacer el conteo en un lapso de máximo media hora y se regresaron inmediatamente a un ambiente con temperatura controlada para evitar afectar a las moscas que aún se estaban desarrollando.

Para contar a las moscas, se anestesiaron con CO₂ sobre una cámara con fondo de polietileno y se observaron bajo el microscopio estereoscópico. Los fenotipos se observaron moviendo a las moscas con ayuda de un pincel de cerdas finas y las cantidades se anotaron día con día en la bitácora. Cuando las moscas dejaron de eclosionar se determinaron la proporciones deseadas con ayuda de estos datos.

6.3 El sistema de expresión génica *UAS-GAL4* para la expresión de los *RNAi-tna*.

Los RNAi contra los mRNAs de *tna* se expresaron con el sistema de expresión génica *UAS-GAL4* (Rorth, 1996). Este sistema se compone del factor transcripcional de levadura GAL4, el cual promueve la expresión de los genes río abajo de la secuencia de levadura denominada "*Upstream Activating Sequence*" (*UAS*). Las moscas *UAS-RNAi-tna* poseen la inserción del RNAi contra *tna* bajo la secuencia regulatoria *UAS* en todas las células de la mosca. Por otro lado, existen líneas de moscas que contienen el gen *GAL4* bajo el control de diferentes promotores y "enhancers" de *Drosophila* y que llamamos "drivers". En estas líneas, la proteína GAL4 se expresa sólo en patrones espacio-temporales específicos. La progenie que contiene al "driver" y al RNAi de interés serán individuos que expresen el RNAi contra *tna* en un patrón determinado por la zona de expresión específica en tiempo y/o espacio determinados por la expresión de GAL4 (Figura 6).

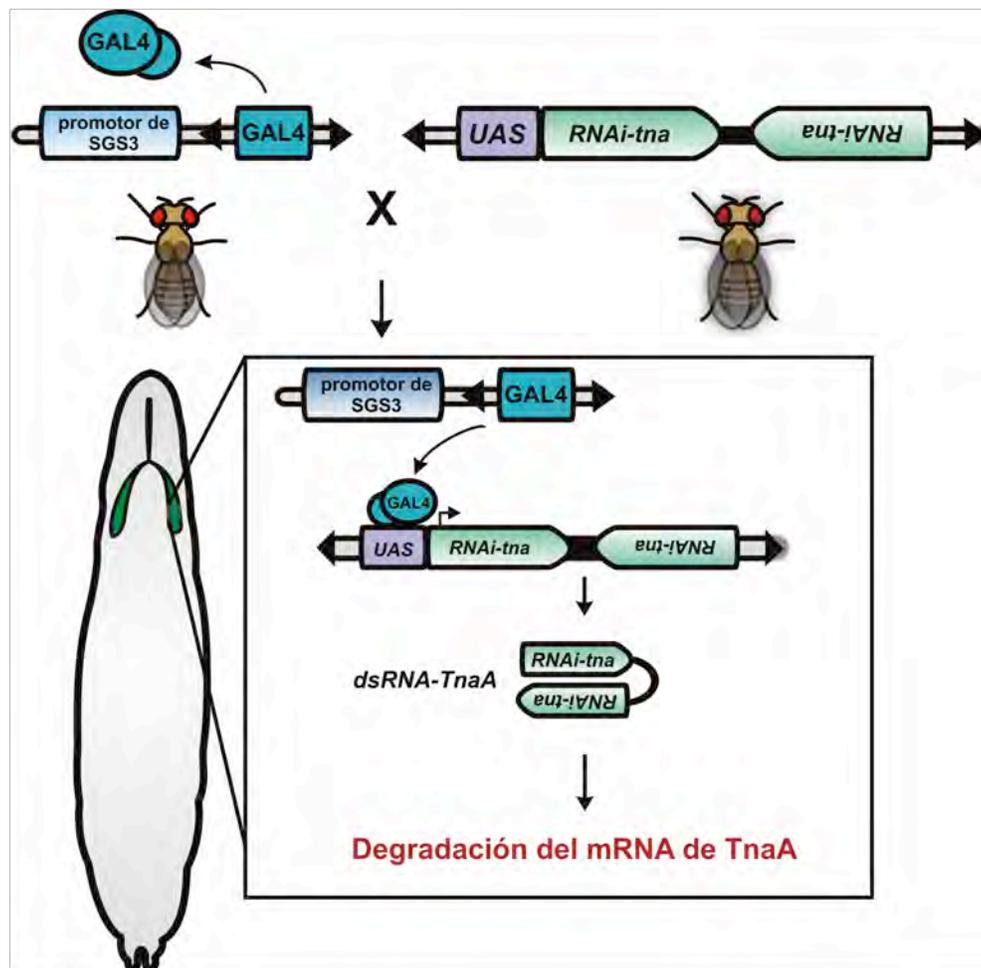


Figura 6. Estrategia para la disminución de los niveles de expresión de TnaA. Para disminuir los niveles de TnaA se utiliza un RNAi expresado con el sistema *UAS-GAL4* (Rorth, 1996) a los tejidos, órganos u etapas del desarrollo de interés. Este RNAi es un RNA largo de doble cadena (dsRNA) que debe ser procesado en fragmentos de 21 nucleótidos para poder promover la degradación del mRNA de *tna*. Inicialmente, se cruza una mosca que tiene a la inserción de *GAL4* bajo el control de la expresión a partir de un promotor o “enhancer” específico de tejido con una mosca que posee la inserción del RNAi bajo la secuencia *UAS*. La progenie que contenga ambas inserciones expresará al RNAi bajo el patrón de expresión de *GAL4*.

6.4 Líneas de moscas que producen *GAL4* en patrones específicos (“drivers”) y RNAs de interferencia contra *tna*.

Para disminuir la expresión de *tna* se utilizaron dos RNAs de interferencia distintos que se encuentran bajo la secuencia *UAS* (Ver Sección 6.3). El RNAi que proviene del banco de Bloomington (Bloomington Drosophila Stock Center, Indiana University) se abrevia en este trabajo como *RNAi-tna^{TRiP}* y se construyó en el

laboratorio de N. Perrimon (Ni *et al.*, 2008). El *RNAi-tna^{TRIP}* (Stock [29372](#)) consiste en una secuencia complementaria a un segmento de los exones traducidos 3 y 4 de los mRNAs B y D de *tna* (Figura 5A, caja verde; Anexo 1). Este segmento se clonó en el vector pVALIUM10 bajo la secuencia *UAS* y se insertó en el genoma mediante recombinación sitio-específica en un sitio *attP2* en el brazo L del cromosoma III de *Drosophila* (Ni *et al.*, 2008).

Por otro lado, se utilizaron dos líneas diferentes con el *RNAi-tna* provenientes del banco de Vienna (Vienna *Drosophila* Resource Center, Vienna Austria) (*RNAi-tna^V*). Este RNAi pertenece a la biblioteca GD. El segmento que produce al RNAi se clonó bajo la secuencia *UAS* en un vector pGD264. Este RNAi es complementario a un segmento del exón traducido 3 del mRNA B y D de *tna* (Figura 5A, caja anaranjada; Anexo 1). A diferencia del *RNAi-tna^{TRIP}*, este segmento de DNA se insertó en el genoma de manera inespecífica por transposición (Dietzl *et al.*, 2007). Esto permitió generar dos líneas de moscas. La línea *RNAi-tna^{VII}* tiene la inserción del RNAi en el cromosoma II (Stock [v28071](#)) y la línea *RNAi-tna^{VIII}* (Stock [v28070](#)) tiene la inserción en el cromosoma III.

Se utilizaron cinco líneas “drivers” de GAL4 para disminuir la expresión de TnaA. Para la expresión ubicua de los RNAi contra el mRNA de *tna*, se utilizó el “driver” *Act5C-GAL4* (Stock [4414](#)), donde GAL4 se expresa bajo el promotor de *Actina 5C* (Ito *et al.*, 1997). Para dirigir la expresión a las glándulas salivales se utilizaron diferentes “drivers”. El primero fue el de *Act5C-GAL4* ya mencionado puesto que promueve una expresión fuerte en glándulas salivales, el segundo fue *Sgs3-GAL4* (Stock [6870](#)), el cual es una inserción en el cromosoma III que promueve la expresión de GAL4 principalmente en la parte distal de los lóbulos de las glándulas salivales (Zhimulev *et al.*, 2003). El tercero fue *332.3-Gal4* (Stock [5398](#)) promueve la expresión de GAL4 en los lóbulos de las glándulas salivales de manera homogénea (Wodarz *et al.*, 1995). Para dirigir la expresión al disco del halterio se utilizaron los “drivers” *A9-GAL4* (Stock [8761](#)) y *MS1096-GAL4* (Stock [8860](#)). Ambos “drivers” son inserciones en el cromosoma X que promueven la expresión de GAL4 en los discos imagales del halterio y del ala en patrones distintos. *A9-GAL4* dirige la expresión de GAL4 a la región del “pouch” de los discos (Haerry *et al.*, 1998), mientras que *MS1096-GAL4* dirige la expresión tanto al “pouch” como al “hinge” de los discos de ala y halterio (Neumann y Cohen, 1996).

6.5 Características de las mutantes de la vía de SUMOilación y del *RNAi-smt3*

El alelo hipomorfo *smt3⁰⁴⁴⁹³* se generó mediante la inserción de un transposón P{PZ} en el 5' UTR de la isoforma A de SUMO (Figura 7), la cual es la

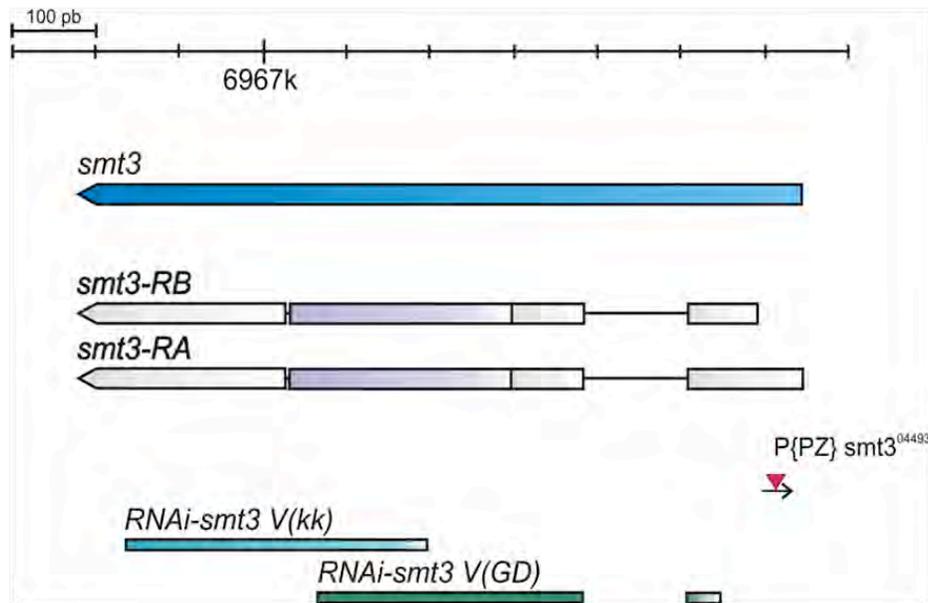


Figura 7. Mapa molecular, transcritos, RNAi y alelos del gen *smt3*. *smt3* codifica a la proteína SUMO. El *locus* produce dos transcritos distintos (*smt3-RA* y *-RB*) que difieren en su extremo 5' UTR. Los *RNAi-smt3* mostrados (*V(kk)* y *V(GD)*) provienen del centro de acopio de Viena. El RNAi que utilizamos en nuestro estudio es el *RNAi-smt3 V(KK)*. El alelo hipomorfo *smt3*⁰⁴⁴⁹³ es una inserción del transposón P{PZ} en el 5' UTR de la isoforma A que es la más abundante (Huang *et al.*, 1998 y Schnorr *et al.*, 2001).

más abundante que la isoforma B (Huang *et al.*, 1998 y Schnorr *et al.*, 2001). El RNAi que utilizamos en este trabajo es el *RNAi-smt3 V(KK)* utilizado previamente por Huang *et al.*, (2011) (Figura 7), el cual tiene una secuencia blanco distinta al *RNAi-smt3 V(GD)* utilizado por Smith *et al.*, (2011). Ambos RNAi promueven la disminución en los niveles de SUMO.

lwr codifica para la enzima E2-conjugante de la vía de SUMOilación. El alelo *lwr*¹³ se generó por la escisión imprecisa de un P{PZ}, lo cual causó una deleción de 1603 pb desde 18 pb río arriba del 5' UTR hasta 300 pb río abajo del sitio de poli-A del gen contiguo a *lwr*, *ush* (Sun *et al.*, 2003). El alelo *lwr*⁴⁻³ se generó mediante la escisión imprecisa de un P{PZ}, lo cual causó que un segmento del transposón de 220 nt permaneciera insertado en el 5' UTR de *lwr* (Aponishev *et al.*, 2001). Las secuencias se muestran en la Figura 8.

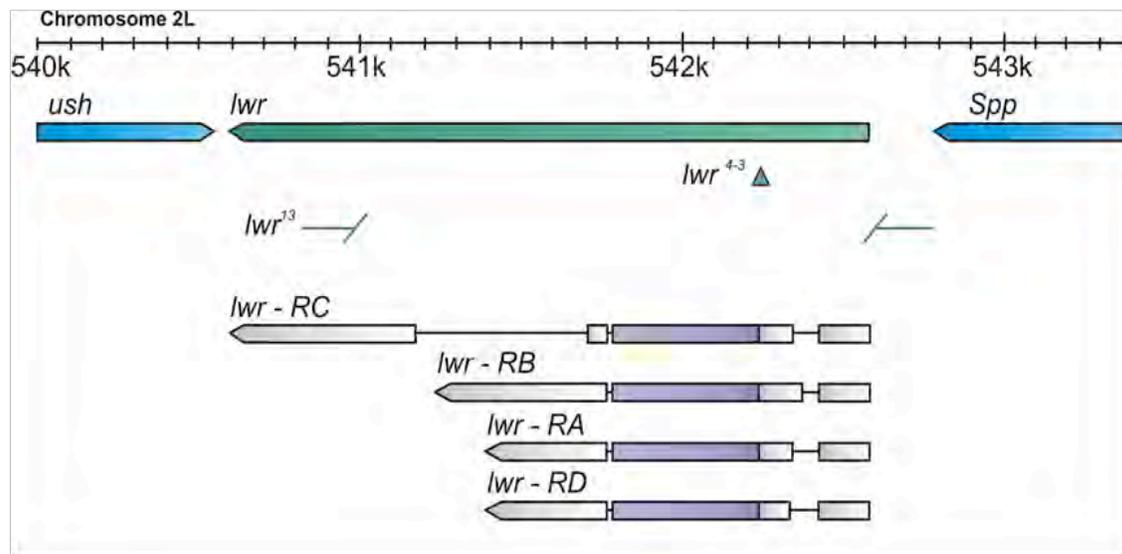


Figura 8. Mapa molecular de *lwr*, alelos y transcritos. El gen *lwr* codifica a la proteína Ubc9 (E2). El locus produce cuatro transcritos distintos que difieren en el 3' UTR (*lwr*-RA–D). Los alelos *lwr*¹³ y *lwr*⁴⁻³ provienen de las escisiones imprecisas de elementos P{PZ} (Sun *et al.*, 2003 y Aponishev *et al.*, 2001). *lwr*¹³ es una delección de 1603 pb que va 18 pb río arriba del 5' UTR de *lwr* hasta 300 pb río abajo del sitio de poli-A de *ush*. *lwr*⁴⁻³ tiene un segmento de 220 nt del elemento P{PZ} localizado en el 5' UTR.

6.6 Ensayo para determinar la viabilidad de las moscas con disminución ubicua de *tna*.

Para determinar la viabilidad se hicieron tres cruzas entre hembras *RNAi-tna* con machos *Act5C-GAL4* a 18, 25 y 28°C como se describe en la sección 6.2. Además, se hizo una crusa recíproca con las mismas condiciones, donde se intercambia el sexo de los padres con los genotipos a estudiar. Las proporciones de las moscas mutantes se determinaron dividiendo la cantidad de individuos mutantes entre el grupo con el mayor número de individuos obtenidos en la clase más saludable. Los datos presentados en la Tabla 1 son proporciones y porcentajes de las moscas afectadas respecto a las moscas más saludables obtenidas de la misma crusa. La línea de moscas *Act5C-GAL4* tiene al marcador (*wg*^{Gla-1}) "Glazed" en el cromosoma II. Por lo tanto, las moscas *Act5C-GAL4; RNAi-tna* se distinguieron por la ausencia de dicho marcador.

6.7 Preparación de cutículas de halterios disecados

Para buscar transformaciones homeóticas parciales de halterio a ala se realizaron preparaciones de cutículas de halterios disecados. Para ésto se realizaron cruzas entre hembras del *RNAi-tna*^{TRiP} con machos *Act5C-GAL4* o *A9-GAL4* como se

describe en la sección 6.2. Una vez que eclosionaron las moscas se anestesiaron con CO₂ y se almacenaron en un tubo cónico de 1.5 mL con etanol al 70% hasta juntar al menos 20 individuos, lo cual preserva y suaviza un poco los tejidos. Posteriormente, con ayuda de un par de fórceps, se disecaron los halterios y se almacenaron en un tubo cónico de 1.5 mL con etanol 70% hasta su posterior análisis. Los halterios disecados se transfirieron a una solución de KOH 10% y se hirvieron por 10 minutos. En este punto los halterios pueden centrifugarse por 2 min a 5,000 rpm a temperatura ambiente para bajarlos al fondo del tubo cónico. Posteriormente, se hirvieron en agua destilada por 10 min para lavarlos. Los halterios se transfirieron con una micropipeta con punta recortada a un portaobjetos y después se transfirieron con fórceps, uno por uno a una gota de 13 uL de glicerol al 80% colocada en otro portaobjetos. Finalmente, se selló la preparación con esmalte de uñas para prevenir su desecación y se observaron al microscopio a 20X ó 40X para buscar posibles transformaciones homeóticas parciales de halterio a ala.

6.8 Análisis de proteínas por ensayo tipo Western

Para llevar a cabo el análisis tipo Western se realizaron diferentes procedimientos: 1) Obtención de los extractos o las muestras que queremos estudiar. 2) Separación de las proteínas del extracto o muestra por SDS/PAGE 3) Transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa 4) Inmunodetección de las proteínas de interés y 5) Revelado por quimioluminiscencia de la proteína reconocida por el anticuerpo.

6.8.1 Obtención de extractos y muestras

Se pusieron cruces a 28°C entre hembras *RNAi-tna^{TRIP}* y machos *Act5C-GAL4*. Para distinguir a las larvas *Act5C-GAL4; RNAi-tna^{TRIP}* se utilizó una línea que contiene al "driver" *Act5C-GAL4* en el cromosoma II y en su par contiene el gen de la proteína fluorescente GFP expresada bajo el promotor de actina (CyO, *Act5C-GFP*). Las larvas que contienen este cromosoma son fluorescentes. Se cruzaron hembras *Act5C-GAL4/CyO, Act5C-GFP* con machos *+/+; RNAi-tna^{TRIP}/RNAi-tna^{TRIP}* y se seleccionó a la progenie NO fluorescente *Act5C-GAL4/+; RNAi-tna^{TRIP}/+*.

Se seleccionaron 10 larvas del genotipo apropiado con ayuda de un pincel húmedo y se lavaron en PBS 1X (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7.4) para eliminar restos de comida. Una vez limpias se transfirieron a un pedazo de papel filtro para secarlas y se homogenizaron en 100 uL de buffer de homogenizado (0.05 M Tris-Hcl pH 7.5, 0.25 M KCl, 5 mM MgCl₂,

5 mM EDTA, 8.5% sacarosa, 1% SDS, Coctel de Inhibidores de proteasas Complete de Roche 1X, 0.2 mM PMSF). Se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min a 4°C y se separaron 30 uL de la fase intermedia que contiene al extracto de proteínas. La pastilla y la fase superior contienen principalmente cutículas, restos celulares y tejido adiposo. Finalmente, se les añadió buffer de muestra 5X (250 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, 30% glicerol, 5% β -mercaptoetanol, 0.02% azul de bromofenol), se hirvieron por 10 min y se corrió el gel como se describe en la sección siguiente.

Es importante resaltar que los extractos de proteínas de larvas se cargaron inmediatamente, ya que estos extractos no duran más de 24 h aún si son guardados a -70°C. Inmediatamente después de extraer las proteínas comienza la reacción de melanización, que involucra la degradación de las proteínas del extracto, tornando el extracto de un color café.

Par obtener el extracto de glándulas salivales se pusieron cruza a 28°C entre hembras *RNAi-tna^{TRIP}* y machos con el "driver" indicado como se explica en la sección 6.3. Las larvas se lavaron en PBS 1X para eliminar restos de comida y se transfirieron a PBS 1X limpio. Se disecaron las glándulas salivales de cada larva y se transfirieron a 30 uL de buffer de glándulas salivales (*PBS 1X pH 7.5 con coctel de inhibidores de proteasas Complete de Roche 1X, 0.2 mM de PMSF*). Una vez que se alcanzaron 10 pares de glándulas salivales, se añadió SDS 10% hasta alcanzar una concentración final del 1% y se incubaron en hielo por 5 min. Finalmente, se les añadió buffer de muestra y se hirvieron por 10 min, se centrifugaron por 30 seg a 5,000 rpm a temperatura ambiente y se corrió el gel como se describe en la sección siguiente.

6.8.2 Separación de las proteínas del extracto o muestra por SDS/PAGE.

Para separar las proteínas de interés, primero debe prepararse el gel, ensamblarse la cámara de electroforesis de proteínas y luego aplicar una corriente con un voltaje determinado por un tiempo determinado. La preparación el gel se hace en dos fases. Primero se prepara el gel concentrador y posteriormente el gel separador.

Lo primero que se hace es ensamblar el "cassette" de vidrio donde se va a polimerizar el gel. Posteriormente se prepara la siguiente solución del gel concentrador al 10% para un gel de 0.75 mm grosor y 6 cm de largo, como se describió previamente (Ursitti *et al.*, 1995).

Poliacrilamida 30%/Bisacrilamida 0.8%

1.6 mL

4X Tris-HCl pH 8.8	1.25 mL
Agua destilada	2.1 mL
Persulfato de amonio (PSA) 10%	100 uL
TEMED (TEtraMetilEtilenDiamina).	10 uL

Se vierte esta solución en el “cassette” del gel y se añade un poco de isopropanol para que el gel polimerice uniformemente. El gel polimeriza entre 10 a 15 min a temperatura ambiente. Una vez polimerizado, se retira el isopropanol y se lava con agua destilada. Posteriormente, se prepara la solución del gel separador (3.9%).

Poliacrilamida 30%/Bisacrilamida 0.8%	325 uL
4X Tris-HCl pH 6.8	660 uL
Agua destilada	1.5 mL
Persulfato de amonio (PSA) 10%	100 uL
TEMED (TEtraMetilEtilenDiamina)	5 uL

Se vierte la solución en el “cassette” del gel sobre el gel concentrador y se coloca el peine con la cantidad de pozos deseados. El gel debe polimerizar entre 10 a 15 min a temperatura ambiente. Una vez polimerizado el gel, se arma el “cassette” de acuerdo a las instrucciones del fabricante, se coloca dentro de la cámara, se llena con buffer de corrida (*250 mM Tris base, 192 mM glicina, 0.1% SDS*) y se cargan las muestras. Es importante incluir un control de peso molecular para distinguir las bandas de interés. Finalmente, los extractos se corren a 80 V por 20 min y posteriormente a 120 V por 2 h hasta que salga el frente de corrida.

6.8.3 Transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa

Después de correr el gel, se desmonta del “cassette” y se equilibra en buffer de transferencia (*10mM Tris base, 0.1 M glicina, 10% metanol*) por 5 min para remover el exceso de SDS. Al mismo tiempo, la membrana de nitrocelulosa se equilibra en buffer de transferencia por 5 min. Antes de empezar deben remojar un poco las hojas de espuma fibrosas del sándwich por 5 min. Una vez que se han equilibrado, se ensambla el sándwich para la transferencia. Se colocan los elementos en el orden siguiente: (lado negro del “cassette”) una hoja de espuma fibrosa, un trozo de papel filtro humedecido en buffer de transferencia, el gel de poli(acrilamida), la membrana de nitrocelulosa, un segundo trozo de papel filtro y por último otra hoja de espuma fibrosa (lado gris del “cassette”). Es importante que no queden burbujas entre el gel y la membrana de nitrocelulosa para que las proteínas se transfieran apropiadamente. Las burbujas se remueven con ayuda de

un rodillo pequeño o rodando una pipeta Pasteur sobre la membrana. Una vez ensamblado el sándwich se realiza la transferencia ya sea a 250 mA por tres h a 4°C o a 80 mA toda la noche y después dos h a 250 mA a 4°C. La transferencia se lleva a cabo en buffer de transferencia.

6.8.4 Inmunodetección de las proteínas de interés

Después de la transferencia a la membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad), se bloquea por una hora a temperatura ambiente con leche en polvo (Instant Nonfat Dry Milk, Essential Everyday) diluida en PBST (*PBS 1X + Tween 20 0.05%*) al 10%. Todos los anticuerpos fueron diluidos en leche/PBST al 5%.

La membrana bloqueada, se lava por un minuto con PBST y se añade el anticuerpo primario a la concentración deseada. Posteriormente, se lava la membrana con PBST tres veces por 10 min. Después, se añade el anticuerpo secundario acoplado a la peroxidasa de rábano (HRP; del inglés “horseradish peroxidase”). Finalmente se lava con PBST tres veces por 10 min y se hace un último lavado con PBS 1X.

Para detectar TnaA se utilizó el anticuerpo primario anti-TnaA_{NEP} que reconoce un fragmento de catorce aminoácidos del XSPRING de TnaA (aminoácidos 665–QTLHKRNLLPLEHS-679). Para el análisis de larvas completas, se utilizó este anticuerpo en una dilución 1:4000 por una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se utilizó HRP-anti-conejo en una dilución 1:6000 por una hora a temperatura ambiente como anticuerpo secundario. En el caso de los controles de carga, se utilizaron los anticuerpos concentrados del banco del hibridoma (Developmental Studies Hybridoma Bank) anti-actina (JLA20-c) y anti-beta-tubulina (E7-c) por una hora a temperatura ambiente en una dilución 1:3000 ó 1:4000, respectivamente. Después de la inmunodetección con el anticuerpo primario se lavó la membrana con PBST tres veces por 10 min. Posteriormente, se utilizó HRP-anti-mouse en una dilución 1:3000 por una hora a temperatura ambiente como anticuerpo secundario para actina o beta tubulina, mientras que para actina se utilizó el anticuerpo secundario HRP-anti-ratón (Developmental Studies Hybridoma Bank) en una dilución 1:3000 por una hora a temperatura ambiente.

6.8.5 Revelado de la película radiográfica por quimioluminiscencia

Después del tratamiento con los anticuerpos, se detectó la presencia de las proteínas por quimioluminiscencia. Este proceso se realiza en el cuarto oscuro ya que la presencia de luz puede afectar al proceso de quimioluminiscencia. La membrana fue tratada con el “kit” de quimioluminiscencia Supersignal West Pico

Chemoluminiscent Substrate (Thermo Scientific) en una proporción 1:1 (peróxido de hidrógeno: luminol) por 5 min en total oscuridad. Posteriormente, la membrana se cubre con un pedazo de plástico y se coloca un trozo de película radiográfica (Carestream, Biomax XAR) sobre la membrana cubierta. El tiempo de revelado es variable para cada película radiográfica.

En el ensayo de larvas completas, la película donde se observa a TnaA fue expuesta por 15 seg, mientras que la de actina se expuso por 75 seg.

En el ensayo de glándulas salivales, la película donde se observa a TnaA se expuso por 3 seg, mientras que la de beta-tubulina se expuso por 5 seg.

6.9 Purificación de las proteínas GST y GST-TnaA_{XSPRING} producidas a partir de un cultivo de *E. coli*

Se crece una colonia de bacterias *DH5alpha* transformadas con el plásmido pGEX2T que contiene la secuencia de las proteínas GST o GST-TnaA_{XSPRING} (Monribot-Villanueva *et al.*, 2013) en 2 mL de medio LB con 100 ug/mL de ampicilina toda la noche a 37°C. Se añade el inóculo a 250 mL de medio LB con 100 ug/mL de ampicilina y se crece a 37°C hasta alcanzar una OD₆₅₀ de 0.6 (típicamente 2 h). La expresión de las proteínas se induce con IPTG a una concentración final de 0.4 mM por 3 h a 37°C. La GST se purifica con un protocolo de proteínas solubles y la GST-TnaA_{XSPRING} se purifica con un protocolo de proteínas insolubles, ambos protocolos fueron modificados del reporte de Frangioni y Neel, 1993 y describen a continuación.

Purificación de GST. El cultivo se centrifuga a 3000 rpm por 15 min a 4°C. La pastilla se lava con PBS 1X frío y se centrifuga a 3000 rpm por 15 min a 4°C. La pastilla se resuspende en 5.7 mL de PBS 1X frío. Se añade DTT/PBS a una concentración final de 5 mM y los inhibidores de proteasas PMSF (a una concentración final de 1 mM) e inhibidor de proteasas Complete 1X. La pastilla se sonica en hielo usando tres ciclos de 1 min donde cada segundo se dieron 8 s de sonicación con 12 s de intermitencia con una amplitud del 80%. La pastilla sonicada se centrifuga a 10 krpm por 15 min a 4°C, el sobrenadante se transfiere a un tubo cónico estéril y se añade TritonX100 a una concentración final de 0.1%. El sobrenadante se incuba con 500 uL de perlas de glutatión-sefarosa (GE Healthcare Life Sciences) toda la noche a 4°C con agitación suave.

Purificación de GST-TnaA_{XSPRING}. El medio se centrifuga a 3000 rpm por 15 min a 4°C. La pastilla se lava con STE 1X (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-Cl, pH 7.8) frío y se centrifuga a 3000 rpm por 15 min a 4°C y se resuspende en 5.7 mL de STE 1X frío. Se añade lisozima a una concentración final de 0.1 mg/mL y

se incuba por 15 minutos a 4°C. Se añade DTT/STE a una concentración final de 5 mM a la pastilla. Se añade sarcosil/STE a una concentración final de 1.5% y los inhibidores de proteasas PMSF (a una concentración final de 1 mM) y Complete 1X. La pastilla se sonica en hielo usando tres ciclos de 1 min donde cada segundo se dieron 8 s de sonicación con 12 s de intermitencia con una amplitud del 80%. La pastilla sonicada se centrifuga a 10 krpm por 15 min, el sobrenadante se transfiere a un tubo cónico estéril y se añade TritonX100 a una concentración final de 2%. El sobrenadante se incuba con 500 uL de perlas de glutation-sefarosa (GE Healthcare Life Sciences) toda la noche a 4°C con agitación suave.

6.10 Purificación por afinidad de los anticuerpos anti-Tna_{XSPRING} unidos a una membrana de nitrocelulosa

El anticuerpo anti-Tna_{XSPRING} (Monribot-Villanueva *et al.*, 2009) se generó a partir de suero de conejo inmunizado con la proteína de fusión GST-TnaA_{XSPRING}. Por lo tanto, para la purificación de los anticuerpos que reconocen a TnaA, primero deben separarse los anticuerpos que reconocen a la GST que aunque es muy poco inmunogénica puede generar algún tipo de respuesta en el conejo y después aislar selectivamente a los anticuerpos que reconocen al dominio XSPRING de TnaA en una membrana de nitrocelulosa. Primero, se purifican las proteínas de GST y GST-TnaA_{XSPRING} como se describe en la sección 6.9 y en cada caso se carga 1 mg de proteína en un gel SDS-PAGE preparativo, considerando aproximadamente 150 ug de proteína por cada 0.5 cm de ancho. Las proteínas se electrotransfieren a una membrana de nitrocelulosa como se describe en la sección 6.9, se tiñe la membrana con Ponceau S fresco (0.2% Ponceau S, 1% ácido acético) por 1 min y se lava la membrana con agua destilada hasta que aparezcan las bandas. Se cortan las bandas de interés y se destiñen con solución desteñidora (*acetónitrilo 20%, NaOH 200 uM*) hasta que desaparezca el color rosa (típicamente 1 min). Se remueve la solución desteñidora con agua destilada y se deja secar por completo antes de comenzar.

Las membranas con 1 mg de GST y la que contiene 1 mg de GST-TnaA_{XSPRING} se tratan independientemente con buffer de glicina ácida (*100 mM glicina-HCl, pH 2.5*) por 5 min para remover las proteínas débilmente unidas a la membrana. Se descarta el buffer y se lava 2 veces con TBS (*500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 0.05% de Tween20, pH 7.4*) por 2 min. Las membrana se bloquean con TBSB (*TBS con BSA 3%*) por 1 h a temperatura ambiente con agitación suave y al terminar se lava 2 veces con TBS por 2 min. Se diluyen 2 mL del suero de alto título en 8 mL de TBS y los anticuerpos se dejan unir por 4 h a temperatura ambiente con la membrana que contiene a la GST. Este suero se recupera y

ahora se incuba toda la noche a 4°C con la membrana que contiene a GST-TnaA_{XSPRING}. Al día siguiente, la membrana se lava 2 veces con TBS por 5 min y posteriormente se lava 2 veces con PBS 1X (150 mM NaCl, 20 mM Na₂HPO₄, pH 7.2) por 5 min. Para eluir los anticuerpos anti-TnaA_{XSPRING}, la membrana se incuba con 1 mL de buffer de glicina ácida por 10 min a temperatura ambiente con agitación suave. El buffer se transfiere a un tubo cónico y se neutraliza con 100 µL de Tris 1M pH 8. El buffer se centrifuga a 3000 rpm por 2 min para remover los residuos de membrana y una vez limpio este buffer ahora contiene a los anticuerpos anti-TnaA_{XSPRING}. El anticuerpo se cuantificó utilizando un ensayo de Bradford y las alícuotas se almacenaron a -70°C.

7. RESULTADOS

En trabajos previos del grupo se analizaron individuos con diferentes alelos mutantes de *tna*, que incluyen mutaciones puntuales, mutaciones por inserción de transposones y deleciones de la región donde se encuentra *tna* (Gutiérrez *et al.*, 2003 y Monribot-Villanueva *et al.*, 2013). La caracterización de TnaA producida por los diferentes alelos analizados (Monribot-Villanueva *et al.*, 2013 y Monribot y Vázquez, datos no publicados) nos mostró que en ningún caso se genera una clara falta de función de *tna*. El alelo puntual produce una versión dominante negativa de *tna* (Monribot-Villanueva *et al.*, 2013) y los alelos por inserción incluso producen más TnaA que el alelo silvestre, probablemente por utilizar secuencias promotoras dentro del transposón utilizado para hacer las mutagénesis. Por otro lado las deleciones utilizadas no son las candidatas ideales para analizar los efectos de la falta de función de *tna*, pues estas mutaciones también carecen de otros genes que pueden tener efectos en los fenotipos que pudiera presentar *tna*. En *Drosophila* se han utilizado RNAs largos de doble cadena (dsRNA) para promover la degradación de mRNAs celulares (Fortier *et al.*, 2000). Estos dsRNAs son procesados en fragmentos de 21 nucleótidos y promueven la degradación de los mRNAs por la vía de RNA de interferencia (revisado en Perrimon *et al.*, 2010). La expresión de estos dsRNA se puede regular por la secuencia *UAS*, lo que permite expresar estos dsRNA en tejidos específicos de manera sencilla haciendo uso del sistema *UAS-GAL4* (ver sección 6.3).

Para averiguar con certeza cuál es el efecto de la disminución de TnaA diseñamos una estrategia con RNAs de interferencia. En esta estrategia, se utilizaron dos RNAs de interferencia cuya expresión se encuentra regulada por la secuencia *UAS*. El primero de ellos, que proviene del centro de acopio de Bloomington, se abrevia como *RNAi-tna^{TRiP}*. Este RNAi fue construido en el laboratorio de N. Perrimon (Ni *et al.*, 2008) y consiste en una secuencia complementaria a un segmento de los exones traducidos 3 y 4 de los mRNA B y D de *tna* (Figura 5A, caja verde). El segundo RNAi utilizado proviene del banco de Viena (*RNAi-tna^V*). La línea *RNAi-tna^{VII}* tiene la inserción que produce el RNAi en el cromosoma II y la línea *RNAi-tna^{VIII}* tiene la inserción en el cromosoma III y nos referiremos a ambos como los *RNAi-tna^V*. Este RNAi es complementario a un segmento del exón traducido 3 de los mRNA B y D de *tna* (Figura 5A, caja anaranjada). Los detalles técnicos de cada línea se encuentran en la sección 6.4.

7.1 Los *RNAi-tna* tienen una alta probabilidad de promover únicamente la disminución de los mRNAs de *tna*.

Una vez que recibimos las líneas antes descritas decidimos realizar una prueba bioinformática de especificidad de cada RNAi, puesto que los RNAi podrían promover la degradación de otros blancos celulares en *Drosophila*. Para probar esta hipótesis utilizamos el programa dsCHECK (Naito *et al.*, 2005) que permite encontrar los blancos cruzados de todos los posibles fragmentos generados a partir de un dsRNA. Tanto el *RNAi-tna^{TRiP}* como el *RNAi-tna^V* muestran una gran especificidad por los mRNAs de *tna* a comparación de los posibles blancos cruzados (Figura S1, barras rojas). De acuerdo a este análisis, es altamente probable que los efectos observados en las líneas de moscas que producen estos RNAs de interferencia sean causados por la disminución de TnaA y no por efectos secundarios en la disminución de otra(s) proteínas en *D. melanogaster*.

7.2 La disminución ubicua de *tna* con el *RNAi-tna^{TRiP}* causa letalidad en la etapa adulta

Para elucidar el efecto de TnaA sobre la supervivencia de *Drosophila* decidimos disminuir a TnaA de manera ubicua con el *RNAi-tna^{TRiP}* y con los *RNAi-tna^V*. Para expresar a las construcciones del RNAi de manera ubicua utilizamos el “driver” *Act5C-GAL4*, que promueve la expresión de GAL4 bajo el promotor de Actina 5C, la isoforma más común de la actina en *Drosophila* (Röper *et al.*, 2005).

Se cruzaron hembras *Act5C-GAL4* con machos *RNAi-tna^{TRiP}* o con machos *RNAi-tna^V* tal como se describe en Materiales y Métodos (ver Sección. 6.2) y se contaron las moscas como se describe en la sección 6.6. Las proporciones se obtuvieron dividiendo la cantidad de moscas que expresan al RNAi entre la cantidad de moscas de la clase más sana. Estas cruzas se realizaron con los *RNAi-tna^V* y con el *RNAi-tna^{TRiP}*, cada una a 18, 25 y 28°C puesto que GAL4 puede aumentar la expresión del gen o el RNAi de interés si el animal se incubaba a una temperatura cercana a los 30°C (Fortier y Belote, 2000). En cada caso, los datos se compararon con al menos una cruce recíproca para descartar la posibilidad de que se pudiera observar un efecto materno donde la madre depositara mRNA o TnaA silvestre que rescatara las dosis abatida por el RNAi de TnaA cigótico o de los componentes afectados por la falta de TnaA.

Genotipo		18°C	25°C	28°C
<i>Act5C-GAL4/+;</i> <i>RNAi-tna^{VII}/+</i>	♀	89/108 (82)	81/105 (77)	61/89 (69)
	♂	80/84 (95)	113/120 (94)	8/89 (69)
<i>Act5C-GAL4/+;</i> <i>RNAi-tna^{VIII}/+</i>	♀	95/105 (91)	81/127 (64)	4/98 (4)
	♂	107/114 (94)	46/97 (47)	0/112 (0)
<i>Act5C-GAL4/+;</i> <i>RNAi-tna^{TRiP}/+</i>	♀	81/115 (70)	107/222 (48)	5/125 (4)
	♂	1/109 (1)	1/183 (1)	3/169 (2)

Tabla 1. Letalidad de las moscas que expresan el *RNAi-tna* de manera ubicua. La expresión ubicua de los *RNAi-tna^V* y *RNAi-tna^{TRiP}* se logró utilizando el "driver" *Act5C-GAL4*. Se muestran las proporciones de los individuos adultos que expresan a uno u otro *RNAi-tna* de manera ubicua con respecto a la clase más saludable. Los porcentajes de esta proporción se muestran entre paréntesis. Cada una de las cruza se hizo por triplicado y se muestran los resultados de todas ellas. En todos los casos se observa una mayor letalidad a 28°C que a las otras temperaturas. Nótese la letalidad específica en machos a todas las temperaturas probadas con el *RNAi-tna^{TRiP}* (color rojo). En todos los casos se hicieron cruza recíprocas y no se observaron diferencias en las proporciones comparadas con las cruza directas.

Los resultados obtenidos mostraron que la expresión ubicua tanto del *RNAi-tna^V* y del *RNAi-tna^{TRiP}* causaron letalidad en la etapa adulta tanto en machos como en hembras, siendo los machos más sensibles (Tabla 1).

En condiciones teóricas "suaves" de expresión de RNAi (18°C) encontramos que el *RNAi-tna^V* no altera la supervivencia en ninguna de las dos líneas probadas (*RNAi-tna^{VII}* y *RNAi-tna^{VIII}*), mientras que la expresión ubicua del *RNAi-tna^{TRiP}* a esta temperatura, abate casi completamente la supervivencia de los machos; en tanto que la de las hembras se ve poco afectada. Conforme las condiciones de expresión de los RNAi son más favorables (25 y 28°C) la supervivencia de machos y de hembras se vió más comprometida aunque siempre se observó una mayor sensibilidad en los machos que en las hembras. La reducción en la supervivencia se observó en las moscas que expresan el *RNAi-tna^{TRiP}* desde bajas temperaturas y se agravan conforme aumenta la temperatura. Asimismo la letalidad de las moscas que expresan *RNAi-tna^V* se observó a temperaturas intermedias (25°C) en la línea *RNAi-tna^{VII}* mientras que la de la línea *RNAi-tna^{VIII}* se detectó hasta que estas moscas se crecieron a 28°C. Aunque estas dos últimas expresan el mismo RNAi, la diferencia fenotípica se puede deber a que los sitios de inserción del *RNAi-tna^V* son diferentes. En base a los resultados obtenidos en este experimento decidimos continuar este estudio con la línea que contiene el *RNAi-tna^{TRiP}* por ser

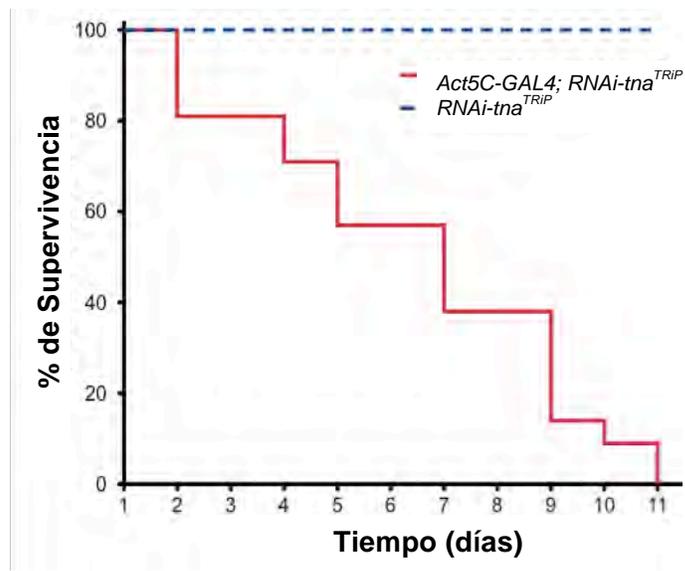


Figura 9. Las moscas con bajas dosis de TnaA viven menos. Gráfica de la longevidad presentada por las hembras adultas que expresan (*Act5C-GAL4; RNAi-tna^{TRIP}*) ó no expresan (*RNAi-tna^{TRIP}*) ubicuamente el *RNAi-tna^{TRIP}*. Se contaron al menos 30 hembras adultas por grupo. Nótese que las hembras adultas que expresan el *RNAi-tna^{TRIP}* de manera ubicua tienen una menor longevidad.

la que parece tener la mejor expresión del RNAi contra el mRNA de *tna*. Estos datos se corroboran con experimentos tipo Western que se muestran más adelante.

En este mismo experimento, encontramos que los machos *Act5C-GAL4; RNAi-tna^{TRIP}* mueren en etapa de pupa temprana y tardía (Tabla 4). Como era de esperarse, en condiciones de mayor expresión del RNAi (25 y 28°C), los individuos mueren en etapas cada vez más tempranas y por lo tanto cada vez son menos los que alcanzan la etapa de pupa (Tabla 4A). A 18°C, 235 individuos del genotipo *Act5C-GAL4; RNAi-tna^{TRIP}* con bajas dosis de TnaA alcanzan la etapa de pupa mientras que 271 individuos del genotipo sin el "driver", *RNAi-tna^{TRIP}* alcanzan esta etapa. A 28°C, sólo 150 individuos *Act5C-GAL4; RNAi-tna^{TRIP}* alcanzan la etapa de pupa en comparación con 310 individuos sin el "driver" que sí lo hacen (Tabla 4A).

Posteriormente analizamos el efecto de la disminución de TnaA en las hembras adultas sobrevivientes y encontramos que las hembras que expresan al *RNAi-tna^{TRIP}* no viven más de 15 días, a comparación de las moscas control que sólo poseen la inserción del *RNAi-tna^{TRIP}* pero no lo expresan (Figura 9).

Genotipo de la vía de SUMOilación	Porcentaje de moscas <i>Act5C-GAL4/+; RNAi-tna^{TRiP}/+</i> sobrevivientes	
	Hembras	Machos
<i>CyO/+</i>	60/107 (56)	8/147 (5)
⁴⁻³ <i>lwr</i> /+	102/107 (95)	36/147 (25)
¹³ <i>lwr</i> /+	140/149 (94)	69/135 (51)
⁰⁴⁴⁹³ <i>smt3</i> /+	89/109 (82)	9/118 (8)

Tabla 2. Supresión de la letalidad causada por la expresión ubicua del *RNAi-tna^{TRiP}* en individuos defectuosos en la vía de SUMOilación. Se muestra el aumento en la supervivencia de individuos adultos con bajas dosis en TnaA (*Act5C-GAL4/+; RNAi-tna^{TRiP}/+*) en presencia de alelos hipomorfos que afectan la enzima E2 Ubc9 (*lwr*) y SUMO (*smt3*) de la vía SUMOilación. Todos los individuos de esta Tabla, excepto el control (*CyO/+*) expresan el *RNAi-tna^{TRiP}* ubicuamente (*Act5C-GAL4/+; RNAi-tna^{TRiP}/+*). Los alelos de la vía de SUMOilación se introdujeron genéticamente en el cromosoma II sustituyendo al cromosoma balanceador *CyO* con el cromosoma II que contiene el alelo de SUMOilación en estudio. La supervivencia se indica como la proporción de moscas del genotipo estudiado con respecto al número de moscas encontradas del genotipo más sano de cada cruce. Los porcentajes se muestran entre paréntesis. Cada una de las cruces se hizo por triplicado y se muestran los resultados de todas ellas. Nótese la supresión de la letalidad tanto en hembras como en machos. En todos los casos se hicieron cruces recíprocas y no se observaron diferencias en las proporciones.

7.3 La disminución ubicua de TnaA en combinación con mutantes de la vía de SUMOilación rescata al fenotipo de letalidad.

Dado que existen diversas evidencias de que TnaA es una E3 ligasa de SUMO (Gutiérrez *et al.*, 2003; Monribot-Villanueva *et al.*, 2013) pensamos que para obtener una mayor penetrancia del fenotipo de transformación homeótica de halterio a ala podríamos expresar al *RNAi-tna^{TRiP}* en combinación con mutantes que causaran una pérdida de función de la vía de SUMOilación. Para esto contamos con líneas con dos alelos hipomorfos de Ubc9 (codificada por *lwr*) y una línea con un alelo hipomorfo de SUMO (codificado por *smt3*). Los detalles de las cruces pueden verse en la sección 6.2 de Materiales y Métodos.

Para comenzar con nuestro análisis comparamos la supervivencia de las moscas con bajas dosis de TnaA (*Act5C-GAL4/+; RNAi-tna^{TRiP}/+*) (hembras 56%, machos 5% Tabla 2) con aquellas a las que además se les introdujo algún alelo

Genotipo		Porcentaje de sobrevivientes		
		18°C	25°C	28°C
<i>Act5C-GAL4/RNAi-smt3</i> ; +/+	♀	0/120 (0)	0/213 (0)	0/132 (0)
	♂	0/117 (0)	0/187 (0)	0/140 (0)
<i>Act5C-GAL4/RNAi-smt3</i> ; <i>RNAi-tna</i> ^{TRIP} /+	♀	-	0/296 (0)	0/295 (0)
	♂	-	0/261 (0)	0/246 (0)

Tabla 3. La expresión ubicua del RNAi-smt3 es letal. Se muestran las proporciones de los individuos adultos que expresan el *RNAi-smt3* o los *RNAi-smt3* y *RNAi-tna*^{TRIP} de manera ubicua. La sobrevivencia se indica como la proporción de moscas adultas del genotipo estudiado con respecto al número de moscas encontradas del genotipo más sano de cada cruce. Los porcentajes se muestran entre paréntesis. Cada una de las cruces se hizo por triplicado. Se hicieron cruces recíprocas y no se observaron diferencias en las proporciones. A 18°C, no se contó la proporción de moscas que expresan al *RNAi-smt3* y al *RNAi-tna*^{TRIP} de manera ubicua (indicadas con un guión).

hipomorfo de la vía de SUMOilación (*lwr*¹³/*Act5C-GAL4*; *RNAi-tna*^{TRIP}/+, *lwr*⁴⁻³/*Act5C-GAL4*; *RNAi-tna*^{TRIP}/+, o *smt3*⁰⁴⁴⁹³/*Act5C-GAL4*; *RNAi-tna*^{TRIP}/+). Sorpresivamente observamos que las moscas con disminución en Ubc9 y en TnaA (*lwr*¹³/*Act5C-GAL4*; *RNAi-tna*^{TRIP}/+, *lwr*⁴⁻³/*Act5C-GAL4*; *RNAi-tna*^{TRIP}/+) mejoran su sobrevivencia (hembras 95 y 94% y machos 25 y 51%, para *lwr*⁴⁻³ y *lwr*¹³ respectivamente, Tabla 2). De manera similar las hembras con disminución de SUMO y de TnaA (*smt3*⁰⁴⁴⁹³/*Act5C-GAL4*; *RNAi-tna*^{TRIP}/+) sobrevivieron más (82%) que las moscas que sólo tienen la disminución ubicua de TnaA (*Act5C-GAL4*/+; *RNAi-tna*^{TRIP}/+) (56%, Tabla 2). El único caso donde no observamos esta restauración de la viabilidad fueron los machos con disminución de SUMO y de TnaA (*smt3*⁰⁴⁴⁹³/*Act5C-GAL4*; *RNAi-tna*^{TRIP}/+) que sobrevivieron casi igual (8%) que los machos sin *smt3*⁰⁴⁴⁹³ (*Act5C-GAL4*; *RNAi-tna*^{TRIP}/+) (5%, Tabla 2).

Posteriormente se expresó ubicuamente un RNAi dirigido contra *smt3* con el “driver” *Act5C-GAL4*. Esto causó 100% de letalidad aún a baja temperatura (18°C) (Tabla 3). La expresión del *RNAi-smt3* en combinación con el *RNAi-tna*^{TRIP} también causó el 100% de letalidad (Tabla 3).

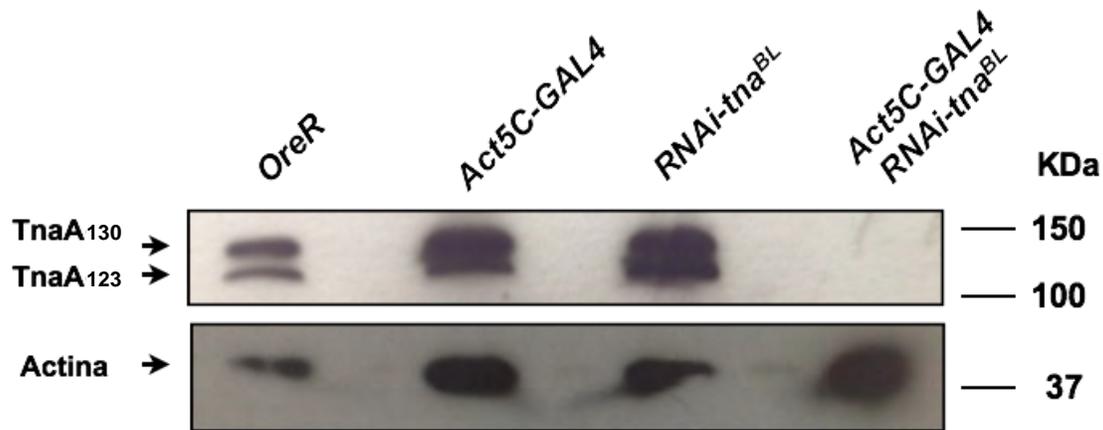


Figura 10. Disminución ubicua de TnaA en larvas de tercer instar que expresan al *RNAi-tna^{TRiP}* a 28°C. Análisis tipo Western de extractos de proteína total de larvas completas de los genotipos indicados en la parte superior. La presencia de TnaA (panel superior) se determinó con el anticuerpo anti-TnaA_{NEP} que se utilizó a una dilución 1:2000. Se observan las bandas correspondientes a TnaA₁₃₀ y TnaA₁₂₃ en los tres primeros carriles y no en el extracto obtenido de las larvas que expresan el *RNAi-tna^{TRiP}* (*Act5C-GAL4; RNAi-tna^{TRiP}*). Como control de carga se utilizó actina (anti-actina a una concentración 1:3000). Se cargaron aproximadamente tres larvas por carril.

7.4 La expresión ubicua del *RNAi-tna^{TRiP}* abate la expresión de TnaA en larvas de tercer instar.

Para corroborar que *RNAi-tna^{TRiP}* disminuye la dosis de TnaA en estos experimentos, se determinó la presencia de TnaA en un ensayo tipo Western con el anticuerpo anti-TnaA_{NEP} que detecta en larvas completas las formas correspondientes a TnaA₁₃₀ y TnaA₁₂₃ (Monribot-Villanueva *et al.*, 2013). Para distinguir a las larvas con los genotipos deseados se utilizó la estrategia genética detallada en Material y Métodos Sección 6.2 y se obtuvieron extractos de proteínas solubles totales de larvas de tercer instar que produjeran o no el *RNAi-tna^{TRiP}* a 28°C (Figura 10). Se utilizaron extractos obtenidos de larvas que expresan el RNAi (*Act5C-GAL4; RNAi-tna^{TRiP}*), y para comparación extractos de la línea silvestre *Oregon R* (*OreR*) y de larvas que sólo tienen el "driver" (*Act5C-GAL4/Act5C-GFP*) o el RNAi (*RNAi-tna^{TRiP}/RNAi-tna^{TRiP}*) (Ver Material y Métodos Sección 6.8.1). Encontramos que el *RNAi-tna^{TRiP}* que se produce en estas condiciones abate completamente la producción de TnaA₁₃₀ y TnaA₁₂₃.

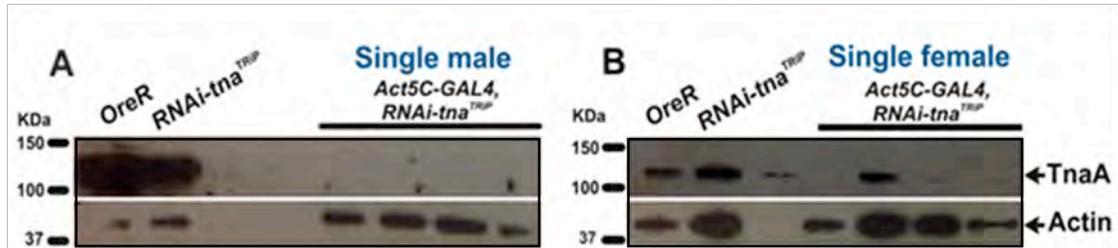


Figura 11. Las larvas de tercer instar machos son más sensibles a la disminución ubicua de TnaA que las hembras. Análisis tipo Western de larvas individuales de tercer instar macho (A) y cuatro larvas hembra (B). La presencia de TnaA se determinó en extractos de larvas de tercer instar silvestres OregonR (OreR), de larvas con el *RNAi-tna^{TRIP}* sin "driver" (*RNAi-tna^{TRIP}*) y con el "driver" *Act5C-GAL4* (*Act5C-GAL4;RNAi-tna^{TRIP}*). Nótese la ausencia total de TnaA en todas las larvas macho analizadas y en algunas larvas hembra del genotipo *Act5C-GAL4;RNAi-tna^{TRIP}*. El anticuerpo anti-TnaA_{NEP} se utilizó a una dilución 1:2000. Como control de carga se utilizó actina (anti-actina a una concentración 1:3000).

Las diferencias observadas entre la supervivencia de hembras y machos que expresan al *RNAi-tna^{TRIP}* (Tabla 1) nos llevaron a hipotetizar que la reducción de TnaA en los machos era mayor y/o más homogénea que la de las hembras. Para probar esta hipótesis analizamos individualmente la presencia de TnaA en extractos de varias larvas macho y hembra de tercer instar por ensayos tipo Western. Los resultados se muestran en la Figura 11 y aunque son muy pocos individuos analizados, se puede apreciar que en los machos analizados encontramos más uniformidad en los niveles bajos de expresión de TnaA, mientras que algunas hembras *Act5C-GAL4; RNAi-tna^{TRIP}* sí presentaron niveles detectables de TnaA.

7.5 La disminución ubicua de *tna* con el *RNAi-tna^{TRIP}* causa letalidad en la etapa de pupa y la aparición de defectos en la eversión de la cabeza.

Para determinar el efecto de la disminución ubicua de TnaA en la etapa de pupa, se obtuvieron individuos que expresaran el *RNAi-tna^{TRIP}* (*Act5C-GAL4; RNAi-tna^{TRIP}*) a 18, 25 y 28°C. La supervivencia de estos individuos se comparó con la de sus hermanos que no contienen el "driver" *Act5C-GAL4* y por lo tanto no expresan el *RNAi-tna^{TRIP}* (Tabla 4). La etapa de pupa en *Drosophila* dura en promedio 100 horas APF (Bainbridge y Bownes, 1981) y su desarrollo se ha dividido en temprano (0-76 h APF) (por sus siglas en inglés "After Puparium Formation") y tardío (76-100 h APF) de acuerdo a la aparición de las quetas dorsales y a la pigmentación de las alas (Bainbridge y Bownes, 1981). En general encontramos que mientras más se expresa el *RNAi-tna^{TRIP}* en las diferentes condiciones de temperatura probadas, se presenta letalidad cada vez más acentuada tanto en la etapa temprana como en la tardía. Al igual que en la etapa

adulta, en la etapa de pupa tardía también mueren más los machos que las hembras que expresan el *RNAi-tna^{TRIP}* a la temperatura más extrema probada (28°C) (Tabla 4B).

A

Temperatura (°C)	Individuos que alcanzan la etapa de pupa
18	235/271 (87)
25	250/418 (60)
28	150/310 (48)

B

Temperatura (°C)	Genotipo	Pupa temprana	Pupa tardía	
			Sin cabeza	
18	<i>Act5C-GAL4; RNAi-tna^{TRIP}</i>	17/235 (7)	0/235 (0)	134/235 (57)
	<i>RNAi-tna^{TRIP}</i>	0/271 (0)	0/271 (0)	37/271 (13)
25	<i>Act5C-GAL4; RNAi-tna^{TRIP}</i>	30/250 (12)	3/250 (1)	109/250 (44)
	<i>RNAi-tna^{TRIP}</i>	0/418 (0)	0/418 (0)	13/418 (3)
28	<i>Act5C-GAL4; RNAi-tna^{TRIP}</i>	53/150 (35)	12/150 (8)	♀ 65/150 (43)
				♂ 12/150 (8)
	<i>RNAi-tna^{TRIP}</i>	0/310 (0)	0/310 (0)	♀ 7/310 (2)
				♂ 9/310 (3)

Tabla 4. Los individuos con bajos niveles de TnaA mueren en etapa de pupa. A) Cantidad de individuos con bajas dosis de TnaA que alcanzaron al menos la etapa de pupa, nótese que conforme aumenta la temperatura, disminuye el porcentaje de individuos que alcanzan esta etapa, lo que sugiere letalidad en etapas anteriores. B) Proporciones de pupas totales del genotipo especificado muertas en etapas tempranas y tardías a tres temperaturas diferentes. Los porcentajes están entre paréntesis. Nótese que la muerte en las pupas aumenta con la temperatura, lo cual corresponde con el aumento en la expresión del *RNAi-tna^{TRIP}*. Además, algunas de las pupas que mueren en etapas tardías muestran ausencia de cabeza. Cada una de las cruza se hizo por triplicado y se muestran los resultados de todas ellas. En todos los casos se hicieron cruza recíprocas y no se observaron diferencias en las proporciones comparadas con las cruza directas. A 28°C, se muestran los datos de machos y hembras por separado, puesto que fue la única condición donde observamos diferencias en la supervivencia según el sexo.

Notoriamente, al analizar a los individuos *Act5C-GAL4; RNAi-tna^{TRIP}* dentro de las pupas, se observó que algunos de ellos no tenían cabeza (Tabla 4B y Figura 12B). El número de animales *Act5C-GAL4; RNAi-tna^{TRIP}* que presenta este defecto (penetrancia), aumenta con la temperatura, lo cual corresponde a una

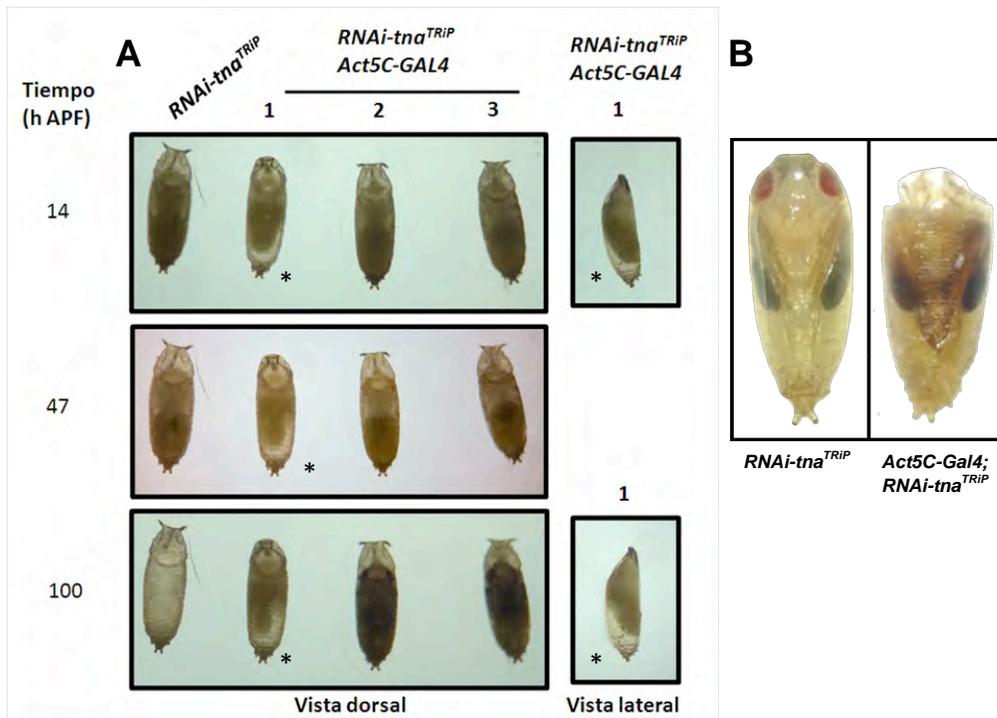


Figura 12. Algunas pupas con disminución ubicua de TnaA mueren durante el proceso de eversión de la cabeza. A) En los paneles de la izquierda se observan pupas *Act5C-GAL4; RNAi-tna^{TRIP}* (1-3) y un control que sólo posee a la inserción del *RNAi-tna^{TRIP}*. Las imágenes fueron tomadas a las 14, 47 y 100 h APF. La pupa uno (de izquierda a derecha) murió durante el proceso de desplazamiento de la burbuja de gas (*) hacia la parte anterior (ver paneles correspondientes a 47 y 100 h). Nótese la posición de la burbuja desde una vista lateral (paneles de la derecha). Las pupas dos y tres murieron en etapas finales de la metamorfosis. Nótese como a las 100 horas la pupa control ha emergido mientras que las otras permanecen dentro. B) Algunos faratos que expresan al *RNAi-tna^{TRIP}* de manera ubicua (*Act5C-GAL4; RNAi-tna^{TRIP}*, panel derecho) presentan defectos en la eversión de la cabeza. A 28°C, 12 de 143 pupas *Act5C-GAL4; RNAi-tna^{TRIP}* no eclosionadas presentaron estos defectos. Como referencia (panel izquierdo) se observa un farato que no expresa el *RNAi-tna^{TRIP}* por que no tiene el "driver" *Act5C-GAL4*.

mayor disminución de TnaA. A 18°C no se observa el defecto (0/235 pupas). A 25°C, el 1% no evierte la cabeza (3/250 pupas) y a 28°C el 8% no evierten la cabeza (12/150 pupas). En las larvas silvestres la cabeza adulta se forma a partir de la fusión de los discos labial, clipeolabrum, protórax dorsal y ojo-antena. Durante este proceso, los discos se fusionan de manera coordinada formando un saco que evierte a las 12.5 h APF a 25°C y posteriormente el saco de cabeza continua su desarrollo dando lugar a la probóscide, ojos y antenas. Cuando disecamos los faratos *Act5C-GAL4; RNAi-tna^{TRIP}*, se determinó que a pesar de no

tener cabeza presentan un remanente de cutícula que parece provenir del saco de cabeza (Figura 12B, panel derecho). El defecto en el desarrollo de la cabeza puede deberse a dos fenómenos. En un primer escenario el saco de cabeza se forma, pero los faratos presentan un fallo en el proceso de eversión, lo cual impide su desarrollo apropiado después de evertir. En un segundo escenario la cabeza NO se forma apropiadamente antes o después del proceso de eversión, por lo que no puede seguir desarrollándose aunque el saco de cabeza everta apropiadamente. Para entender mejor este proceso observamos a los animales *Act5C-GAL4; RNAi-tna^{TRIP}* antes, durante y después del proceso de eversión de la cabeza. Estudiamos este proceso a 28°C, donde determinamos que la cabeza everta aproximadamente a las 9.5 horas APF en individuos silvestres y el periodo de pupa dura aproximadamente 90 horas. Las pupas se montaron sobre un cubreobjetos y se observaron a las 10, 14, 47 y 100 horas APF. Después de analizar varias preparaciones descubrimos que algunos individuos no evertían la cabeza y permanecían en la etapa de formación de la burbuja de gas posterior (Figura 12A), la cual ocurre justo antes de la eversión de la cabeza (ver Sección 1.8). Estos resultados sugieren que los faratos con bajas dosis de TnaA tienen problemas en el desarrollo de la cabeza antes o durante el proceso de eversión.

7.6 La disminución de TnaA provoca transformaciones homeóticas parciales de halterio a ala.

Previamente se había mostrado que individuos con bajas dosis de TnaA presentan una transformación parcial de halterio en ala (Gutiérrez *et al.*, 2003). Además individuos adultos con alelos mutantes de *tna* en combinación con alelos mutantes de *brm* o de *osa* presentan un fenotipo de extensión de alas (Gutiérrez *et al.*, 2003) que se ha relacionado a la falta de actividad del promotor *P2* de *Antp* (Vázquez *et al.*, 1999). Analizamos la expresión de TnaA en discos de halterio y de ala de moscas silvestres mediante un análisis tipo Western, donde encontramos que efectivamente TnaA se encuentra presente en ambos discos (Figura 13).

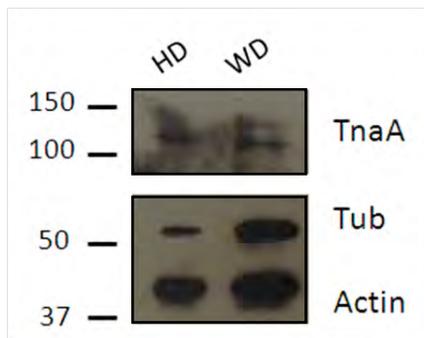


Figura 13. TnaA se expresa en el disco del halterio y del ala. Análisis tipo Western de TnaA en 22 discos de halterio (HD) y 12 discos de ala (WD). Se observa la presencia de TnaA en ambos discos y se aprecia un doblete en el disco del ala (TnaA₁₃₀ y TnaA₁₂₃, Monribot-Villanueva *et al.*, 2013). Tubulina y Actina se utilizaron como controles de carga. Los anticuerpos se utilizaron a las concentraciones especificadas en Material y Métodos.

En este contexto supusimos que la disminución de TnaA con nuestra línea productora de RNAi afectaría el desarrollo del halterio (y del ala) en el mismo sentido que las mutantes utilizadas por Gutiérrez *et al.*, (2003). Por lo tanto se buscaron transformaciones homeóticas en los halterios de individuos con bajas dosis de TnaA causadas por la expresión del *RNAi-tna^{TRiP}*. Con este objetivo dirigimos la expresión del *RNAi-tna^{TRiP}* con el "driver" *Act5C-GAL4* para su expresión ubicua y con los "drivers" *A9-GAL4* (Haerry *et al.*, 1998) y *MS1096-GAL4* (Neumann y Cohen, 1996) a regiones específicas del disco de halterio.

Encontramos que, a 25°C, el 16% de los individuos *Act5C-GAL4; RNAi-tna^{TRiP}* presentan al menos un halterio transformado (Tabla 5). No pudimos hacerlo a 28°C porque como se mostró en la sección 7.2 hay una alta letalidad de adultos en estas condiciones. Estos halterios presentan quetas que indican la transformación a ala, únicamente en la parte anterior del halterio en el límite entre la parte dorsal y ventral en dos variantes, una con una queta corta pero más gruesa (Figura 14 F) y la otra con un par de quetas largas y gruesas (Figura 14E), que representan dos grados de expresividad del mismo fenotipo. De manera similar cuando dirigimos la expresión del *RNAi-tna^{TRiP}* con los "drivers" *A9-GAL4* (Figuras 14H-I) o *MS1096-GAL4* (Figuras 14K-L) a 28°C, se observa 15% y 8%, respectivamente de los individuos que expresan el *RNAi-tna^{TRiP}* con la transformación homeótica de halterio a ala (Tabla 5). Al igual que con el "driver" *Act5C-GAL4* encontramos dos variantes del fenotipo de transformación, aunque las quetas observadas en estos halterios transformados eran más grandes y gruesas (Figuras 14I y 14L) que las observadas con la disminución ubicua (Figura 14E). Estas quetas no siempre estaban orientadas en la misma dirección que las quetas normales del halterio, lo cual indica que su polaridad es diferente a la de las quetas normales del halterio (Figura 14L).

En resumen, comprobamos que la disminución de TnaA en el halterio causada por la expresión del *RNAi-tna^{TRiP}* promueve su transformación homeótica a ala como se había mostrado con alelos clásicos de *tna*, lo que muestra que nuestro sistema funciona y que será útil para experimentos venideros.

Genotipo de Interés	Individuos con al menos un halterio transformado
<i>RNAi-tna^{TRiP}/+</i>	0/96 (0)
<i>Act5C-GAL4/+</i>	0/85 (0)
<i>A9-GAL4/A9-GAL4</i>	0/110 (0)
<i>MS1096-GAL4/MS1096-GAL4</i>	0/95 (0)
<i>Act5C-GAL4/+; RNAi-tna^{TRiP}/+</i>	22/136 (16)
<i>A9-GAL4/w⁻; +; RNAi-tna^{TRiP}/+</i>	53/345 (15)
<i>MS1096-GAL4/w⁻; +; RNAi-tna^{TRiP}/+</i>	12/152 (8)
<i>RNAi-smt3/+</i>	0/103 (0)
<i>RNAi-smt3/+; RNAi-tna^{TRiP}/+</i>	0/229 (0)
<i>A9-GAL4/w⁻; RNAi-smt3/+</i>	16/116 (14)
<i>A9-GAL4/w⁻; RNAi-smt3/+; RNAi-tna^{TRiP}/+</i>	20/135 (15) **
<i>MS1096-GAL4/w⁻; RNAi-smt3/+</i>	13/127 (10)
<i>MS1096-GAL4/w⁻; RNAi-smt3/+; RNAi-tna^{TRiP}/+</i>	19/119 (16) **

Tabla 5. La expresión del *RNAi-tna^{TRiP}* y/o del *RNAi-smt3* dirigido(s) al disco del halterio causa transformaciones homeóticas parciales de halterio en ala. Las proporciones fueron determinadas contando el número de moscas con al menos un halterio transformado entre el total de moscas del genotipo indicado. Las imágenes representativas se encuentran en las Figuras 15 y 16. Los porcentajes (mostrados entre paréntesis) fueron calculados contando la descendencia de al menos tres cruza independientes. Las cruza recíprocas presentaron un porcentaje similar de transformaciones homeóticas. En el caso de las moscas con bajas dosis de TnaA y SUMO (**), se tomaron en cuenta los individuos con al menos un halterio que presentaban tanto una deformación del halterio como quetas ectópicas, ya que ambas representan una transformación parcial de halterio en ala (ver Figuras 15 y 16).

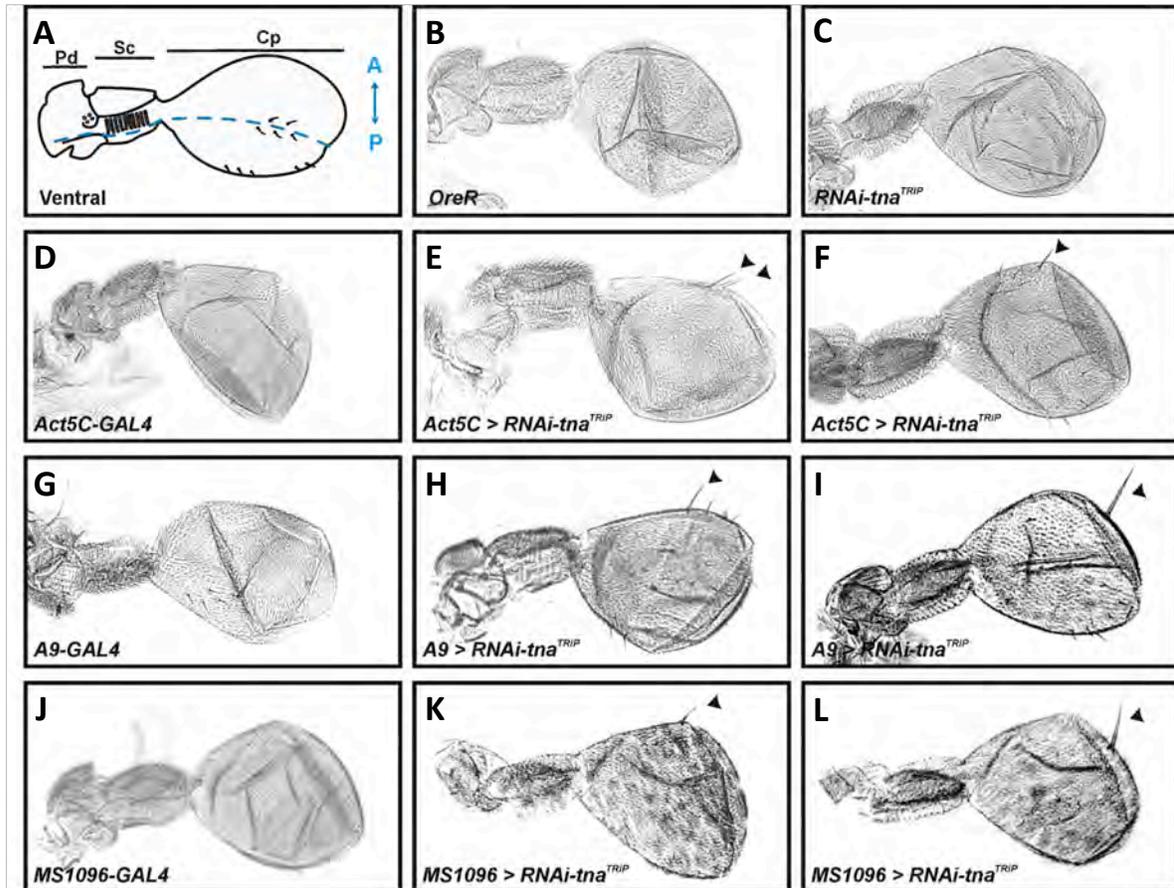


Figura 14. La expresión del $RNAi-tna^{TRIP}$ causa una transformación homeótica parcial de halterio en ala. Se muestra un esquema del halterio silvestre como referencia (A). Los controles son los halterios de las moscas wt ($OreR$) y de las moscas que tienen al $RNAi-tna^{TRIP}$ pero no lo expresan (B-C). Además, se muestran los controles de los "drivers" $Act5C-GAL4$ (D), $A9-GAL4$ (G) y $MS1096-GAL4$ (J). Todas las condiciones probadas muestran dos grados de expresividad del mismo fenotipo, por lo que se incluyen dos fotografías con cada una de las variantes. Se muestran las variantes de transformación homeótica de los halterios con expresión del $RNAi-tna^{TRIP}$ dirigida con los "drivers" $Act5C-GAL4$ (E-F), $A9-GAL4$ (H-I) y $MS1096-GAL4$ (K-L). Nótese que en todos los casos las quetas de los halterios transformados aparecen en la región anterior del capitelo cerca del límite de la región dorsoventral (indicadas con una flecha). Pd. Pedicelo, Sc. Escabelo, Cp. Capitelo.

7.7 La disminución conjunta de TnaA y de SUMO en el disco del halterio aumenta la expresividad de la transformación de halterio a ala.

Se sabe que al bajar las dosis de SUMO en el disco del halterio con el *RNAi-smt3* se provoca una transformación homeótica parcial del halterio en ala (Smith *et al.*, 2011). Además, la expresión del *RNAi-smt3* en el disco del ala hace que las moscas presenten alas arrugadas con manchas cafés (Huang *et al.*, 2011). Como se ha mencionado, los individuos con mutaciones heteroalélicas de *tna* presentan transformaciones homeóticas de halterio en ala (Gutiérrez *et al.*, 2003), lo cual concuerda con nuestros datos anteriores que muestran que los halterios con bajas dosis de TnaA presentan esta transformación (sección 7.6). En función de lo anterior, razonamos que, si TnaA es una E3-ligasa de SUMO importante para el desarrollo del halterio, las moscas que conjuntamente tengan bajas dosis de TnaA y de SUMO presentarán transformaciones homeóticas más fuertes que las que sólo tienen bajas dosis de TnaA.

Para comenzar, validamos los fenotipos causados por la expresión del *RNAi-smt3* en el disco del halterio tanto con el "driver" *A9-GAL4* (Figura 15) como con el *MS1096-GAL4* (Figura 16). Con el "driver" *A9-GAL4* a 28°C, el 14% de las moscas que expresan el *RNAi-smt3* presentan halterios con quetas ectópicas en el borde de la región anteroposterior (Figura 15E-F y Tabla 5). Sabiendo que la expresión del *RNAi-smt3* en el halterio causa los efectos reportados, probamos la disminución de TnaA en este fondo, para lo que coexpresamos el *RNAi-tna^{TRiP}* con los "drivers" *A9-GAL4* o *MS1096-GAL4* que dirigen la expresión al disco de halterio (para ver los detalles de la expresión de estos "drivers" ver sección 6.4). Cuando dirigimos la expresión de estos RNAi con el "driver" *A9-GAL4* a 28°C, las pupas murieron como faratos después de haberse desarrollado por completo pero nunca eclosionaron. Los faratos fueron extraídos de la pupa cuidadosamente para observar sus halterios. El 20% de los faratos presentaron en al menos uno de sus halterios, una disminución del tamaño del capitulo o una deformación del mismo (Figura 15G-I y Tabla 5).

Cuando dirigimos la expresión de los RNAis con el "driver" *MS1096-GAL4* que es más suave que el *A9-GAL4* a 28°C encontramos que sobrevive el 20% de las moscas hasta la etapa adulta, lo que nos permitió observar fácilmente los fenotipos en el 27% de estas moscas adultas. Estos animales presentaron en al menos uno de sus halterios, una disminución del tamaño del capitulo o una deformación del mismo (Figura 16E-F y Tabla 5).

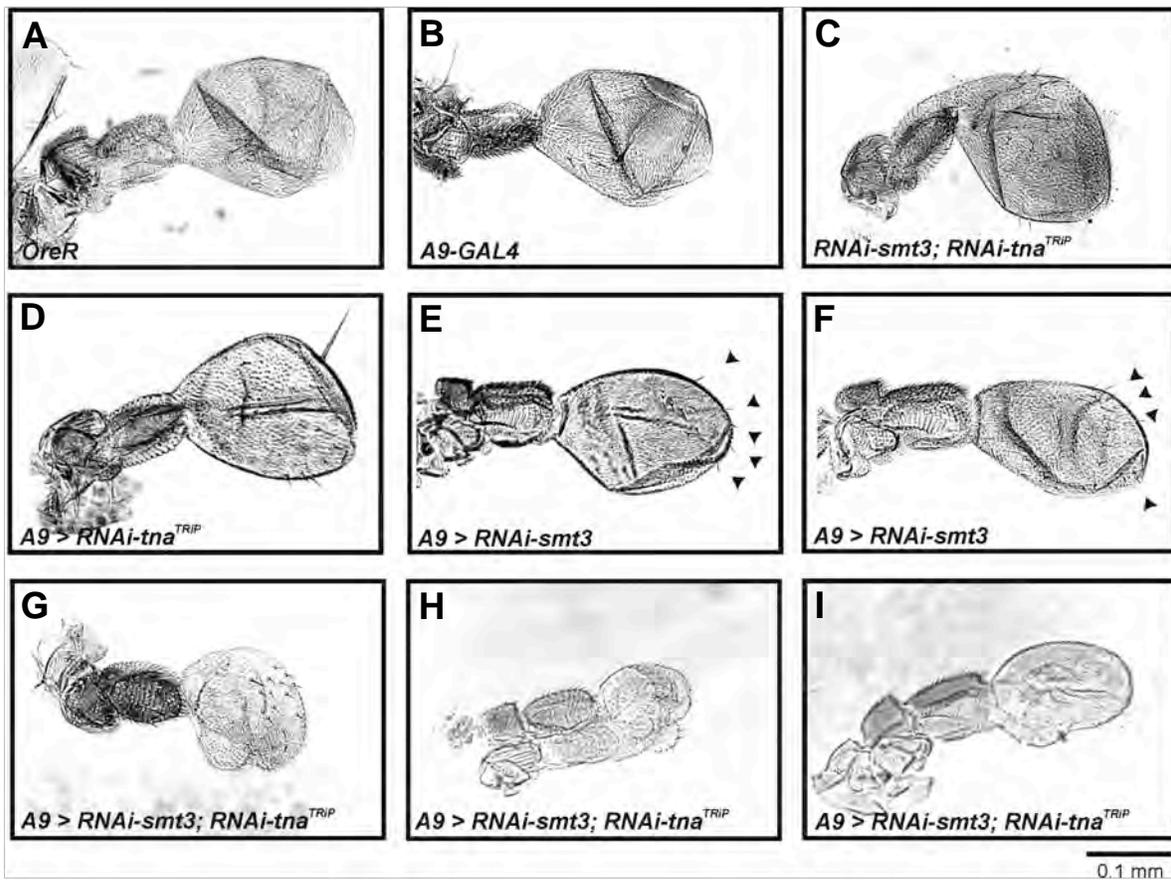


Figura 15. La disminución de TnaA y SUMO con el “driver” *A9-GAL4* en el disco de halterio provoca aparición de quetas ectópicas y defectos en el desarrollo del capitulo. Halterios con transformaciones homeóticas en moscas adultas *A9-GAL4; RNAi-smt3* y *A9-GAL4; RNAi-smt3; RNAi-tna^{TRIP}* y como controles los halterios no transformados de las moscas silvestres *OreR*, las que sólo tienen el “driver” *A9-GAL4* ó sólo los *RNAi-smt3; RNAi-tna^{TRIP}* que no se expresan. Nótese las quetas ectópicas de las moscas *A9-GAL4; RNAi-smt3* y de las *A9-GAL4; +; RNAi-tna^{TRIP}* y la exacerbación del fenotipo con la deformación del capitulo además de las quetas ectópicas de las moscas *A9-GAL4; RNAi-smt3; RNAi-tna^{TRIP}*.

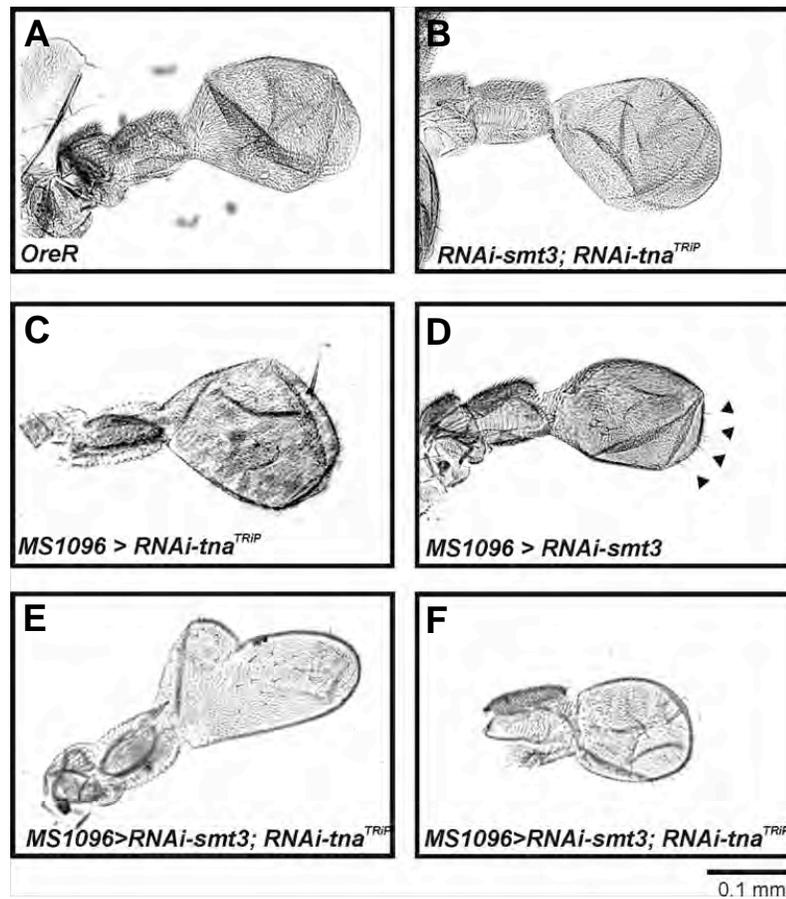


Figura 16. La disminución de TnaA y de SUMO con el “driver” *MS1096-GAL4* en el disco de halterio provoca defectos en el desarrollo del capitelo. Halterios con transformaciones homeóticas en moscas adultas *MS1096-GAL4; RNAi-smt3* y *MS1096-GAL4; RNAi-smt3; RNAi-tna^{TRIP}* y como control a los halterios no transformados de las moscas *RNAi-smt3; RNAi-tna^{TRIP}* que no expresan a los RNAi. Nótese las quetas ectópicas de las moscas *MS1096-GAL4; RNAi-smt3* y la deformación del capitelo de las moscas *MS1096-GAL4; RNAi-smt3; RNAi-tna^{TRIP}*.

Como el "driver" *MS1096-GAL4* además de dirigir la expresión al halterio, también la dirige al tórax (Figura 17A) y al ala (Figura 17B, pudimos observar que a 28°C, las moscas adultas con bajos niveles de SUMO presentan alas arrugadas con manchas cafés (Figura 17B) como se había reportado previamente (Huang *et al.*, 2011). El 100% de las moscas sobrevivientes con bajas dosis de TnaA y SUMO (*MS1096-GAL4>RNAi-smt3;RNAi-tna^{TRiP}*) tienen defectos en las macroquetas del tórax (Figura 17A) y/o en el desarrollo del ala (Figura 17B).

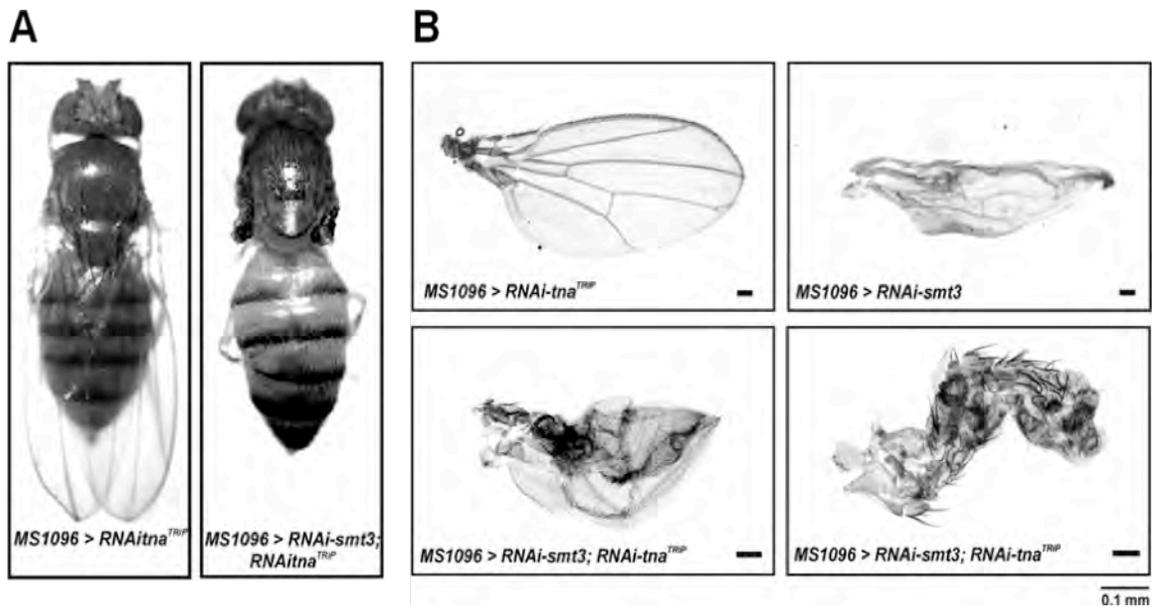


Figura 17. La disminución de TnaA y SUMO con el "driver" *MS1096-GAL4* en el disco de ala provoca defectos en el desarrollo de las alas y de las macroquetas del tórax. (A) Moscas que expresan al *RNAi-tna^{TRiP}* (izq.) ó el *RNAi-smt3* (no mostrada) o conjuntamente el *RNAi-smt3* y al *RNAi-tna^{TRiP}* (der.) bajo el control del "driver" *MS1096-GAL4* a 28°C. Nótese que las moscas que expresan ambos RNAis, carecen de algunas macroquetas del tórax (panel A, derecha) además de mostrar defectos en las alas (panel B, abajo). (B) Las alas de las moscas con bajas dosis de TnaA (arriba a la izquierda) no presentan defectos en el desarrollo del ala. En contraste, el 100% las moscas con bajas dosis de SUMO (arriba a la derecha) presentan alas arrugadas. El 100% de las moscas con bajas dosis de TnaA y de SUMO presentan alas más pequeñas (ver escala) y con una deformación mucho más severa (abajo).

7.8 Obtención de cromosomas politénicos de larvas de tercer instar con bajas dosis de TnaA

Dado que *tna* interacciona genéticamente con *brm* y *osa* (Gutiérrez *et al.*, 2003), uno de los objetivos de este trabajo fue obtener cromosomas politénicos de las glándulas salivales de larvas de tercer instar con TnaA disminuido o ausente para estudiar si TnaA influye en el perfil de asociación a la cromatina de las subunidades Brm y Osa del complejo BAP. En la sección 7.4 mostramos que la expresión de TnaA disminuye fuertemente (Figura 10) en larvas de tercer instar que expresan ubicuamente el *RNAi-tna^{TRiP}* (*Act5C-GAL4; RNAi-tna^{TRiP}*). Para este objetivo, y como primera aproximación determinamos que las glándulas salivales de estos animales tuvieran muy poco TnaA (Figura 18A). Sin embargo como la disminución ectópica de TnaA causa una elevada letalidad (Tabla 1) buscamos condiciones menos severas que nos permitieran tener animales más sanos. Entonces dirigimos la expresión del *RNAi-tna^{TRiP}* más limitadamente a las glándulas salivales. Para ésto utilizamos los "drivers" *Sgs3-GAL4* o el *332.3-GAL4*. El "driver" *Sgs3-GAL4* dirige la expresión principalmente a la parte distal de los lóbulos de las glándulas salivales. *Sgs3* codifica para la proteína "glue" (goma), que es secretada por las glándulas en respuesta a la hormona ecdisona (Zhimulev . El "driver" *332.3-GAL4* dirige la expresión a las glándulas salivales de manera homogénea desde larva de primer estadio y se desconoce su sitio preciso de inserción (Wodarz *et al.*, 1995). La expresión del *RNAi-tna^{TRiP}* con estos "drivers" se hizo 28°C como se indica en la sección 6.2. Con el "driver" *Sgs3-GAL4*, Los niveles de TnaA muestran una disminución moderada en las glándulas salivales de larvas de tercer instar (Figura 18B) mientras que con el "driver" *332.3-GAL4* los niveles de expresión de TnaA disminuyen considerablemente (Figura 18C).

Por ultimo, purificamos por afinidad al anticuerpo anti-TnaA_{XSPRING} (ver Materiales y Métodos 6.10) que reconoce a la banda de TnaA en extractos proteicos de larvas completas y de glándulas salivales (Figura S2). Con ayuda de este anticuerpo podremos realizar inmunotinciones de TnaA de cromosomas politénicos de larvas de tercer instar *Act5C-GAL4; RNAi-tna^{TRiP}* y *332.3-GAL4; RNAi-tna^{TRiP}* puesto que fueron las condiciones mas fuertes encontradas para disminuir los niveles de TnaA, como se plantea en las perspectivas.

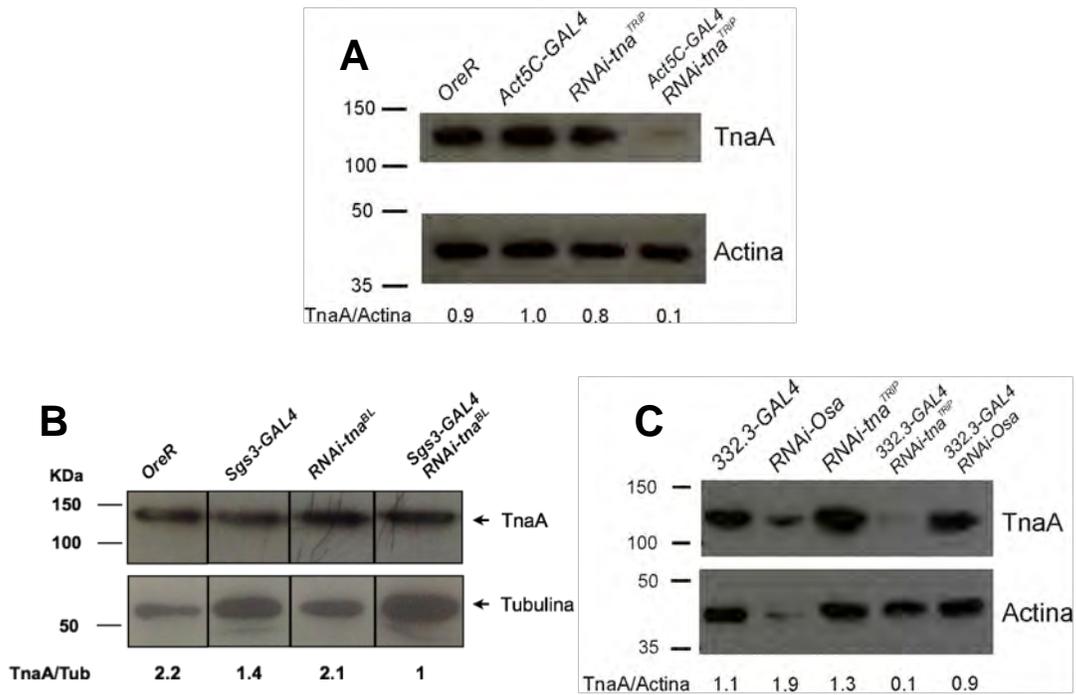


Figura 18. Disminución de TnaA en glándulas salivales de larvas de tercer instar que expresan el *RNAi-tna^{TRIP}* a 28°C. Análisis tipo Western de extractos de proteína total de glándulas salivales de larvas de tercer instar de los genotipos indicados en la parte superior. Se expresó al *RNAi-tna^{TRIP}* con tres “drivers” distintos, *Act5C-GAL4* (A), *Sgs3-GAL4* (B) y *332.3-GAL4* (C). En la parte más inferior se muestra la relación de la concentración de TnaA con respecto a la de beta-tubulina cuantificada por densitometría de imagen. Sólo las moscas que expresan al *RNAi-tna^{TRIP}* en las glándulas salivales presentan una disminución de los niveles de TnaA a comparación de los controles. Como control de carga se utilizaron actina o tubulina.

8. DISCUSIÓN

8.1 TnaA en la supervivencia de *D. melanogaster*.

La caracterización molecular de *tna* permitió proponer que la(s) proteína(s) codificadas por este *locus* podría(n) funcionar en la modificación postraduccional de modificadores de la cromatina y/o de activadores transcripcionales (Gutiérrez *et al.*, 2003). En trabajo previo del grupo se analizaron individuos con diferentes alelos mutantes de *tna*, cuyas lesiones incluyen mutaciones puntuales, inserción de transposones y deleciones de la región donde se encuentra *tna* (Gutiérrez *et al.*, 2003 y Monribo-Villanueva *et al.*, 2013). En estos trabajos, se encontró que los individuos con alelos mutantes de *tna* mueren por no tener las dosis o las versiones funcionales de *tna* en diferentes etapas del desarrollo; en tanto que una proporción menor que llega a etapas avanzadas de desarrollo no sobrevive más allá del estadio de pupa. La caracterización de TnaA producida por los diferentes alelos analizados (Monribo-Villanueva *et al.*, 2013 y Monribo-Villanueva y Vázquez, datos no publicados), mostró que ninguno de los alelos conocidos genera una clara falta de función de *tna*. Por lo que en este trabajo utilizamos dos diferentes RNAi para disminuir los niveles de TnaA. Cuando provocamos la disminución ubicua de TnaA, corroboramos que es esencial para la supervivencia, de manera similar a los individuos con bajas dosis de SUMO (Talamillo *et al.*, 2008). En contraste con los individuos con alelos mutantes de TnaA, una proporción de los individuos que expresan al *RNAi-tna*, alcanzan la etapa adulta pero mueren rápidamente. La muerte de estas moscas adultas puede deberse a los defectos acumulados a lo largo del desarrollo del individuo. Los individuos machos en la etapa de larva de tercer instar mostraron una mayor disminución de TnaA que las hembras, lo cual puede explicarse porque los machos se desarrollan más lentamente y por lo tanto, pueden acumular más RNAi (Ni *et al.*, 2008). Por esta razón, cuando disminuimos los niveles de TnaA con el *RNAi-tna*^{TRiP} no eclosionan machos adultos mientras que algunas las hembras adultas si lo hacen. La letalidad observada por la disminución de TnaA puede deberse a una pérdida de función severa de los genes *Hox* y es posible que estos individuos mueran debido a un efecto pleiotrópico.

8.2 TnaA en el desarrollo y la eversión de la cabeza

Algunas de las pupas con bajas dosis de TnaA mueren durante la etapa de eversión de la cabeza, algo que no se había reportado anteriormente. El defecto en la eversión de la cabeza puede deberse a (I) que los músculos abdominales no se contraen apropiadamente, (II) a que el mecanismo hormonal que controla este

evento no funciona apropiadamente o a (III) que la cabeza no está desarrollada correctamente. La última posibilidad es interesante, ya que podría haberse afectado la expresión de los genes *Hox labial*, *proboscipedia* o *Deformed* en al menos uno de los discos que dan origen a la cabeza: labial, clipeolabrum, protórax dorsal u ojo-antena.

8.3 TnaA y la vía de SUMOilación en la expresión de *Ubx*.

Con la expresión del *RNAi-tna^{TRiP}* de manera ubicua o en el disco del halterio hay transformaciones de halterio a ala. En el caso de la expresión dirigida al disco del halterio, los fenotipos son más fuertes que cuando la expresión es ubicua. Comúnmente, encontramos una sola queta larga y gruesa en la región anterior del halterio cerca del límite dorso-ventral. Este fenotipo es interesante porque el *RNAi-tna* se expresó en una región muy amplia del disco pero sólo se obtiene una queta ectópica que proviene de una única célula progenitora sensorial (SOP). Como se ha explicado en la Introducción, *Ubx* se expresa mayoritariamente en la región del “pouch” en el disco del halterio. Es probable que al disminuir los niveles de TnaA en este disco bajen los niveles de *Ubx* en una célula progenitora, lo cual resultaría en la diferenciación de esa célula hacia queta sensorial de ala. Asimismo, pudiera ser que a falta de TnaA, no se favorezca la SUMOilación de Scm, lo que provocaría la unión de esta proteína al PRE de *Ubx*, teniendo como efecto neto la represión de este gen y la aparición de la queta de ala.

TnaA interacciona físicamente con Osa (Monribot-Villanueva *et al.*, 2013) y con Brm (Monribot-Villanueva *et al.*, 2013 y Monribot y Vázquez, datos no publicados), por lo que TnaA podría promover la expresión de *Ubx* al favorecer la remodelación de la cromatina por el complejo BRM alrededor del promotor de *Ubx*, permitiendo el reclutamiento y ensamblaje de la maquinaria de transcripción. Esto no sucedería en los individuos con bajas dosis de TnaA

Una pregunta interesante es ¿por qué sólo aparece una queta si se están disminuyendo los niveles de TnaA en una región tan amplia del disco de ala? El mapa de destino del halterio nos permite predecir la región donde se encuentra dicha célula (Figura 19, región morada). La presencia de una única queta implica que la célula progenitora sensorial que da origen a esa queta ectópica es más susceptible a la disminución de los niveles de TnaA. Esta susceptibilidad podría deberse a la presencia de proteínas específicas que estén localizadas en esa región particular. Por ejemplo, se sabe que Dpp presenta un patrón de expresión a lo largo del disco, marcando el límite anteroposterior (Figura 19, región en rojo), y se sabe que Wingless se expresa en el límite dorsoventral (Figura 19, región en azul). El sitio donde convergen ambos patrones de expresión está muy cerca del

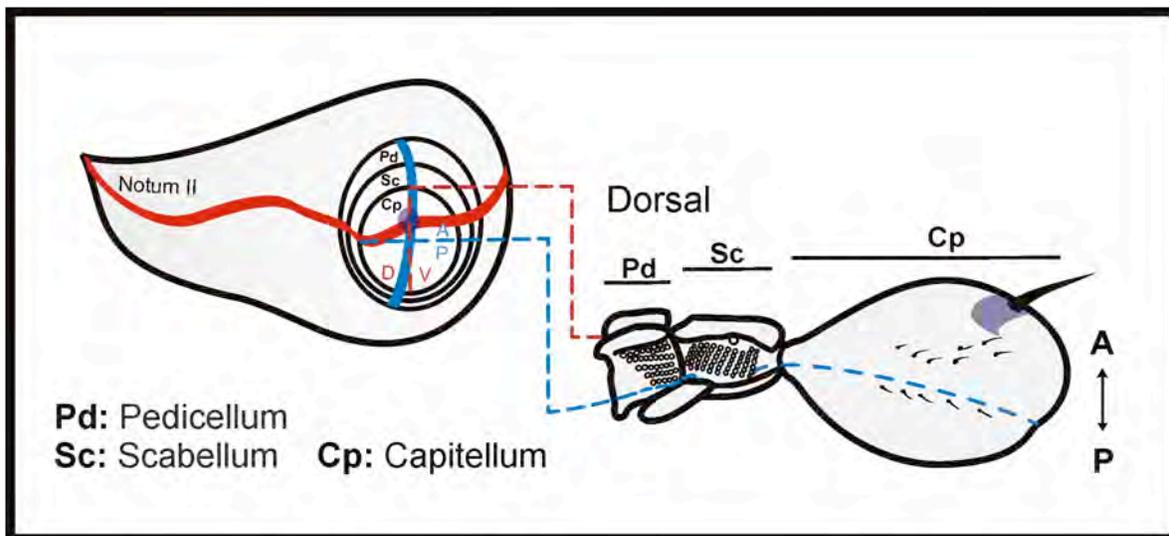


Figura 19. Posible localización de la célula con bajos niveles de Ubx. Se muestra el mapa de destino del halterio y la posible localización de la célula que da origen a la queta ectópica. Esta célula presenta bajos niveles de Ubx y se encuentra cerca de una región donde se expresa Dpp (rojo) y Wingless (azul).

área donde podría encontrarse dicha célula. Sin embargo, no sabemos con precisión la relación entre Dpp, Wg y TnaA, ni cómo podría influenciar la expresión de *Ubx*.

La localización de la queta es reproducible en nuestros experimentos y en la literatura no parece haber un fenotipo que posea una queta con la misma localización. Sin embargo se sabe que la falta de función de *Ubx* provoca la aparición de quetas ectópicas en la región anterior o algunas quetas en la base del capitelo (Slattery *et al.*, 2011). Para saber si realmente se está afectando la expresión de *Ubx* en el halterio, se pueden realizar inmunotinciones contra *Ubx* en discos de halterio con bajas dosis de TnaA. Realizar estas inmunotinciones para comprobar la disminución de *Ubx* es un reto, puesto que el fenotipo podría deberse a una única célula con bajos niveles de *Ubx*.

Existen evidencias que indican que TnaA es una E3 ligasa de SUMO y sabemos que existe interacción genética entre *tna* y genes que codifican para proteínas de la vía de SUMOilación (Monribot-Villanueva *et al.*, 2013). Las moscas con bajos niveles de SUMO y TnaA en el disco del halterio tienen una deformación del capitelo. Algunos individuos presentan un halterio con un capitelo muy pequeño y otras presentaban un halterio con protuberancias, las cuales semejan una duplicación del capitelo (Figuras 15 y 16). Este fenotipo es similar al observado previamente en moscas con bajas dosis de *Omb* (Optomotor blind). Se ha propuesto que *Omb* podría funcionar como un cofactor de *Ubx* para reprimir

genes involucrados en el crecimiento del capitelo (Simon y Guerrero, 2015). Por lo tanto, este aumento en la expresividad podría deberse a que se afectó la expresión o el funcionamiento de Ubx o algún cofactor importante para su funcionamiento. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que se hayan afectado otros procesos relacionados con SUMOilación que no estén relacionados con Ubx.

8.4 TnaA y la vía de SUMOilación en la supervivencia de las moscas adultas

En este trabajo mostramos que bajar la dosis de TnaA causa letalidad en adultos, por lo tanto, esperábamos que en animales que además tuvieran genes con mutaciones hipomorfas en proteínas de la vía de SUMOilación (en Ubc9 o en SUMO) se exacerbaría este fenotipo. Notoriamente encontramos que al combinar la disminución ubicua de TnaA con la falta de función de la vía de SUMOilación no se exagera sino que se rescata la letalidad causada por la baja dosis de TnaA (Tabla 2). Para explicar el rescate de la letalidad pueden plantearse distintos escenarios que no son excluyentes. Por ejemplo, podríamos haber afectado drásticamente la función de otras proteínas SUMOiladas que no son blancos de TnaA pero sí de SUMO, o podríamos haber afectado las pozas de alguna proteína blanco de SUMOilación de TnaA sin afectar drásticamente la función de otras proteínas SUMOiladas. Las condiciones de bajas dosis de SUMO más extremas (con el *RNAi-smt3*) resultaron 100% letales y no logramos rescatar esta letalidad extrema expresando el *RNAi-tna^{TRIP}*. En trabajos de otros grupos, se ha observado el rescate de fenotipos deletéreos al introducir alelos hipomorfos de los genes de la vía de SUMOilación. Por ejemplo, mutantes de la segregación cromosomal de la meiosis combinadas con mutantes de *lwr* han rescatado los defectos en la segregación (Apionishev *et al.*, 2001).

Al expresar los *RNAi-tna* encontramos fenotipos similares a los observados en mutantes heteroalélicas de *tna* como transformaciones homeóticas de halterio en ala y letalidad en diversas etapas del ciclo de la mosca, lo que reitera la importancia de la función de TnaA durante el desarrollo. A diferencia de las moscas con alelos mutantes de *tna* este sistema nos permitió bajar los niveles de TnaA únicamente en los discos de halterio y de ala, lo cual nos permitió observar fenotipos que sugieren que TnaA regula de una manera muy fina la expresión de *Ubx*. Las condiciones experimentales encontradas en este trabajo nos permitirán estudiar a nivel celular y molecular como es que TnaA regula la expresión de *Ubx* y probablemente de otros genes *Hox* que requieren de TnaA para el mantenimiento de su expresión.

9. CONCLUSIONES

GENERALES

1. En este trabajo, se corroboró que TnaA es esencial en el desarrollo de *D. melanogaster* como indicaban estudios genéticos previos, ya que se logró disminuir parcialmente su expresión con dos RNAi dirigidos contra un segmento común de los mRNAs de TnaA.
2. En los estudios genéticos iniciales de *tna* (Gutiérrez *et al.*, 2003) se determinó que es un gen esencial y que animales que contienen el alelo *tna*¹ (dominante negativo) presentan entre otras alteraciones, una transformación homeótica de halterio a ala. Los individuos con falta de función de TnaA por la expresión del RNAi generados en el presente trabajo, corroboran que TnaA es esencial para la supervivencia y que se requiere para la expresión apropiada de los genes *Hox*.

PARTICULARES

- La disminución de TnaA con el *RNAi-tna*^V provoca letalidad de hembras y machos, la cual aumenta conforme aumenta la temperatura. Además, la expresión del *RNAi-tna*^{TRiP} provoca letalidad total en machos y en hembras aumenta con la temperatura.
- La disminución de TnaA lograda con la expresión del *RNAi-tna*^{TRiP} en el disco del halterio provoca transformaciones homeóticas de halterio a ala, particularmente en la parte anterior en el límite dorso-ventral del halterio.
- La disminución de TnaA y de SUMO en el disco del halterio y del ala provocan un aumento en la expresividad del fenotipo de transformación homeótica observado en animales con bajas dosis de TnaA.
- Las pupas con expresión ubicua del *RNAi-tna*^{TRiP} mueren como pupas tempranas o poco antes de eclosionar (pupas tardías). Algunas de ellas presentan defectos en el desarrollo de la cabeza y mueren durante el proceso de eversión de la misma (pupas tempranas).
- La disminución ubicua de TnaA con el *RNAi-tna*^{TRiP} en individuos con alelos hipomorfos en genes de la vía de SUMOilación rescatan la letalidad observada en las moscas que sólo expresan al *RNAi-tna*^{TRiP}

10. PERSPECTIVAS

- Realizar inmunotinciones para Osa y TnaA en cromosomas politénicos con las condiciones experimentales establecidas por el análisis tipo Western.
- Utilizar las condiciones de RNAi encontradas en este trabajo para estudiar el efecto de la falta de función de TnaA en el mantenimiento de la expresión de otros genes *Hox* como *Antp*, *Scr* y *AbdB*.

REFERENCIAS

- Akam, M.** (1987). The molecular basis for metameric pattern in the *Drosophila* embryo. *Development*. **101**: 1-22.
- Akam, M. y Martinez-Arias, A.** (1985). The distribution of Ultrabithorax transcripts in *Drosophila* embryos. *EMBO J.* **4**: 1689-1700.
- Alic, N., Hoddinott, M. P., Foley, A., Slack, C., Piper, M. D. W. y Partridge, L.** (2012). Detrimental effects of RNAi: a cautionary note on its use in *Drosophila* ageing studies. *PLoS One*. **7**: e45367.
- Apionishev, S., Malhotra, D., Raghavachari, S., Tanda, S. y Rasooly, R. S.** (2001) The *Drosophila* Ubc9 homologue *lesswright* mediates the disjunction of homologues in meiosis I. *Genes Cells*. **6**: 215–224
- Armstrong, J. A., Papoulas, O., Daubresse, G., Sperling, A. S., Lis, J. T., Scott M. P. y Tamkun, J. W.** (2002). The *Drosophila* BRM complex facilitates global transcription by RNA polymerase II. *EMBO J.* **21**: 5245-5254.
- Ashburner, M., Golic, K. G., y Hawley, R. S.** (2005). *Drosophila: A Laboratory Handbook*. (2nd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp. 162–164.
- Bainbridge, S. P. y Bownes, M.** (1981). Staging the metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **66**: 57-80
- Bhaskar, V., Valentine, S. A., y Courey, A. J.** (2000). A functional interaction between Dorsal and components of the Smt3 conjugation machinery. *J. Biol. Chem.* **275**: 4033–4040.
- Casares, F., Bender, W., Merriam, J. and Sanchez-Herrero, E.** (1997). Interactions of *Drosophila* *Ultrabithorax* regulatory regions with native and foreign promoters. *Genetics*. **145**: 123-137
- Chalkley, G. E., Moshkin, Y. M., Bezstarosti, K., Blastyak, A., Gyurkovics, H., Demmers, J. A. y Verrijzer, C. P.** (2008). The transcriptional coactivator SAYP is a trithorax group signature subunit of the PBAP chromatin remodeling complex. *Mol. Cell. Biol.* **28**: 2920-2929.
- Collins, R. T. y Treisman, J. E.** (2000). Osa-containing Brahma chromatin remodeling complexes are required for the repression of Wingless target genes. *Genes Dev.* **14**: 3140–3152.
- Da Silva-Ferrada, E., Lopitz-Otsoa, F., Lang, V., Rodríguez, M. S. y Matthiesen, R.** (2012). Strategies to identify recognition signals and targets of SUMOylation. *Biochem. Res. Int.* **2012**: 875148.
- Deuring, R., Fanti, L., Armstrong, J. A., Sarte, M., Papoulas, O., Prestel, M., Daubresse, G., Verardo, M., Moseley, S. L., Berloco, M., Tsukiyama, T., Wu, C., Pimpinelli, S. y Tamkun, J. W.** (2000). The ISWI chromatin-

remodeling protein is required for gene expression and the maintenance of higher order chromatin structure *in vivo*. *Mol. Cell* **5**: 355–365.

- Dhalluin, C., Carlson, J. E., Zeng, I., He, C., Aggarwal, A. K. y Zhou, M. M.** (1999) Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* **399**: 491-496.
- Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, K. C., Barinova, Y., Fellner, M., y Dickson, B. J.** (2007). A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature*. **448**: 151–156.
- Flaus, A. y Owen-Hughes, T.** (2004). Mechanisms for ATP-dependent chromatin remodelling: Farewell to the tuna-can octamer?. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **14**: 165-173.
- Fortier, E., y Belote, J. M.** (2000). Temperature-dependent gene silencing by an expressed inverted repeat in *Drosophila*. *Genesis*. **26**: 240–244.
- Frangioni, J. V. y Neel, B. G.** (1993). Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins. *Anal Biochem.* **210**:179-187
- Gareau, J. R. y Lima, C. D.** (2010). The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**: 861-871.
- González-Gaitán, M. A., Micol, J. L., y Garcia-Bellido, A.** (1990). Developmental genetic analysis of *Contrabithorax* mutations in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. **126**: 139-155
- Gutiérrez, L., Zurita, M., Kennison, J. A. y Vázquez, M.** (2003) The *Drosophila* trithorax group gene *tonalli* (*tna*) interacts genetically with the Brahma remodeling complex and encodes an SP-RING finger protein. *Development*. **130**: 343-354.
- Haerry, T. E., Khalsa, O., Connor, M. B. O., y Wharton, K. A.** (1998). Synergistic signaling by two BMP ligands through the SAX and TKV receptors controls wing growth and patterning in *Drosophila*. *Development*. **125**: 3977–3987.
- Hargreaves, D. C. y Crabtree, G. R.** (2011). ATP-dependent chromatin remodeling: genetics, genomics and mechanisms. *Cell. Res.* **21**: 396-420.
- Hietakangas, V., Anckar, J., Blomster, H. A., Fujimoto, M., Palvimo, J. J., Nakai, A. y Sistonen, L.** (2006). PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* **103**: 45–50.
- Hogness, D. S., Lipshitz, H. D., Beachy, P. A., Peattie, D. A., Saint, R. B., Goldschmidt-Clermont, M., Harte, P. J., Gavis, E. R. y Helfand, S. L.** (1985). Regulation and products of the *Ubx* domain of the bithorax complex. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **50**: 181-194.

- Huang, H.W., Tsoi, S.C., Sun, Y.H. y Li, S.S.** (1998). Identification and characterization of the *smt3* cDNA and gene encoding ubiquitin-like protein from *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Molec. Biol. Int.* **46**: 775--785.
- Huang H., Du G., Chen H., Liang X., Li C., Zhu N., Xue L., Ma J. y Jiao R.** (2011). *Drosophila* Smt3 negatively regulates JNK signaling through sequestering Hipk in the nucleus.. *Development.* **138**: 2477–2485.
- Ito, K., Awano, W., Suzuki, K., Hiromi, Y., y Yamamoto, D.** (1997). The *Drosophila* mushroom body is a quadruple structure of clonal units each of which contains a virtually identical set of neurones and glial cells. *Development.* **771**: 761–771.
- Ursitti, J. A., Mozdzanowski, J. y Speicher. D. W.** (1995). Electroblothing from polyacrylamide gels. In: Coligan JE, Dunn B, Ploegh HL, Speicher DW, Wingfield PT, editors. *Current Protocols in Protein Science*. Vol. 1. New York: John Wiley & Sons. pp. 10.7.1–10.7.14.
- Kang, H., McElroy, K. A., Jung, Y. L., Alekseyenko, A. A., Zee, B. M., Park, P. J., Kuroda, M. I.** (2015). Sex comb on midleg (Scm) is a functional link between PcG-repressive complexes in *Drosophila*. *Genes Dev.* **29**:1136-1150.
- Kang, X., Qi, Y., Zuo, Y., Wang, Q. , Zou, Y., Schwartz, R. J., Cheng J. y Yeh. E. T.** (2010). SUMO-specific protease 2 is essential for suppression of Polycomb group protein-mediated gene silencing during embryonic development. *Mol. Cell.* **38**: 191-201.
- Kennison, J. A. y Tamkun, J. W.** (1988). Dosage-dependent modifiers of *Polycomb* and *Antennapedia* mutations in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* **85**: 8136–8140.
- Kennison, J. A.** (2004). Introduction to Trx-G and Pc-G genes. *Meth. in Enzymol.* **377**: 61-70.
- Lomelí, H. y Vázquez, M.** (2011). Emerging roles of the SUMO pathway in development. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**: 4045–4064.
- Maeda, R. K. y Karch, F.** (2010). *cis*-regulation in the *Drosophila* bithorax complex. *Adv. Exp. Med. Biol.* **689**: 17-40.
- Matic, I., Schimmel, J., Hendriks, I. A., van Santen, M. A., van de Rijke, F., van Dam, H., Gnad, F., Mann, M. y Vertegaal, A. C. O.** (2010). Site-specific identification of SUMO-2 targets in cells reveals an inverted SUMOylation motif and a hydrophobic cluster SUMOylation motif. *Mol. Cell* **39**: 641–652.
- Meluh, P. B. y Koshland, D.** (1995). Evidence that the *MIF2* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a centromere protein with homology to the mammalian centromere protein. *Mol. Biol Cell.* **6**: 793–807.

- Monribot-Villanueva, J. L., Juárez-Uribe, R. A., Palomera-Sánchez, Z., Gutiérrez-Aguilar, L., Zurita, M., Kennison, J. A. y Vázquez, M.** (2013). TnaA, an SP-RING protein, interacts with Osa, a subunit of the chromatin remodeling complex BRAHMA and with the SUMOylation pathway in *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE* **4**: e62251.
- Morrison, A. J. y Shen, X.** (2009). Chromatin remodelling beyond transcription: the INO80 and SWR1 complexes. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **10**: 373–384.
- Moshkin, Y. M., Mohrmann, L., Van Ijcken, W. F. J. y Verrijzer, C. P.** (2007). Functional differentiation of SWI/SNF remodelers in transcription and cell cycle control. *Mol. Cell. Biol.* **27**: 651.
- Müller, J. y Kassis, J. A.** (2006). Polycomb Response Elements and targeting of Polycomb group proteins in *Drosophila*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **16**: 476–484.
- Müller, J. y Verrijzer, P.** (2009). Biochemical mechanisms of gene regulation by Polycomb group protein complexes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **19**: 150–158.
- Naito, Y., Yamada, T., Matsumiya, T., Ui-Tei, K., Saigo, K. y Morishita, S.** (2005). dsCheck: highly sensitive off-target search software for double-stranded RNA-mediated RNA interference. *Nucl. Acids Res.* **33**: 589–591
- Ni, J., Markstein, M., Binari, R., Pfeiffer, B. y Liu, L.** (2008). Vector and parameters for targeted transgenic RNA interference in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Methods.* **5**: 49–51.
- Perrimon, N., Ni, J.-Q. y Perkins, L.** (2010). *In vivo* RNAi: today and tomorrow. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**: a003640.
- Posnien, N. y Bucher, G.** (2010). Formation of the insect head involves lateral contribution of the intercalary segment, which depends on Tc-labial function. *Dev Biol.* **338**:107-116
- Riddiford, L. M., Truman, J. W., Mirth, C. K. y Shen, Y.** (2010). A role for juvenile hormone in the prepupal development of *Drosophila melanogaster*. *Development.***137**: 1117–1126.
- Rodríguez, M. S., Dargemont, C. y Hay, R. T.** (2001). SUMO-1 conjugation *in vivo* requires both a consensus modification motif and nuclear targeting. *J. Biol. Chem.* **276**: 12654-12659.
- Röper, K., Mao, Y. y Brown, N. H.** (2005). Contribution of sequence variation in *Drosophila* actins to their incorporation into actin-based structures *in vivo*. *J. Cell Sci.* **118**: 3937–3948.
- Rorth, P.** (1996). A modular misexpression screen in *Drosophila* detecting tissue-specific phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **93**: 12418-12422.
- Schnorr, J. D., Holdcraft, R., Chevalier, B. y Berg, C. A.** (2001) *Ras1* interacts with multiple new signaling and cytoskeletal loci in *Drosophila* eggshell patterning and morphogenesis. *Genetics* **159**: 609–622.

- Schuettengruber, B., Martinez, A.-M., Iovino, N. y Cavalli, G.** (2011). Trithorax group proteins: switching genes on and keeping them active. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**: 799–814.
- Simon, E. y Guerrero, I.** (2015). The transcription factor Optomotor-blind antagonizes *Drosophila* haltere growth by repressing Decapentaplegic and Hedgehog targets. *PLoS ONE.* **10**: e0121239
- Slattery, M., Ma, L., Negré, N., White, K. P. y Mann, S. R.** (2011). Genome-wide tissue specific occupancy of the Hox protein Ultrabithorax and Hox cofactor Homothorax in *Drosophila*. *PLoS ONE.* **6**: e14686
- Smith, M., Mallin, D. R., Simon, J. A. y Courey, A.** (2011). Small ubiquitin-like modifier (SUMO) conjugation impedes transcriptional silencing by the Polycomb group repressor Sex Comb on Midleg. *J. Biol. Chem.* **286**: 11391-11400.
- Struhl, G.** (1982). Genes controlling segmental specification in the *Drosophila* thorax. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* **79**: 7380-7384.
- St. Pierre, S. E., Ponting, L., Stefancsik, R., McQuilton, P. y the FlyBase Consortium.** (2014). FlyBase 102 - advanced approaches to interrogating FlyBase. *Nucleic Acids Res.* **42**: 780-788
- Sun X., Huang L., Van Doren M. R., Tanda S.** (2003) Isolation of amorphic alleles of the *lesswright* gene by P element-mediated male recombination in *Drosophila melanogaster*. *Drosophila Information Service.* **86**: 79–83.
- Talamillo, A., Sánchez, J., y Barrio, R.** (2008a). Functional analysis of the SUMOylation pathway in *Drosophila*. *Biochem. Soc. Trans.* **36**: 868–873.
- Talamillo, A., Sánchez, J., Cantera, R., Pérez, C., Martín, D., Caminero, E. y Barrio, R.** (2008b). Smt3 is required for *Drosophila melanogaster* metamorphosis. *Development.* **135**: 1659–1668.
- Van der Meer, J. M. y Ouweneel, W. J.** (1974). Differentiation capacities of the dorsal metathoracic (Haltere) disc of *Drosophila melanogaster*. *Wilhelm Roux' Archiv.* **174**: 361-373.
- Vázquez, M., Moore, L. y Kennison, J. A.** (1999). The trithorax group gene *osa* encodes an ARID-domain protein that genetically interacts with the Brahma chromatin-remodeling factor to regulate transcription. *Development.* **126**: 733-742.
- Wodarz, A., Hinz, U., Engelbert, M., Knust, E.** (1995). Expression of *crumbs* confers apical character on plasma membrane domains of ectodermal epithelia of *Drosophila*. *Cell* **82**: 67-76.
- Yamashita, D., Yamaguchi, T., Shimizu, M., Nakata, N., Hirose, F. y Osumi, T.** (2004). The transactivating function of peroxisome proliferator-activated

receptor gamma is negatively regulated by SUMO conjugation in the amino-terminal domain. *Genes Cells* **9**: 1017–1029.

Yang, S.H., Galanis, A., Witty, J. y Sharrocks, A. D. (2006). An extended consensus motif enhances the specificity of substrate modification by SUMO. *EMBO J.* **25**: 5083–5093.

Zhimulev, I.F., Belyaeva, E.S., Makunin, I.V., Pirrotta, V., Semeshin, V.F., Alekseyenko, A.A., Belyakin, S.N., Volkova, E.I., Koryakov, D.E., Andreyeva, E.N., Demakova, O.V., Kotlikova, I.V., Kolesnikova, T.D., Boldyreva, L.V., Nanayev, R.A. (2003). Intercalary heterochromatin in *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes and the problem of genetic silencing. *Genetica.* **117**: 259-270.

ANEXOS

1. Secuencias blanco de los *RNAi-tna*

AGGCGGGTGGAGCAGGAAATGGTTACGGACGCAGTGGACCCATGGGCGTC
 GGCAATGGAGGCTACGGCCGTATGTCGGCGGGCAATGGCATGGGCCCAGC
 CGGAGGACCAGTGATGGGACCTATGGGTCCCGGTGGCATGACCGCCGGGG
 GAATGGGTCCCGGACCAGGCTGCATGAGCCAGCAGCGCTTCATGCCCAA
 GGATCCGGTGGCGGCATGCCCGGAGTGGGCTATGGTGGAGTCGGAGGAGC
 CGCTTCCCATCAGGGTCAGTTCTATCCGGGCAGTGGCCAAAGTGCTGGAAT
 GCAGCAGGCAGGTGGCATGTGCCCGGGCGGGTCCGGGCGCCGTCGCCACCA
 CCGGCAATCCCTACCAGAATCAAGGTTTCCAGCAAACTATCAGCACAGTC
 CAGTTCCTGGCAATCCCACGCCACCGCTGACGCCCGCCTGCAGTGTGCCCT
 ATGTTAGCCCAATCCGGATATCAAGCCACCTATG

Se muestra un segmento del mRNA de *tna* de 488 pb (en dirección 5' a 3') desde la base 1760 hasta la base 2248. En amarillo se muestra la secuencia blanco del *RNAi-tna^{TRiP}* de 460 pb (desde la base 1775 a la 2235) y subrayado con letras rojas se muestra la secuencia blanco del *RNAi-tna^V* de 407 pb (desde la base 1763 a la 2170). Ambos RNAi comparten 395 pb en su secuencia blanco (desde la base 1775 a la 2170).

2. Los *RNAi-tna* tienen una alta probabilidad de promover únicamente la disminución de los mRNAs de *tna*.

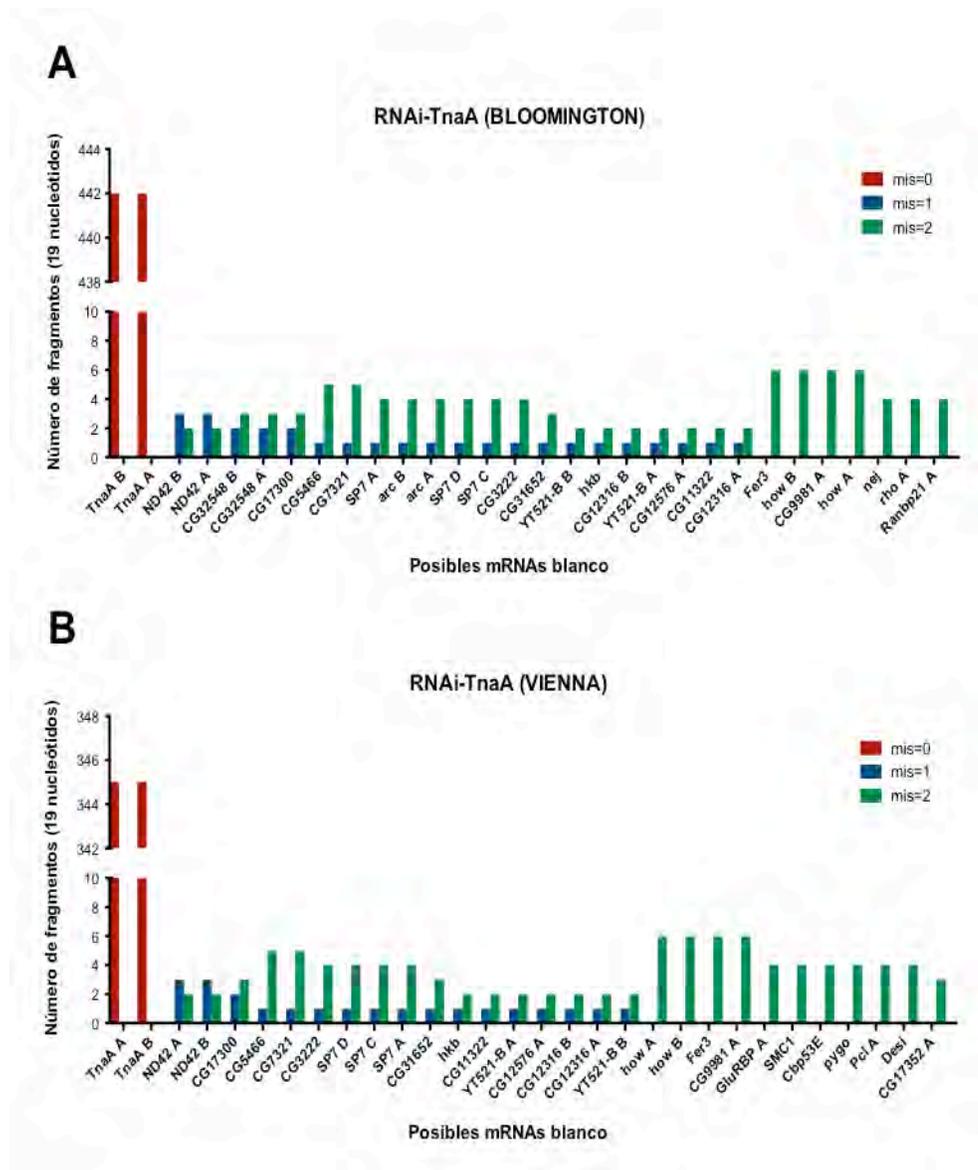


Figura S1. Los RNAi-tna^{TRiP} y RNAi-tna^{VIII} complementan específicamente secuencias del mRNA de *tna*. Se utilizó el programa dsCHECK (Naito *et al.*, 2005) para verificar que los 19-meros producidos a partir del dsRNA complementarían específicamente al mRNA de *tna*. Este programa realiza un alineamiento entre los 21-meros y los mRNAs de *Drosophila* aún cuando los 21-meros tienen 1 ó 2 “mismatches”. Tanto el *RNAi-tna^{TRiP}* (A) como el *RNAi-tna^{VIII}* (B) complementan específicamente los diferentes mRNAs existente (Gutiérrez *et al.*, 2003) y predichos por Flybase (St. Pierre *et al.*, 2014) para las isoformas de TnaA (barras rojas) y pocos de los 21-meros con “mismatches” podrían disminuir la expresión de otros genes (barras verdes y azules).

3. El anticuerpo Anti-TnaA_{XSPRING} reconoce a TnaA en extractos proteicos de larvas completas y de glándulas salivales.

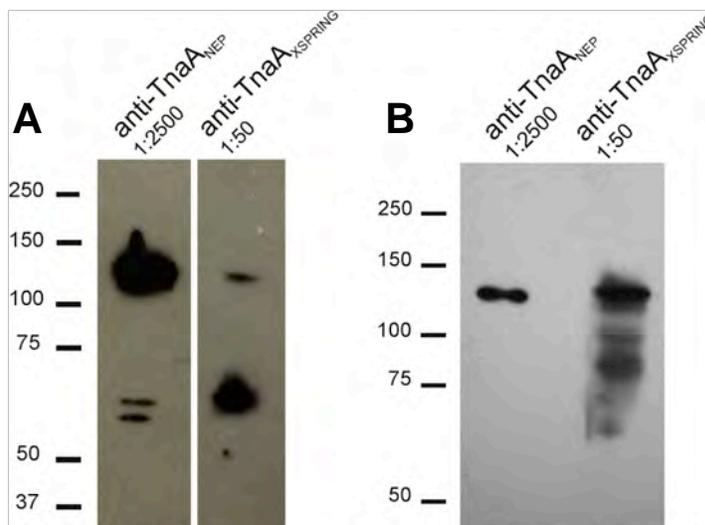


Figura S2. El anticuerpo anti-TnaA_{XSPRING} purificado reconoce a TnaA. Se muestran los ensayos tipo Western de extractos de larvas completas (A) y de 5 pares de glándulas salivales por carril (B). Como control positivo se usa el anticuerpo Anti-TnaA_{NEP} usado previamente. Nótese que en el extracto de larvas completas (A), se observa una banda entre 50-75 kDa que también es reconocida por el Anti-TnaA_{NEP}. Esta banda no aparece en el ensayo tipo Western de glándulas salivales y el barrido observado puede deberse a la degradación del extracto de ese carril.