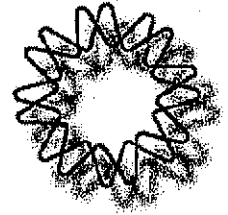


00562

3



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CARACTERIZACION DEL GENE *Dmp62* DEL COMPLEJO BASAL DE
TRANSCRIPCION TFIID EN *Drosophila melanogaster*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

BIOL. JUAN CASTRO DORANTES

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuernavaca, Mor.

OCTUBRE 2002



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.

Este trabajo se desarrolló en el laboratorio del Dr. Mario Zurita Ortega, en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

*Esta tesis esta dedicada a:
Juan y Berna, mis padres.
Por todo el apoyo recibido.*

*A mis hermanos:
Lucila, Adriana, Salvador, Liz, Mauricio y Karina*

A Natacha...

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Mario Zurita Ortega por haberme permitido estar en su laboratorio.

A mi comité tutorial: Dr. Mario Rocha y al Dr. Alejandro Alagón.

A la Dra. Carmen Gómez, Dra. Brenda Valderrama, Dr. Lorenzo Segovia y la Dra. Diana Escalante por sus valiosos comentarios para el mejoramiento de esta tesis.

A Vicky Barajas por ese apoyo técnico en el lab.

A el grupo del trago, Martín, Aristides, Gabriel y Rivelino, que en el camino vamos...

A Rodrigo, Louis, Guatus, David, Shark, Leoncio, la Doñita, Conchita y Jesús por esos ratos tan agradables durante todo este tiempo.

A la Ultra: Mariana, Jimenita, Selene, Rick por los ratos agradables y por ese apoyo incondicional.

A los Sideroforos, por las patadas y raspones que nos llevamos.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
REPARACION POR ESCIÓION DE NUCLEÓTIDOS (REN)	2
MECANISMO DE NER EN PROCARIOTES	4
MECANISMO DE REN EN EUCARIOTES	4
TRANSCRIPCION DE LOS GENES POR LA RNA POLIMERASA II	8
LA PROTEINA p62 DEL COMPLEJO TFIIF	10
OBJETIVOS	12
METERIAL Y METODOS	13
RESULTADOS	19
BUSQUEDA DE ORTOLOGOS DE Dmp62	21
BUSQUEDA DE MOTIVOS EN LOS HOMOLOGOS DE p62	24
SENSIBILIDAD AL DAÑO POR LUZ ULTRAVIOLETA	26
INTERACCION GENETICA ENTRE <i>Dmp62</i> y <i>haywire</i>	27
CARACTERIZACION MOLECULAR DE Dmp62	30
DETECCION DE LA EXPRESION DE Dmp62 EN ADULTOS	33
DISCUSION	36
CONCLUSIONES	40
PERSPECTIVAS	41
REFERENCIAS	42
ANEXO (ARTICULO)	47

RESUMEN

El complejo basal de transcripción TFIIDH está conformado por 9 subunidades conservadas a lo largo de la escala evolutiva. La caracterización genética y bioquímica en levadura y humanos, ha mostrado que TFIIDH participa en la transcripción de los genes mediada por la RNA polimerasa II, en la reparación de excisión de nucleótidos (REN) y en el control del ciclo celular. En humanos se han descrito síndromes asociados con mutaciones en varios de estos genes (Síndrome de Cockayne, Ticosidistrofia y Xeroderma Pigmentosum). En *Drosophila melanogaster*, se han caracterizado únicamente 2 subunidades: *haywire* (XPB) y *DmRad3*, del resto de las subunidades del complejo se desconoce su función. Este trabajo presenta la caracterización del gene *Dmp62* de *D. melanogaster*. El gene *Dmp62* está organizado por 5 exones y 4 intrones. Este gene presenta una mayor homología con los metazoarios superiores a nivel de proteína y DNA. Al compararse las proteínas ortólogas de p62 con el programa MEME, se encontraron 6 motivos, estos motivos podrían reflejar interacciones proteína-proteína o de una regulación postraduccional. La expresión del RNA mensajero se observó a lo largo de todo el desarrollo, con una mayor acumulación en los embriones tardíos y en los machos. *Dmp62* presenta dos isoformas, una isoforma no fosforilada y otra fosforilada en serinas y tirosinas. Ambas isoformas se encuentran en la fase embrionaria, pero la isoforma no fosforilada es la más abundante. En las etapas posteriores del desarrollo únicamente se detectó la isoforma fosforilada. La mutante heterociga de *Dmp62* es sensible a luz ultravioleta, esto sugiere que participa en el mecanismo de reparación tipo REN. La expresión del gene *lacZ* de un "enhancer trap" insertado en el gene *Dmp62*, se detectó en dos regiones discretas durante la embriogénesis temprana, una en la parte anterior y otra en la posterior. Conforme avanzó la embriogénesis desapareció la expresión en la región posterior y se mantuvo en la región posterior; en la embriogénesis tardía la expresión se detectó en todo el embrión. En los machos adultos la expresión de este "enhancer trap" se detectó en los intestinos, testículos y células pericardiales; en las hembras adultas la expresión fue en intestinos, células pericardiales y útero. *Dmp62* es de los pocos genes reportados que se expresan en las células pericardiales y se desconoce el papel que tenga en los testículos y en las células pericardiales.

INTRODUCCION

El DNA es la molécula que almacena la información genética en los organismos. Muchos agentes físicos y químicos pueden alterar su estructura y comprometer su función biológica. Por ejemplo, la temperatura induce la desaminación de las bases por una hidrólisis glicolítica; la luz ultravioleta produce dímeros de ciclobutano de pirimidina (CPD's) y el fotoproducto 6-4 (6-4 PP). La radiación ionizante provoca la apertura del anillo aromático de las bases, su fragmentación, así como también la ruptura de una y/o dos hebras. Los agentes químicos modifican el DNA de una manera muy amplia, puede darse por especies reactivas de oxígeno generadas a partir del metabolismo celular o por diversos electrófilos, que incluyen metales, agentes alquilantes e hidrocarburos policíclicos aromáticos (Sancar y Sancar, 1988; Evans, 1997).

Para toda esa variedad de alteraciones en el DNA, los organismos han desarrollado un gran número de mecanismos de reparación. Estos mecanismos de reparación del DNA pueden ser clasificados de manera global en dos grupos: a) aquellos que identifican el daño y restablecen su estructura al revertir la alteración; b) aquellos que identifican la alteración, la escinden y restablecen su estructura mediante la resíntesis de la región escindida (Dusenbery y Smith, 1996).

Reparación por escisión de nucleótidos, REN.

La reparación por escisión de nucleótidos (REN) es uno de los mecanismos mejor estudiados tanto *in vivo* como *in vitro*. Una de las características principales de NER es reconocer las lesiones que perturban la estructura de la doble hélice de DNA, como lo son CPD, 6-4 PP, agentes aductores, uniones inter e intracadena (Buschta-Hedayat *et al*, 1999). El mecanismo de NER se encuentra conservado a lo largo de la escala evolutiva, ya que se presenta en arqueas, bacterias y eucariotes, aunque entre sus genes no hay una clara homología (Ögrüç *et al*, 1998). En los procariotes participan aproximadamente 10 genes, en los eucariotes son aproximadamente 30 genes (Tabla 1), mientras que en las arqueas se desconoce el número de genes. (Franklin *et al*, 1985; de Laat *et al* 1999; Batty y Wood, 2000).

Mutaciones en cualquiera de estos genes tienen efectos adversos para el organismo. Por ejemplo, en *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* hay una mayor tasa de mutación e incremento en la transposición (Lee *et al*, 2000), disminución en la tasa transcripcional y una mayor sensibilidad a la luz ultravioleta. En el *Homo sapiens* las mutantes en los genes de NER

están asociadas con 3 síndromes: Xeroderma Pigmentosum (XP), Cockayne (CS) y Tricotilostrofia (TTD). En pacientes con XP hay una alta predisposición a cáncer de piel; individuos con CS padecen de enanismo, retraso mental y pérdida del tejido adiposo; mientras que pacientes con TTD tienen el pelo quebradizo, retraso mental e ictiosis (Lehmann, 1995; Cordonnier *et al*, 1999; Masutani *et al*, 1999).

El mecanismo de NER tiene dos características generales; primero: hay dos cortes (nicks) sobre la hebra de DNA que contiene el daño y es catalizada por dos endonucleasas, cada una actúa en los extremos del daño; segundo: las incisiones se localizan a distancias precisas de la base dañada. La incisión hacia el extremo 3' está conservada en los tres reinos y se encuentra aproximadamente a 3 bases del sitio con el daño. Sin embargo, la distancia es variable en la incisión hacia el extremo 5', en *E. coli* es de ~7 bases, en *S. cerevisiae* y en *Homo sapiens* de ~22 bases; mientras que en *Methanobacterium thermoautotrophicum* es de ~6 nucleótidos (Ögrünç *et al*, 1998, de Laat *et al*, 1999)

Tabla 1. Proteínas que participan en el mecanismo de NER en los eucariotes y bacterias.

Eucariotes	Bacterias
XPC-hHR23B	UvrA
XPA	UvrB
XPG	UvrC
CSA	UvrD
CSB	TRC
Complejo RPA	DNA pol ε
Complejo TFIIH	
ERCC1-XPF	
Complejo RCF	
Factor 2 de liberación	
DNA Pol ε	

Mecanismo de REN en procariones.

En *E. coli* este mecanismo se ha estudiado finamente. Un complejo trimérico de proteínas, consistente de dos moléculas de UvrA y una molécula de UvrB (Complejo UvrA₂B₁), se une al DNA con el daño. La formación de este complejo UvrA₂B₁-DNA esta acompañada por cambios conformacionales tanto en el DNA como en la proteína UvrB. Se cree que estos cambios promueven la disociación de UvrA y permiten una mayor afinidad de UvrB por el DNA. La formación del complejo UvrB-DNA facilita el pegado de la proteína UvrC, que tiene como resultado otros cambios conformacionales. Por último, UvrB produce la incisión del DNA en el sitio 3' con respecto a la base dañada y permite la acción de UvrC en el sitio 5'. El fragmento de DNA se remueve por la acción de la Helicasa II (UvrD), para ello se une en la incisión en el extremo 5' y tiene un movimiento con dirección 3' → 5' sobre la hebra intacta. Por último, la DNA polimerasa ϵ sintetiza el fragmento con dirección 5' → 3' (Sancar y Sancar, 1988; Friedberg, 1996).

Mecanismo de REN en Eucariotes.

En los eucariotes, REN es un mecanismo más complejo en el cual participan un número mayor de proteínas. Se han propuesto dos modelos, uno encargado de reparar el genoma de manera general, denominado REN de Genoma Global (GG-REN), y otro que está acoplado a la transcripción por la RNA polimerasa II, llamado REN Acoplado a la Transcripción (TC-REN) (figura 1).

Censo del daño en GG-NER:

El reconocimiento inicial al daño por GG-NER es llevado a cabo por un complejo heterodimérico, conformado por el complejo XPC y hHR23B (Evans *et al*, 1997). La afinidad de XPC-hHR23B por un DNA de hebra sencilla o de doble hebra es la misma, pero en presencia de un DNA irradiado con luz UV se incrementa su afinidad *in vitro*. El complejo XPC-hHR23B es esencial para la doble incisión en el DNA, en la apertura de las hebras de DNA (complejo abierto de reparación) y en el reclutamiento del resto de la maquinaria de reparación (Evans *et al*, 1997B)

Censo del daño por TC-NER:

Hanawalt y sus colegas al estudiar la remoción de CPD en células tipo CHO (Chinese Hamster Ovary) encontraron en el gene *DHRF* activo transcripcionalmente, los CPD's se

removían 5 veces más rápido que en el resto del genoma. A este mecanismo se le denominó reparación acoplada a la transcripción (Friedberg, 1996).

La reparación tipo TC-NER inicia cuando la RNA polimerasa II se detiene en un sitio donde existe un daño en la hebra de DNA templado. Posteriormente, esta anomalía es detectada por las proteínas CSA-CSB, que reclutan al complejo basal de transcripción TFIID (Tu *et al*, 1998; Henning *et al*, 1995; Tantin, 1998; Tantin D. *et al*, 1997). La liberación de la RNA pol II es catalizada por el factor 2 de liberación (Selby y Sancar, 1996; Hara *et al*, 1999).

Formación del complejo abierto de reparación:

Una vez que se detectó el daño por XPC-HHR23B ó CSA-CSB, ambos complejos reclutan al complejo basal de transcripción TFIID (Tabla 2) (Iyer *et al*, 1996). En estudios bioquímicos se ha observado que TFIID puede estar conformado por un núcleo o "core" de 6 subunidades (XPD, XPB, p62, p52, p44 y p34) (Feaver *et al*, 1993) y por el subcomplejo de cinasas activadoras de ciclinas (CAK) que está compuesto por las proteínas MAT1, Ciclina H y Cdk7 (Svejstrup *et al*, 1995). Con ensayos de extractos nucleares, sugieren que XPC-HHR23B y el core-TFIID se requieren para una apertura inicial de ~10 nucleótidos y la adición de las proteínas XPA, RPA y XPG para una apertura final de ~25 nucleótidos (Holstege *et al*, 1995; Holstege *et al* 1996) La apertura del DNA está dada por la acción de las dos helicasas presentes en TFIID (XPD dirección 3'→5' y XPB dirección 5'→3) hacia el extremo 5' con respecto al daño (Sung *et al*, 1996; Ryoung *et al*, 1996). Estudios con DNA dañado y desnaturalizado, revelaron que la separación de las hebras en el DNA no es la única función de TFIID, ya que también se requieren para una mayor eficiencia en los pasos subsiguientes (Holstege *et al*, 1997). Por otra parte, experimentos con una mutante dominante negativa en XPB mostraron que había apertura de las hebras de DNA y que se permitía la incisión en el extremo 3' pero no en el extremo 5', sugiriendo que TFIID facilita la incisión en el extremo 5' por la endonucleasa ERCC1-XPF (Winkler *et al*, 2001).

XPA tiene una función primordial en la formación del complejo abierto en las primeras etapas de TC-NER y GG-NER. Esta es una proteína de unión a DNA con una marcada preferencia por DNA dañado. La interacción *in vitro* de ERCC1 y XPF se ha observado con las subunidades p32 y p70 de RPA, TFIID, CSB y con la subunidad p34 de TFIIE. Por su alta afinidad a el DNA dañado y por las interacciones con varios factores de reparación (Matsuda *et al*, 1995), se postula a XPA como verificador del daño y el correcto ensamblaje de la maquinaria de reparación alrededor de la lesión (Park *et al*, 1995; Nocentini *et al*, 1997).

Posteriormente se recluta RPA, RPA se identificó como un factor importante para la replicación del DNA del virus SV40 (Melendy y Stillman, 1993). Este factor es una proteína de unión a DNA de hebra sencilla y esta conformada por tres subunidades de 70, 32 y 14 KDa. Durante la formación del complejo abierto de reparación, las hebras de DNA se separan y RPA da una mayor estabilidad a la hebra sin el daño y remueve posibles estructuras secundarias (He *et al*, 1995). RPA también es crucial para la coordinación de las nucleasas de NER. Se ha observado que RPA interacciona con XPG y ERCC1-XPF; la orientación de RPA es relevante para estas interacciones. El extremo carboxilo de RPA, orientado hacia el 3' del DNA se le une ERCC1-XPF, mientras que el extremo amino orientado hacia el 5' del DNA, se une XPG. RPA confiere una especificidad en el corte a la hebra dañada a ERCC1-XPF e inhibe el corte en la hebra sin el daño (de Laat *et al*, 1998; Kolpashchikov *et al*, 2001; Hermanson-Miller y Turchi, 2002).

El gene *XPG* codifica para una endonucleasa estructura específica, la cual interacciona con una gran variedad de sustratos de DNA, por ejemplo: burbujas y estructuras tallo-asa. XPG media la incisión en una de las hebras de DNA en el extremo 3' del DNA. XPG también se requiere para la formación del complejo abierto, lo que indica un papel estructural en NER. Evidencia de tal papel esta dada por una mutante en su sitio activo, si está presente XPG se detecta cortes en el 5' catalizada por la endonucleasa ERCC1-XPF (Evans *et al*, 1997A).

Finalmente, se se ancla el dímero ERCC1-XPF, que es una endonucleasa estructura específica y cataliza la incisión en el extremo 5' del DNA (Houtsmuller *et al*, 1999). Al parecer, ERCC1-XPF no tienen una función estructural en el complejo de NER. ERCC1-XPF puede ser omitido para la formación del complejo abierto y la incisión 3' *in vitro* (de Laat *et al*, 1999).

Una vez que se hicieron las incisiones y se liberó el fragmento de DNA, RPA es el único factor que se encuentra en el DNA. Estudios realizados *in vitro* revelan que se requiere la DNA pol δ y pol ϵ para la polimerización de nucleótidos. También se requiere: PCNA y el factor de replicación C (RF-C). Brevemente, RF-C se une preferentemente a los extremos 3' del DNA y facilita el ensamblaje de PCNA, el cual forma un complejo homotrimérico en forma de anillo que puede recorrer a lo largo del duplex del DNA. El último paso es la unión de los enlaces fosfodiéster del extremo 5' de la hebra sintetizada, probablemente sea llevado a cabo por la enzima DNA ligasa I (de Laat *et al*, 1999).

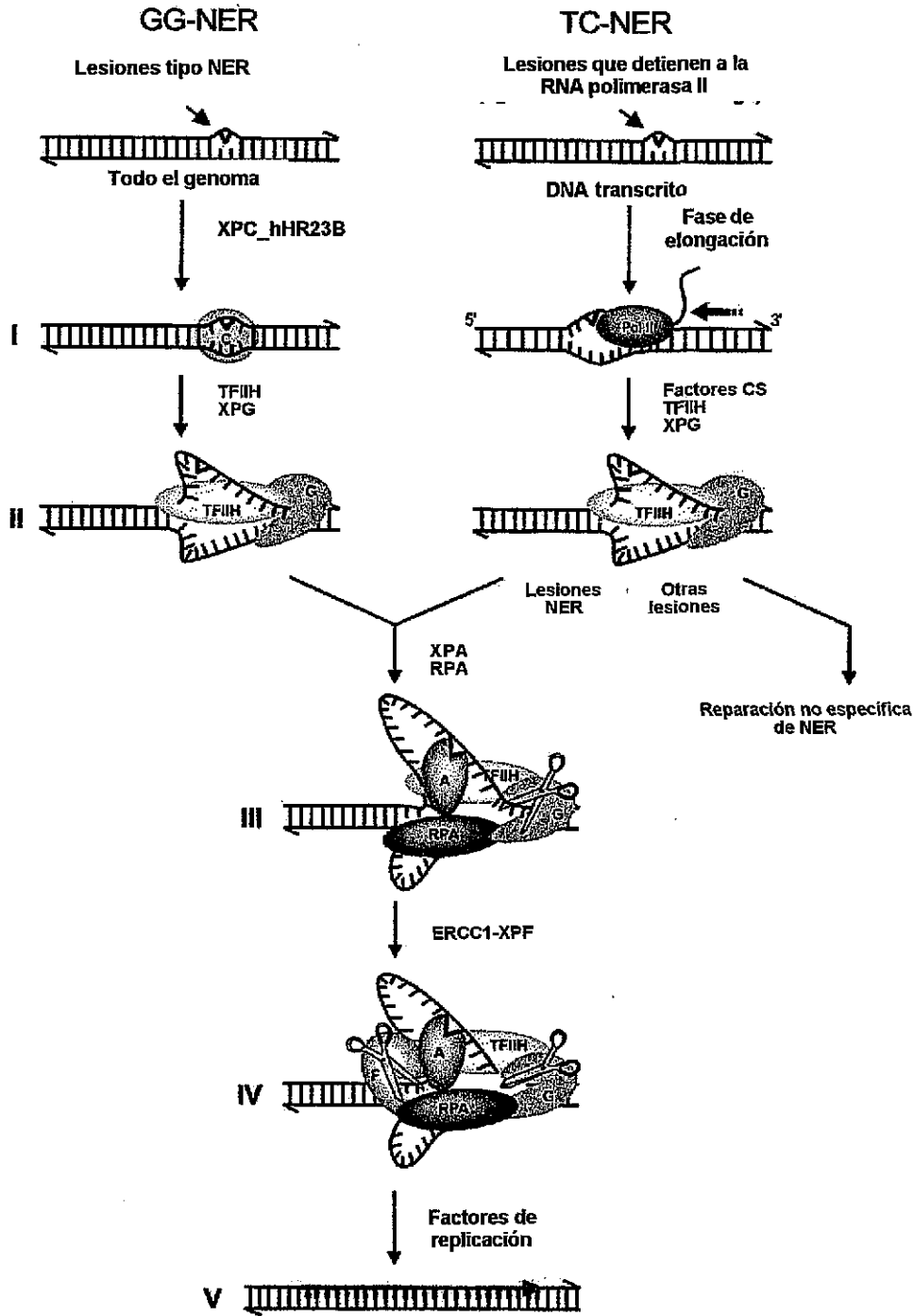


Figura 1. Modelo de reparación por escisión de nucleótidos en eucariotes (tomado de de Laats *et al*, 1999.)

Transcripción de los genes por la RNA polimerasa II (Pol II).

Como ya se mencionó, el complejo basal de transcripción TFIID participa en las dos vías de reparación de NER en los eucariotes. Sin embargo no es el único papel que desempeña en el metabolismo del DNA, también forma parte en la síntesis del RNA mensajero mediada por la RNA polimerasa II y en el control del ciclo celular (Drapkin *et al*, 1994; Wang *et al*, 1994).

Los primeros intentos para producir un mRNA *in vitro* mostraron que la RNA pol II no era capaz de iniciar la transcripción. La síntesis era llevada a cabo cuando a la RNA pol II fue suplementada con un grupo de proteínas aisladas de extractos celulares.

En años recientes, se han identificado cada uno de los factores requeridos para la transcripción *in vitro* de una gran variedad de organismos. Estos factores de proteínas colectivamente se denominaron "General Transcription Factors" (GTFs) que se han nombrado: TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF y TFIIF de acuerdo con su perfil de elución cromatográfica y orden de descubrimiento. Los GTFs se encuentran conservados a lo largo de la escala filogenética. El grupo completo de GTFs esta conformado de aproximadamente 30 polipéptidos. Los GTFs se unen de manera secuencial al promotor para formar complejos nucleoproteicos estables que reclutan a la RNA Pol II. El complejo TFIIF es uno de los últimos en unirse al complejo de iniciación (Orphanides *et al*, 1996).

Como complejo proteico, TFIIF se ha identificado en *M. musculus* (factor δ), *H. sapiens* (TFIIF, BTF2), *S. cerevisiae* (factor b) y *D. melanogaster*. La analogía funcional del factor δ , factor b, BTF2 y TFIIF se sugirió por la composición similar de polipéptidos, por reacciones inmunológicas cruzadas y por el intercambio de subunidades (Ohkuma 1997; Hampsey 1998).

TFIIF es el único GTF con las siguientes actividades enzimáticas: ATPasa dependiente de DNA, DNA helicasa dependiente de ATP y cinasa del carboxilo terminal (CTD) de la RNA polimerasa. Dos de estas actividades, cinasa en CTD y ATPasa son reguladas positivamente por TFIIE, mientras que su actividad de DNA helicasa es regulada de manera negativa (Drapkin *et al* 1994, Ohkuma y Roeder 1994). De todos los GTFs, TFIIF es el más complejo de todos, consta de 9 subunidades con una peso molecular de aproximadamente 500 Kda, comparable al peso de la RNA polimerasa II (Ohkuma, 1997; Hampsey, 1998) (Tabla 2).

En la iniciación de la transcripción, TFIIF separa las hebras de DNA (Guzmán y Lis 1999) por la acción de sus dos helicasas (XPD y XPB) dependientes de ATP. Sin embargo, otros estudios, involucran a TFIIE y TFIIF en la liberación del promotor. Además forma parte del complejo abierto y en la síntesis de los primeros 50 nucleótidos (de Laats *et al*, 1999).

La liberación de la RNA polimerasa del promotor es mediante la fosforilación en su CTD, esta fosforilación es llevada a cabo por la proteína CDK7 de TFIIF. Esto se sugirió por la observación que la RNA pol II entra al complejo de preiniciación en una forma no fosforilada (IIA) y es convertida a una forma fosforilada (IIO) en su extremo carboxilo cuando se libera de la zona del promotor (promoter clearance). Presumiblemente, la fosforilación en el CTD provoca un cambio conformacional que resulta en la liberación de la interacción CTD-TBP y liberación del promotor. Recientemente, se mostró que TFIIF promueve la transición de los complejos de elongación tempranos a complejos de elongación estables. Así, TFIIF lleva a cabo muchas funciones en la transcripción, que afecta procesos antes, durante e inmediatamente después de la iniciación (Hampsey, 1998).

En *S. cerevisiae* la subunidad de 85 Kda del factor b (TFIIF) fue identificada como Rad3, una DNA helicasa con dirección 5'→3' que previamente se mostró que participaba en NER. Rad3 es homólogo a ERCC2, la cual complementa a una deficiencia del gene XPD que produce el síndrome Xeroderma pigmentosum. Un inmunosequestro de Rad3 inhibe la transcripción *in vitro* y una mutante termosensible de Rad3 (*ts*) exhibe una reducción dramática en la síntesis de mRNA a temperatura restrictivas *in vivo* (Guzder *et al*, 1994).

En levadura, *ssl2* se identificó en la misma selección genética para *ssl1*, al rastrear una supresión en la transcripción de un tallo asa de un mRNA. El análisis en la secuencia de este gene reveló que *ssl2* es el homólogo a XPB en humanos. La eliminación del extremo C-terminal de Ssl2 confiere una sensibilidad a luz UV, además de ser termosensible. Otro grupo de manera independiente clonó a *ssl2* y lo designó *rad25*. En el complejo TFIIF se ha observado que distintas subunidades pueden interaccionar entre ellas: por ejemplo Rad3 y Tfb1 con Ssl2 (Hampsey 1998).

El subcomplejo TFIIF de TFIIF incluye a la cinasa de proteínas CDK7 (Kin28, en levadura), a la ciclina H (CCL1). Kin28 es un miembro de la familia p34/cdc2/Cdc28 y es homólogo a MO15/Cdk7, la subunidad catalítica de TFIIF en humano. Una mutante termosensible en Kin28 (*ts*) muestra una rápida desfosforilación del CTD a temperaturas no permisibles, donde Kin28 de TFIIF es el efector principal de la fosforilación de CTD *in vivo*. El subcomplejo humano Cdk7-Ciclina H de TFIIF incluye una tercera subunidad, Mat1. Este complejo heterotrimérico forma a la cinasa activadora de Cdk, denominada **CAK**. TFIIF de

levadura incluye al homólogo *Mat1*, denominado *Tfb3*, pero a diferencia de *Mat1*, *Tfb3* se encuentra en el complejo core-TFIIH, que en TFIIK. *Tfb3* y *Kin28* interaccionan físicamente, esto sugiere que *Tfb3* une a TFIIK con el "core" de TFIIH (Orphanides *et al*, 1996).

La progresión a través del ciclo celular está controlada por las Cdk's, las cuáles incluyen a la familia p34/cdc2/Cdc28. La activación de Cdk requiere de una fosforilación, que es catalizada por las CAK's. La identificación de subunidades de CAK como subunidades de TFIIH, sugiere papeles adicionales como en el control del ciclo celular.

Tabla 2. Genes homólogos del complejo basal de transcripción TFIIH.

<i>Homo sapiens</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>Ceanorhabditis elegans</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
XPB	haywire	rad25	rad25	XPB	XPB
XPD	DmXPD	rad3	rhp3	XPD	XPD
p62	p62	tfb1	tfb1	p62	p62
p52	p52	tfb2	tfb2	p52	
p44	p44	ssl1	ssl1	p44	p44
p34	p34	tfb4	p34	34	p34
cdk7	cdk7	kin28	cdk7	cDK7	
ciclina H	ciclina H	ccl1	ciclina H	ciclina H	
mat1	mat1	tfb3	mat1	mat1	mat1

La proteína p62 de del complejo TFIIH

La organización genómica de *p62* en los metazoarios superiores es compleja. En *M. musculus* consta de 16 exones y 15 intrones, que abarcan una región de 21 Kb. El ATG del inicio de la traducción se encuentra en el exón III. Se transcribe en un mRNA de aproximadamente 3.1 kb con un marco de lectura abierto de 1641 pb. La estructura genómica en ratón es muy similar a humanos, las diferencias están localizadas en el extremo 5'UTR (untranslated region, región no traducida de DNA). Por análisis de EST (expressed sequenced tag), se descubrió que posiblemente exista un splicing diferencial tejido específico en ratón, estas diferencias abarcan el extremo 5' UTR (regiones no traducidas de DNA), entre los exones I y II. En humanos también se ha detectado una EST que posiblemente sugieran un splicing diferencial. En un análisis de tipo Northern blot se observó que la expresión de este

gene es distinta dependiendo del tejido tanto en ratones como en humanos. La expresión de este gene es abundante en el hígado y testículos, tanto ratones como en humanos (Perez *et al*, 1998).

Los grupos de Jean-Marc Egly y Roger Kornberg en el año de 1992 clonaron y secuenciaron los ortólogos de *p62* en células HeLa y levadura respectivamente (Gileadi O., *et al* 1992; Fisher L, *et al* 1992). En humanos codifica para una proteína de 548 aminoácidos, con un peso de 62,030 Da y un punto isoeléctrico de 8.82. La interacción específica con anticuerpos monoclonales para *p62* inhibe la transcripción *in vitro*, y se restablece el nivel de transcripción cuando se adiciona el complejo BTF2 (TFIIH) puro. Además, *p62* copurifica con un complejo de 3 proteínas con los siguientes pesos moleculares: 80, 38 y 32 kDa que conforman a TFIIH. Por otra parte el anticuerpo α -*p62* de humano tiene una reacción cruzada con una proteína del factor δ (ratón), por lo que se postula que factor δ es el homólogo a TFIIH (Fisher *et al*, 1992).

En levadura el gene ortólogo a *p62* es *tfb1* (transcription factor b, subunit 1) y codifica para una proteína de 642 aminoácidos y un peso aproximado de 73 kDa. En un análisis genético sobre tétradas, se mostró que la forma nula del gene *tfb1* es esencial para la viabilidad en condición homóciga. En este organismo, TFB1 tiene una asociación muy fuerte con proteínas de 85, 73 y 50 kDa, y estas formas asociadas estaban relacionadas a la actividad transcripcional y cinasa del factor b (TFIIH) (Gileadi *et al*, 1992).

Las mutantes de *tfb1* fueron realizadas por gene suffling. Las mutantes presentaban codones de terminación prematuros. La mutante *tfb1-1* carece de los últimos 111 aminoácidos en el extremo en el C-terminal, mientras que la mutante *tfb1-6* carece de los últimos 34 aminoácidos. Estas mutantes son sensibles a la temperatura, a los dímeros de ciclobutano de pirimidina y a los 6-4-PPa temperaturas no permisivas. Por otra parte, se mostró que la región que abarcan los aminoácidos 528 al 642 son importantes para la interacción con la proteína SSL2, y el resto de la proteína es dispensable para esta interacción (Matsui *et al*, 1995; Hwang *et al*, 1995; Sweder *et al*, 1996).

Se han descrito distintos mecanismos de regulación postraducciona, uno de estos es la fosforilación reversible de factores de transcripción. Por ejemplo, la actividad de un factor basal de transcripción TFIIIB (responsable para la transcripción de genes ribosomales) se ve disminuida en extractos de células sincronizadas en la etapa de mitosis o por la conversión de la etapa de interfase de extractos celulares a un estadio de mitosis al adicionar ciclina B1. La forma madura de la proteína $p34^{cdc2}$ esta dada por una serie de fosforilaciones y desfosforilaciones, además de la interacción con la ciclina B1. La inhibición de la

transcripción por parte de TFIIB es por esta cinasa dependiente de ciclinas. Posteriormente se observó que el complejo cdc2/ciclina B1, es suficiente para reprimir la transcripción por la RNA polimerasa II en un sistema *in vitro*. Recientemente se reportó que el factor TFIID aislado en la etapa de mitosis esta fosforilado, y su actividad se restablece al desfosforilarse. En un extracto de células provenientes de mitosis, se mostró que la proteína p62 de TFIH se encuentra fosforilada, además de otra proteína de 36 Kda. Esta fosforilación posiblemente afecte la capacidad de cinasa de Cdk7, ya que no puede fosforilar el CTD de la RNA polimerasa II. La fosforilación de p62 es dependiente de la vía de cdc2/ciclina B1. Además de que posee la secuencia consenso para una posible fosforilación por parte de cdc2 (SPEGK que corresponde de los aminoácidos 56 al 60) (Long *et al*, 1998).

Uno de los activadores del ciclo celular al inicio de la etapa S es E2F-1. E2F-1 se une a varios promotores de activadores transcripcionales: cdc2, ciclina E, ciclina A, en algunos proto-oncogenes: c-Myb, B-Myb, c-Myc y N-Myc. E2F-1 esta altamente regulado de manera postraduccional, uno de estos mecanismos es llevado a cabo por el complejo TFIH. TFIH es responsable de la fosforilación en extractos celulares de E2F-1, la interacción es con p62 durante la fase S y posiblemente la fosforilación pueda auxiliar a una rápida degradación de E2F-1 (Vandel y Kouzarides, 1999). TFIH aumenta la actividad de VP16, a la proteína reguladora del ciclo celular p53 (Xiao H *et al*, 1994; Léviellard *et al*, 1996) y el receptor de estrógenos α (Chen D *et al*, 2000).

En *D. melanogaster*, las subunidades caracterizadas del complejo TFIH son *DmRad3* (XPD) (Reynaud *et al*, 1999) y *haywire* (XPB) (Mounkes *et al* 1992; Mounkes y Fuller, 1999). El resto de las subunidades no han sido caracterizadas, aunque ya se conoce su secuencia (Austin y Biggin 1996).

OBJETIVOS

Caracterizar el gene homólogo a p62 en *Drosophila melanogaster*

OBJETIVOS PARTICULARES

- Aislar un cDNA para el homólogo a p62.
- Determinar motivos en los ortólogos de p62.
- Determinar si p62 participa en la reparación a daño a DNA por luz UV.
- Detectar el nivel de expresión de p62 a lo largo del desarrollo.
- Observar la expresión principal en la etapa embrionaria y tejido de adultos

transcripción por parte de TFIIB es por esta cinasa dependiente de ciclinas. Posteriormente se observó que el complejo cdc2/ciclina B1, es suficiente para reprimir la transcripción por la RNA polimerasa II en un sistema *in vitro*. Recientemente se reportó que el factor TFIID aislado en la etapa de mitosis esta fosforilado, y su actividad se restablece al desfosforilarse. En un extracto de células provenientes de mitosis, se mostró que la proteína p62 de TFIH se encuentra fosforilada, además de otra proteína de 36 Kda. Esta fosforilación posiblemente afecte la capacidad de cinasa de Cdk7, ya que no puede fosforilar el CTD de la RNA polimerasa II. La fosforilación de p62 es dependiente de la vía de cdc2/ciclina B1. Además de que posee la secuencia consenso para una posible fosforilación por parte de cdc2 (SPEGK que corresponde de los aminoácidos 56 al 60) (Long *et al*, 1998).

Uno de los activadores del ciclo celular al inicio de la etapa S es E2F-1. E2F-1 se une a varios promotores de activadores transcripcionales: cdc2, ciclina E, ciclina A, en algunos proto-oncogenes: c-Myb, B-Myb, c-Myc y N-Myc. E2F-1 esta altamente regulado de manera postraduccional, uno de estos mecanismos es llevado a cabo por el complejo TFIH. TFIH es responsable de la fosforilación en extractos celulares de E2F-1, la interacción es con p62 durante la fase S y posiblemente la fosforilación pueda auxiliar a una rápida degradación de E2F-1 (Vandel y Kouzarides, 1999). TFIH aumenta la actividad de VP16, a la proteína reguladora del ciclo celular p53 (Xiao H *et al*, 1994; Léviellard *et al*, 1996) y el receptor de estrógenos α (Chen D *et al*, 2000).

En *D. melanogaster*, las subunidades caracterizadas del complejo TFIH son *DmRad3* (XPD) (Reynaud *et al*, 1999) y *haywire* (XPB) (Mounkes *et al* 1992; Mounkes y Fuller, 1999). El resto de las subunidades no han sido caracterizadas, aunque ya se conoce su secuencia (Austin y Biggin 1996).

OBJETIVOS

Caracterizar el gene homólogo a p62 en *Drosophila melanogaster*

OBJETIVOS PARTICULARES

Aislar un cDNA para el homólogo a p62.

Determinar motivos en los ortólogos de p62.

Determinar si p62 participa en la reparación a daño a DNA por luz UV.

Detectar el nivel de expresión de p62 a lo largo del desarrollo.

Observar la expresión principal en la etapa embrionaria y tejido de adultos

MATERIAL Y METODOS

Cepas bacterianas y líneas de *D. melanogaster*:

Las cepas de *E. coli* fueron: XL1-Blue-MRF⁺: ($\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$ *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac[F' proAB lacI^qZ Δ M15 Tn10 (Tet^r)]; SolR (e14⁻ (McrA⁻) Δ (McrCB-hsdSMR-mrr) 171 *sbcC recB recJ uvrC umuC ::Tn5 (Kan^r) lac gyrA96 relA1 thi-1 endA1 λ ^R [F'proAB lacI^qZ Δ M15] Su⁻ (non suppressing)). Las líneas de *D. melanogaster* fueron, OreR (línea silvestre), línea 12329 *P{ry[+t 7.2]= PZ} I(2)06949 [06949] cn [1]/CyO; ry [506]; alelos de haywire: ru h hay^{nc2} vi/TM3; ru h hay^{nc2n4} vi/TM3.***

Búsqueda del gene *p62* en *D. melanogaster*

Para la obtención del gene *p62* de *D. melanogaster*, se buscó inicialmente por un análisis tipo BLAST con la secuencia de DNA ortóloga de *M. musculus* en la base de datos de Berkley Drosophila Genome Project (BDGP). Se obtuvo una clona tipo EST (expressed sequence tag) que contenía 622 pb que abarcaba el extremo 5' del gene (EST 3527). Este plásmido se digirió con EcoRI y XhoI (Boehringer) para obtener el fragmento que codifica para este cDNA. Este fragmento se purificó mediante agarosa de bajo punto de fusión y se marcó radiactivamente con el Kit Random Primer (Stratagene) siguiendo las indicaciones del proveedor.

Posteriormente, la región codificante se obtuvo a partir de una búsqueda en una librería de cDNA en fagos λ Uni-Zap (Stratagene). Esta librería fue hecha a partir de RNA poli-A, de embriones 2-14 hrs de edad de la línea silvestre Canton S. La infección en del fago se realizó en la cepa de *E. coli* XL1-Blue-MRF⁺. El rescate de los fagémidos se realizó con el empleo del fago helper ExAssist y de la cepa de *E. coli* SolR siguiendo las especificaciones del proveedor (Stratagene).

Las clonas obtenidas se secuenciaron en sus extremos 5' y 3' en la unidad de secuenciación del Instituto de Biotecnología, mediante el empleo de los oligonucleótidos universales para el plásmido pSK-Bluescript.

Obtención de RNA total

El tejido se colectó de las siguientes etapas del desarrollo de la línea OreR: embriones de 0-8 hrs, 8-16 hrs, 16-24 hrs, larvas de primer estadio, segundo estadio y tercer estadio, pupas, hembras y machos a 25°C. El tejido se lavó con agua bidestilada para retirar los restos

de alimento. Las muestras se trituraron en presencia de nitrógeno líquido. Posteriormente en un homogenizador Dounce se adicionó 10 mL de la solución desnaturante (Tiocianato de guanidina 4M; Citrato de Sodio (pH 7) 25 mM; Sarkosil 0,5%; β -Mercaptoetanol 0.1M) por gramo de tejido, se dió 10 golpes de manera manual. Inmediatamente se adicionó 1 mL de acetato de sodio 2 M (pH 4), se mezcló por inversión. Se adicionó 10 mL de fenol (pH 4, Research Organics) y 2 mL de cloroformo/alcohol isoamílico (49:1), se mezcló e incubó en hielo durante 15 minutos. Posteriormente se centrifugó 15 minutos a 14 Krpm en una centrifuga Eppendor a 4° C. Se adicionó un volumen de isopropanol (Merck) a la fase acuosa, se mezcló por inversión e incubó 30 minutos a -20 °C. La pastilla de RNA se lavó con etanol a 70 % y sea adicionó 50 μ L de agua y las muestras se guardaron a -70 °C.

La concentración de RNA total se determinó en un espectrofotómetro Beckman DU 650. La calidad del RNA total se verificó mediante una electroforesis en un gel de agarosa, para ello, se tomó 0.6 gr de agarosa, 3.8 ml de Amortiguador MOPS 10X y 2 ml de formaldehído. 2 μ l de RNA total se incubaron con 8 μ l de amortiguador de cargado (600 μ l formamida; 179 μ l formaldehído; 100 μ l MOPS 10X; 113 μ l agua), 1 μ l de azul de bromofenol y 1 μ l de bromuro de etidio y se incubó a 45° C durante 15 minutos. Se realizo la electroforesis en presencia de MOPS 1X a 70 volts.

Nota: Todas las soluciones para RNA se prepararon a partir de agua tratada con DEPC (Dietil pirocarbonato, SIGMA) al 0.001%.

Cuantificación de la expresión del gene *p62* por RT-PCR.

La síntesis de cDNA se llevó a cabo mediante el kit de Amersham siguiendo las indicaciones del proveedor. Las reacciones de amplificación se realizaron bajo las siguientes condiciones: 2 μ l cDNA; amortiguador 5 μ l(Roche); Taq pol (Roche) 1 μ l; dNTP 2 μ l; oligonucleótidos 20 pmolas de cada uno y agua hasta 50 μ l. Las reacciones se detuvieron a los 25 ciclos de amplificación. Se utilizaron los siguientes juegos de oligonucleotidos para los genes *rp49* y *p62*. Para *rp49*: RP495': CATCCGCCAGCATAACAG y RP493' CTTCTTGGAGGAGACGCC. Se dió un único pulso de 95°C durante 5 minutos, posteriormente el ciclo empleado fue de 95°C durante 30'', 57°C 30'' y 72°C 2'.

Para la amplificación de *p62* se emplearon dos juegos de oligos. Se utilizó, RT5'-*p62*: CGAACGGGATGAATGGAAAG; RT3'-*p62*: CGGACAGCGAAAGGTATAAG; con el siguiente esquema de amplificación 95°C durante 30'', 59°C 30'' y 72°C 2'. Con los siguientes oligonucleótidos se amplificó la región codificante 3', *p62*-rt5': ACGGCACGCTCTACGTAATG; *p62*-rt3': GCAGTTTTCGCTCCTTCAAG. Los ciclos empleados fueron a las siguientes temperaturas 95°C durante 30'', 60°C 30'' y 72°C 2'.

La presencia de los fragmentos de DNA correspondientes se visualizaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% sumergido en TAE 0,5X y bromuro de etidio 500 ng ml⁻¹ a 70 volts.

Determinación de la proteína p62 mediante Western Blot

Los extractos celulares se obtuvieron a partir de embriones de 0-8 hrs, 8-16 hrs, 16-24 hrs, larvas de primer estadio, segundo estadio y tercer estadio, así como también pupas, hembras y machos a 25°C. El tejido se trituró en presencia de nitrógeno líquido, posteriormente se homogeneizó en condiciones nativas con amortiguador de lisis (HEPES 50 mM pH7, 6; NaCl 385 mM; EGTA 0,1 mM; MgCl₂ 1,1 mM; Tween 20 0,1%; Inhibidor de proteasas Complete (Boehringer) 1 tableta para 50 mL de solución; PMSF 100 µg ml⁻¹ ; Ortovanadato de sodio 2 mM; β-Glicerofosfato 20 mM) en un homogenizador Dounce. Inmediatamente se centrifugo a 10 000 xg durante una hora a 4°C en una centrifuga Eppendorf. Se colecto el sobrenadante, se adicionó glicerol al 10% final y las muestras se congelaron a -70° C (Elfring L, *et al*, 1998).

A 10 µL del extracto se le adicionó 20 µl de amortiguador de lisis Laemli (Tris (pH 6,8) 62,5 mM; Glicerol 10%; SDS 2,3 %; β-mercaptoetanol 5%; Azul de bromofenol 0,01%). Se realizo un SDS-PAGE a una concentración de 7,5% (Laemmli K, 1971) . Posteriormente las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Trans-Blot transfer medium, Bio Rad) en una cámara de transferencia en presencia del amortiguador de transferencia (Trizma 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20%) durante 1 hora a 400 mA.

Posteriormente la membrana de nitrocelulosa se incubó en la solución de bloqueo (leche descremada al 5% disuelta en PBS) a temperatura ambiente durante 1 hora. Inmediatamente después se incubó con el anticuerpo α-p62 (Santa Cruz) de humano toda la noche en presencia de la solución de bloqueo (leche descremada al 5% y tween 20 al 0,1% disueltos en PBS). A continuación se realizaron tres lavados con PBS-Tween (0,1%) y por último se incubó con la proteína A -peroxidasa en presencia de PBS-Tween (0,1%) durante 30 minutos. La membrana se lavó nuevamente 2 veces con PBS-Tween (0,1%) y al final un lavado con PBS.

La membrana se reveló con el método de quimioluminiscencia por medio del kit ECL™ de Amersham. Para esto las placas autorradiografía se expusieron a las membranas a

tiempos diferentes, según la luminiscencia y se revelaron según las recomendaciones del proveedor.

Inmunoprecipitación de la proteína p62

La extracción de proteínas nativas de embriones de 0-24 hrs y adultos se realizó como ya se describió con anterioridad. 2 μ l del extracto, se incubó en presencia de 10 μ l de perlas de agarosa-proteína A y 5 μ l de α -P62 anti humano en agitación constante por 12 hrs a 4°C. Posteriormente se dieron 10 lavados de 1 ml cada uno con en amortiguador de lisis. A las muestras se les realizó una electroforesis en SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y posteriormente se sumergieron en la solución de bloqueo. Las membranas se incubaron de manera independiente con los siguientes anticuerpos: un policlonal α -p62, monoclonal α -fosfoserinas y monoclonal α -fosfotirosinas. La presencia de las bandas correspondientes se detectó mediante el Kit de lumiscencia ECL de Amersham.

Detección de la expresión del gene en tejidos.

A la línea que porta el "enhancer trap" insertado en el gene *p62* se utilizó una tinción a embriones para detectar la actividad de β -galactosidasa. Se colectaron embriones a diferentes etapas del desarrollo y posteriormente se decorionaron en presencia de hipoclorito de sodio al 50% durante 2 minutos. Se lavó con un exceso de agua el cloro. Los embriones se fijaron con 0.5 mL de Heptano saturado con la solución de fijación (Cacodilato de sodio 0.1 M pH7.3 (1ml); glutaraldehido (Fluka) 50% (1 ml) heptano (2ml)) durante 11 minutos a temperatura ambiente. Se transfirieron los embriones a un portaobjetos y se eliminó el exceso de heptano. Los embriones se colectaron con un diurex, a continuación se cubrieron con una solución de PBS. Se procedió a desvitelinizar manualmente con una aguja. A los embriones se colocaron en un tubo Eppendorf y se les adicionó 300 μ l de la solución de tinción (Na_2HPO_4 0.2 M (2ml); NaH_2PO_4 0.2M (0,5 ml); NaCl 1M (50 μ l); $\text{K}_3(\text{Fe}(\text{CN})_6)$ 50 mM (3.05 ml); $\text{K}_4(\text{Fe}(\text{CN})_6)$ 50 mM (3.05 ml) y agua hasta 50 ml) sin X-gal, se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Se retiró esta solución, se adicionó la solución de tinción y (1/30) de X-Gal [80 mg ml^{-1}] y se incubó a 37°C durante toda la noche. Los embriones se lavaron con un 100 μ L de N, N'-dimetilformamida para retirar los cristales de X-gal y se substituyó por PBS. Los embriones se colocaron en un portaobjetos y se procedió a tomar fotografías en un microscopio Nikon en campo claro a 20X.

A los imagos se les anesteció en presencia de CO₂, y se les realizó un pequeño corte en la parte ventral del abdomen. Posteriormente se incubaron en presencia del amortiguador de tinción siguiendo el protocolo anterior. Se tomaron fotografías a los tejidos con actividad de β-Gal en un microscopio de disección Nikon a un aumento de 6X.

Detección a la sensibilidad a luz UV.

La línea de *D. melanogaster* I(12329) así como a su parental se irradiaron en presencia de luz ultravioleta. Para la obtención de la línea parental se cruzaron hembras vírgenes de la línea I(12329) con machos con doble balanceador en el cromosoma 3 (*w118; +/+; Dr Pr/TM3, Srb, r4*). Las hembras vírgenes de esta progenie (*+/w1118; +/CyO; +/TM3, Sb,r4*) se cruzaron con machos (*w1118; +/CyO; +/TM3, Sb,r4*). Se aisló la descendencia (*+/+; +/CyO; cn ry*). A larvas de tercer estadio, 100 para la línea I(12329) y 140 para la línea parental, se les dio un pulso de luz ultravioleta a 0, 5, 10 y 15 segundos. Se dejó continuar el desarrollo a 18°C en medio fresco y a los imagos se les tomó fotografías en un microscopio de disección Nikon a 6X.

Cruzas con alelos de *haywire*.

Las cruzas se realizaron a 18°C. Hembras vírgenes de la línea I(12329) se cruzaron con machos: el primer alelo de *haywire* fue *ru h hay^{nc2} vi/TM3* y el segundo alelo *ru h hay^{nc2rv4} vi/TM3*. Se contó el número de huevos ovipositados y a los imagos. Se registró los fenotipos de los imagos transheterocigos (*p62; hay*).

Búsqueda de homólogos y motivos en proteínas ortólogas de p62

Se realizó una base de datos de todas las proteínas ortólogas a p62. Se hizo mediante el programa BLAST en la página de la Internet de NCBI (<http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>) se obtuvieron varias secuencias: de *M. musculus* (CAA05340), *H. sapiens* (P32780), *C. elegans* (AAB94149), *A. thaliana* (CAB71072), *S. cerevisiae* (AAA35143), *S. pombe* (CAB11039), *N. crassa* (CAB91486) y *D. melanogaster* (AAF58253).

Las secuencias de proteínas se alinearon mediante el programa Multalin de la Internet (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>)(Corpet, 1988). El grado de homología se realizó mediante el programa Best Fit del paquete del GCG del Instituto de

Biología de la UNAM. La obtención del árbol filogenético se realizó con el programa Clustal W del internet (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>).

Por otra parte, se realizó un alineamiento múltiple de estas proteínas utilizando el programa MEME (Multiple EM for Motif Elicitation, <http://meme.sdsc.edu/meme/website/>) para la obtención motivos consenso. A los motivos encontrados se les realizó un análisis en la base de datos en Prosite para discernir la posible función de estos péptidos.

RESULTADOS

La búsqueda del gene homólogo en *D. melanogaster* de *p62*, se inició con el rastreo en la base de datos del Berkley Drosophila Genome Project (BDGP). Esto se realizó con un análisis tipo Blast con la secuencia de DNA codificante para *p62* de *M. musculus*. El resultado fue la obtención de una secuencia tipo EST (3527) (expressed sequenced tag) de 531 pares de bases (pb) que comprendía la región 5' del gene. A continuación se procedió a obtener la secuencia codificante completa de cDNA para *p62*.

El fragmento de 531 pb del EST se utilizó como una sonda para obtener la secuencia codificante en un banco de cDNA de embriones de *D. melanogaster*. De este rastreo se obtuvieron tres clonas: con los siguientes tamaños aproximados de inserto, 2035 pb (figura 1, carril A), 1450 pb (figura 1, carril B) y 379 pb (figura 1, carril C). El análisis de las secuencias mostró que en la clona 1 existía un posible marco de lectura abierto, ya que en el extremo 5' presentaba el codón de inicio de la traducción y en el extremo 3' un codón de término y la región de poliadenilación. La secuencia completa mostró que el tamaño de la clona 1 fue de 2016 pb. La clona 2 era una versión truncada de *p62*.

La región codificante de DNA de *Dmp62* es de 1773 pb, codifica para una proteína de 541 aa, con una masa molecular de 66901 Da y un punto isoeléctrico de 9,02.

Al comparar la secuencia de la clona *Dmp62* con la secuencia genómica de *p62* (numero de acceso en el PDGB, CG5181), se observó que este gene presentaba 5 exones y 4 intrones pequeños. El análisis computacional del PDGB mostró que el posible inicio de la transcripción se localizaba a 255 pb río arriba del primer ATG del marco de lectura abierto (fig 2).

Además, existe una inserción por un elemento P en este gene *l(2) 12329* de tipo "Enhancer Trap". Esta mutante la construyó el grupo de A. Spradling (Spradling *et al*, 1999), en un ensayo de mutagénesis de amplio espectro. La inserción de éste elemento P se localiza a 144 pb hacia el extremo 5' del codón de inicio de la traducción, lo que posiblemente produzca una mutante de tipo hipomórfica (figura 2).

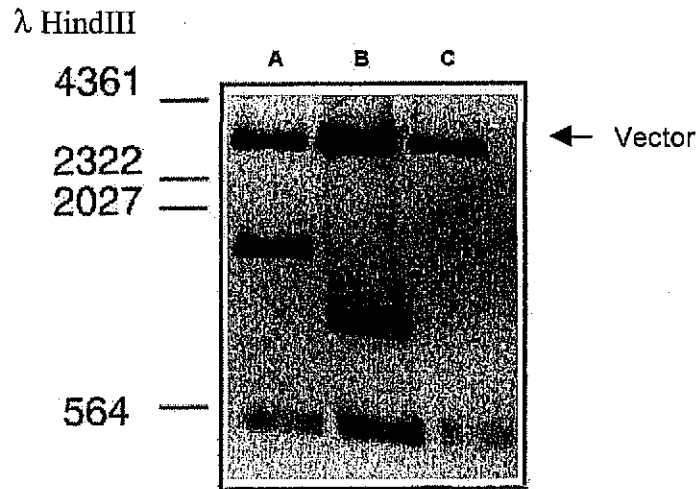


Figura 1. Electroforesis de DNA proveniente de las clonas de cDNA de *Dmp62* de *D. melanogaster*. El DNA se digirió con las enzimas de restricción EcoRI y XhoI; carril A, clona 1; carril B, clona 2 y carril C clona 3.



Figura 2. Organización genómica del gene *Dmp62*. Las barras en negro son los exones, las líneas son los intrones. El triángulo sobre el primer exón es la inserción de un elemento P de tipo "enhancer trap".

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

BUSQUEDA DE ORTOLOGOS DE *Dmp62*.

Una vez obtenida la secuencia de *Dmp62*, se procedió a buscar ortólogos de este gene. Se obtuvieron varias secuencias, entre estas: *M. musculus*, *H. sapiens*, *C. elegans*, *A. thaliana*, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *N. crassa*. El nivel de similitud e identidad se analizó entre *Dmp62* y cada una de estas secuencias, esto se hizo mediante el programa Best Fit del GCG. Se observó que la secuencia de *Drosophila* presenta un mayor grado de similitud con *M. musculus* (59.96%) y *H sapiens* (59.21%) y va decreciendo conforme se desciende en la escala evolutiva (tabla 1, fig 3). Este resultado se corroboró al hacer otro tipo de análisis, con el programa Clustal W se utilizaron estos mismos homólogos y se construyó un cladograma (fig 3).

Los genes homólogos más cercanos a *Dmp62* son los pertenecientes a los metazoarios, mientras que los del reino fungi son los más alejados.

Al realizar el alineamiento múltiple con el programa Mult Align (Corpet, 1988) se observó que en la región N-terminal existe una mayor homología mientras que ésta disminuye en la región C-terminal (Figura 4).

En la región que comprende los aminoácidos 289 al 303 está altamente conservada y presenta la siguiente secuencia: VPXXXEX(E/D)FWXXFF. Esta región se comparó en la base de datos del Prosite. La secuencia no presenta homología con algún dominio caracterizado a la fecha. Además se realizó un análisis tipo BLAST contra todas las proteínas no redundantes, únicamente se encontró similitud con proteínas homólogas a *p62*. También, alrededor de esta secuencia hay residuos de aminoácidos que el nivel de conservación es parcial (en azul, fig 4), y abarcan una región de aproximadamente 65 aminoácidos (del 259 al 303). En región C-terminal, hay residuos que su grado de conservación es variable (color azul), por ejemplo de la región 580 a la 620. De éste análisis fue difícil poner fronteras para ubicar motivos y poder hacer una análisis más detallado.

Tabla 1. Comparación en identidad y similitud entre Dmp62 y las proteínas ortólogas del complejo basal de transcripción TFIID.

ORGANISMO	Identidad (%)	Similitud (%)
<i>Mus musculus</i>	50.09	59.96
<i>Homo sapiens</i>	49.53	59.21
<i>Caenorhabditis elegans</i>	33.80	44.86
<i>Arabidopsis thaliana</i>	32.08	41.50
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27.27	39.27
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	31.85	45.22
<i>Neurospora crassa</i>	24.00	45.00

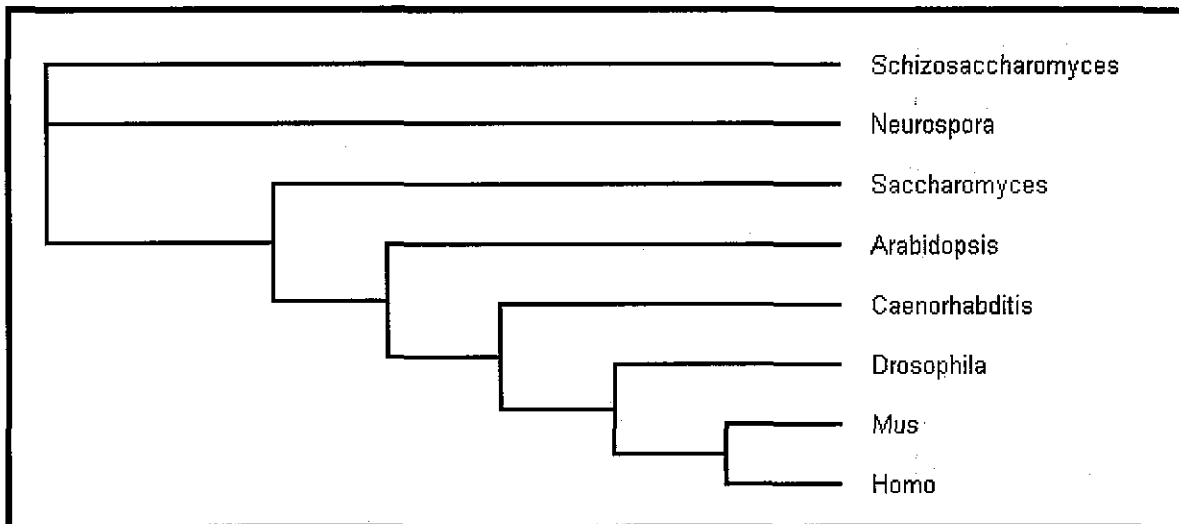


Figura 3. Cladograma de los ortólogos de p62 elaborado a partir del programa Clustal W. Cada una de las ramas refleja la similitud entre cada uno de los phyla.

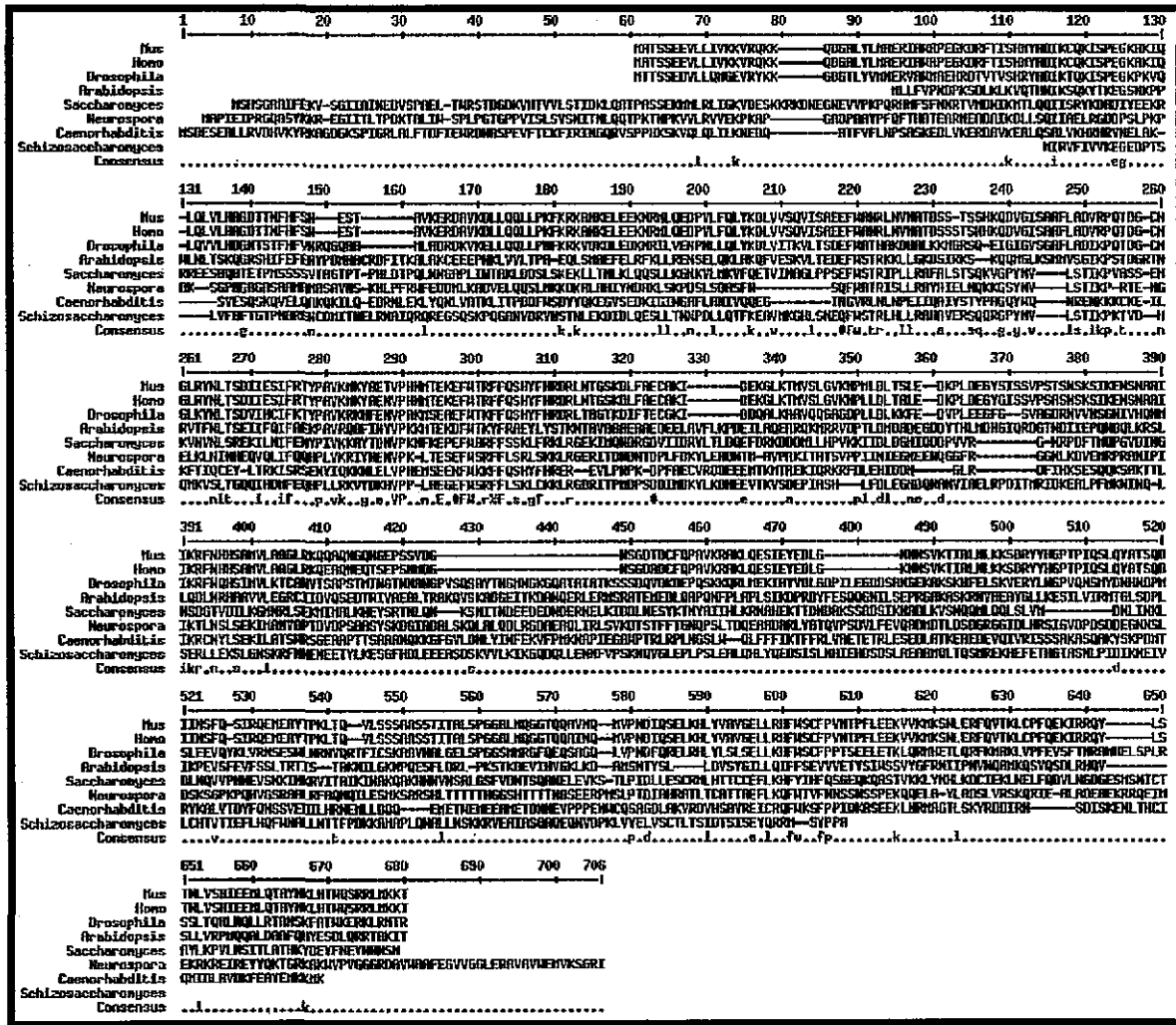


Figura 4. Alineamiento de las secuencias de p62 mediante el programa Mult Aling. Los aminoácidos coloreados en rojo denotan la identidad en la posición del aminoácido, los aminoácidos coloreados en color azul muestran la conservación en las propiedades de los aminoácidos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Búsqueda de motivos en los homólogos de p62

Con la comparación de los distintos ortólogos de *Dmp62* donde se observó regiones discretas conservadas, nos preguntamos si podríamos ubicar motivos en distintas regiones de estas proteínas. Para llevar a cabo esto se utilizó el programa MEME (Multiple Elicitation Motif Expectation). Con los parámetros de buscar 6 motivos y el tamaño de las cajas variable.

En la figura 5, se muestran los distintos motivos encontrados con el programa MEME con un tamaño de 20 aminoácidos. La secuencia de los motivos se muestra en la tabla 2. Las cajas 1, 2, 3 y 4 están presentes en cada una de las proteínas, con una distribución conservada con dirección del amino al carboxilo (caja 4, 2, 1 y 3). La distancia entre cada una de estos motivos se encuentra más o menos conservados, entre el motivo 4 y 2 están entre 20 a 42 aminoácidos de separación. Entre el motivo 2 y 1 de 8 a 9 aminoácidos a excepción de *C. elegans* que esta a 57 aminoácidos. La caja 3 es la más distante entre estas, se encuentra en el carboxilo terminal, a excepción de *A. thaliana* que no se encuentra el motivo. La caja 6 esta compartida únicamente entre los metazoarios, y la distancia con el motivo 4 está mas o menos constante entre 55 y 71 aminoácidos. La caja 5 únicamente se encuentra en *H. sapiens*, *M. musculus* y *D. melanogaster*, y está presente en la región amino como en carboxilo, siendo este el único motivo que se encuentra duplicado

En un análisis en la base de datos del prosite, se buscó un posible patrón de modificaciones post-traduccionales. Los motivos 3, 5 y 6 no se encontró una posible modificación, mientras que los motivos 1 y 2 están sujetos a glicosilación (NMTE y NLTS), el motivo 1 a una fosforilación por PKC y CK2 (TEK y TEKE) y por último el motivo 4 a una posible fosforilación por CK2 (TADE)

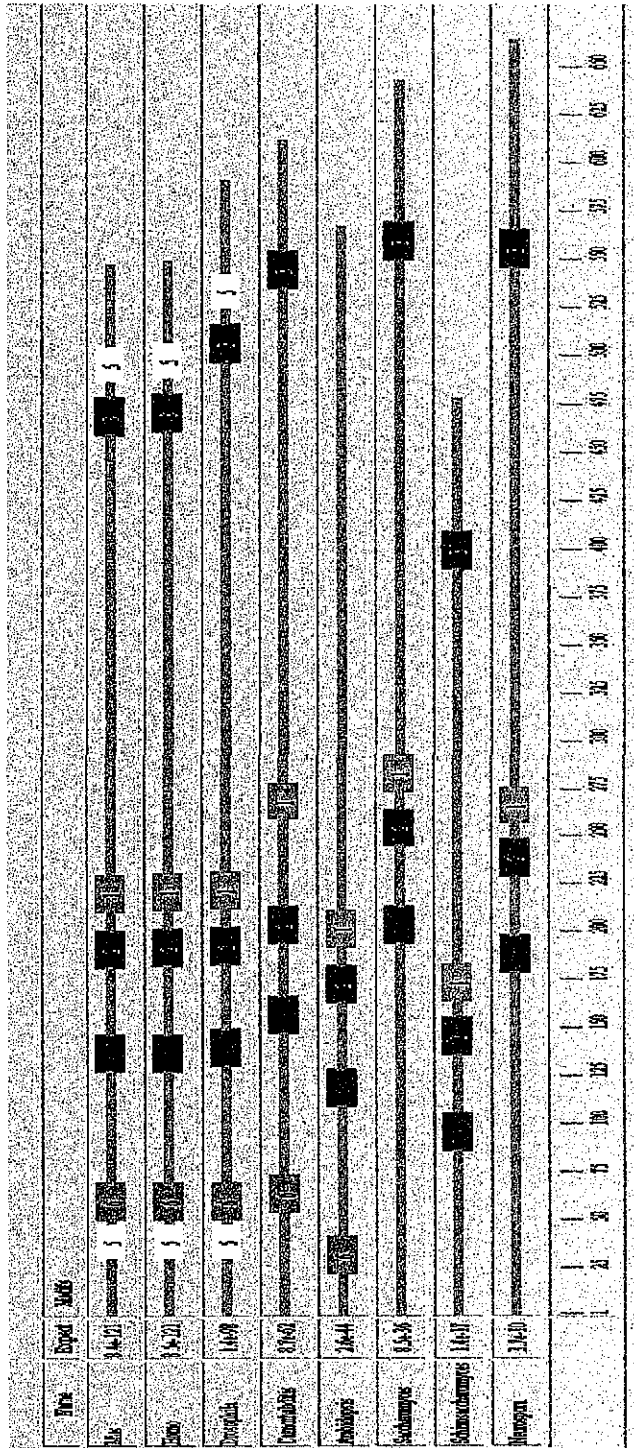


Figura 5. Distribución de los motivos entre los ortólogos de p62. La búsqueda se realizó con el empleo del programa MEME.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Tabla 2. Secuencia de los motivos en p62 obtenidos a partir del análisis con el programa MEME.

MOTIVO	SECUENCIA
1	VPHNMTEKEFWTRFFQSHYF
2	NGVRYNLTSDIHCIFRTYP
3	CRHLYVAVGELLRHFWSAFP
4	LYKDLVSKVITAEFWAT
5	ERVAWMPEGKDRFTVSHMCP
6	IKCQKISPEGKAKIQLQLVL

Sensibilidad al daño por luz ultravioleta

Se analizó si la mutante en *Dmp62* (*l(2) 12329*) afecta al mecanismo de NER al irradiarla con luz UV. Para ello inicialmente se obtuvo la línea parental.

Para la obtención de la línea parental de *Dmp62^{mut}*, a hembras vírgenes de la línea 12329 (*P{ry[+t 7.2]= PZ} l(2)06949 [06949] cn [1]/CyO; ry [506]*) se cruzaron con machos con doble balanceador para el cromosoma 2 (*w1118; Dr Pr/TM3, Sb, r4*), de la progenie se tomaron hembras vírgenes y machos con los siguientes fenotipos (*w1118/+; +/CyO; +/TM3, Sb, r4; cn, ry*): De esta segunda cruce se aislaron los ímagos con el siguiente fenotipo (*+/+; +/CyO; ry, cn*) y se utilizó como línea parental. La dosis empleada para este ensayo fue 0 seg, 5 seg (45.55 Joules/m²), 10 seg (91.1 Joules/ m²), 15 seg (136.65 Joules/ m²). El análisis se realizó sobre larvas del tercer estadio y se dejaron emerger los ímagos a 19°C. El número de individuos en la línea mutante fue de 100 larvas de tercer estadio, mientras que en la parental fue de 140, esto es debido a que hijos de la cruce (hembras *+/CyO* X machos *+/CyO*) las dos terceras partes serán *+/CyO* y la tercera parte *+/+*. El experimento en la línea parental se realizó una sola vez, pero en la línea mutante se realizó tres veces.

Los resultados a esta exposición se muestran en la figura 6. La sobre vivencia de los ímagos disminuye a medida que aumenta la dosis de la luz ultravioleta. Además podemos observar que a la dosis de 0 y 45.44 Joules/m² el comportamiento de ambas líneas es similar, pero a la dosis de 91.1 Joules/m² la sobrevivencia de la línea mutante decae dramáticamente. A la dosis de 136.65 Joules/m² los ímagos no emergieron en la línea mutante, mientras que en la línea parental emergió aproximadamente el 40% de la población (figura 6 y 7).

Por otra parte, se observó que el desarrollo de las larvas a adultos es lento y hay defectos cuticulares en la zona dorsal del abdomen. Estos defectos en la cutícula son más dramáticos conforme se aumenta la dosis de la luz ultravioleta. La línea mutante presenta mayores defectos cuticulares que en la línea parental, además que el fenotipo en la mutante a 91.1 J/m² de exposición son similares a la línea parental a la dosis de 136.65 J/m² (figura 7).

Interacción genética entre *Dmp62* y *haywire*

Se realizaron cruzas entre el alelo *Dmp62 l(2)12329* y 2 alelos de *haywire* (*nc²* y *rv⁴*). Se dejó ovipositar 134 embriones, de los cuales únicamente se realizó el análisis a los ímagos con el siguiente fenotipo (+/+; *Dmp62*/+; *nc²* /+) para una cruce. De esta interacción genética se obtuvieron 19 moscas, 10 hembras y 9 machos. De los cuales, únicamente se pudo observar la fusión del abdomen en una hembra, pero esta frecuencia es similar a la espontánea en la línea mutante de *Dmp62*. El análisis de la otra cruce entre *Dmp62*/CyO y *rv4/TM3* el fenotipo fue silvestre.

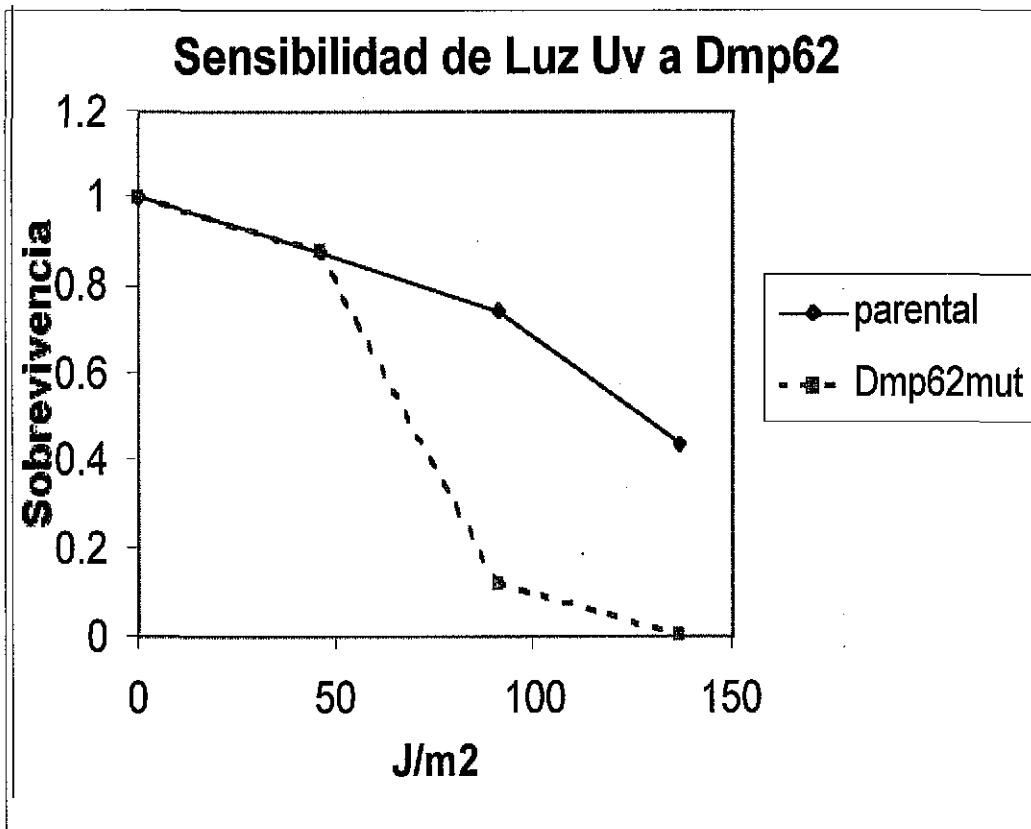


Figura 6. Sensibilidad a dímeros de timina en la línea 12329 y línea parental. *Dmp62^{mut}* es la línea con la inserción del elemento *PI (2)(12329)*.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

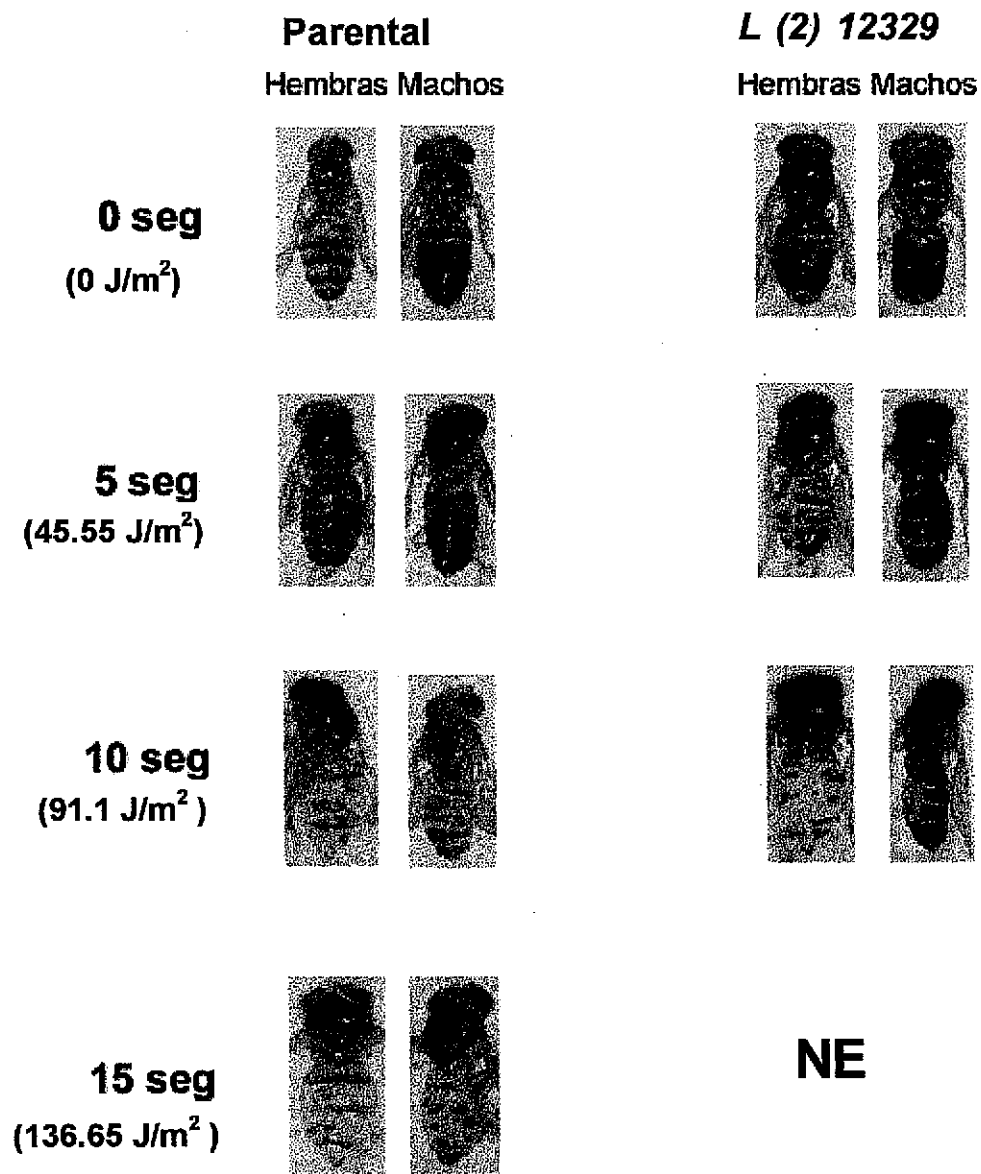


Figura 7. Defectos cuticulares en ímagos por la exposición a luz Ultravioleta. La línea parental son las dos primeras columnas mientras que la línea mutante *l(2) 12329* son las dos últimas columnas. NE: no emergieron.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Caracterización molecular de p62

Se decidió rastrear el nivel de síntesis de *Dmp62* a lo largo del desarrollo de *Drosophila*. Para ello se utilizó la línea silvestre OreR y se extrajo RNA así como también proteínas.

Al análisis de la expresión del gene se realizó mediante un ensayo de RT-PCR. La amplificación abarcó la región 3'. La figura 8 muestra que este gene se expresa a lo largo del todo el desarrollo. Pero hay una mayor cantidad de mensajero en embriones tardíos (figura 8 A carril 3). De una forma muy notable hay una mayor cantidad de mRNA de *Dmp62* en los machos (figura 8 A carril 9). Como control de cargado de cDNA se empleó el gene RP49, que es un gene ribosomal constitutivo.

Para observar el nivel de síntesis de la proteína *Dmp62*, se decidió utilizar un ensayo de tipo Western blot a lo largo del desarrollo con las mismas ventanas que para el ensayo de RT-PCR. Los resultados muestran que hay dos isoformas de la proteína en el estadio embrionario. La síntesis preferencial es una isoforma de menor migración a comparación de la isoforma de mayor migración. Cuando eclosiona el embrión a larva del primer estadio la proteína de mayor peso molecular disminuye, mientras que se mantienen los niveles de la isoforma de mayor migración. Hay un incremento en la cantidad de esta isoforma en larvas de tercer estadio y en pupa. En las hembras disminuye, mientras que en los machos hay una mayor cantidad.

La expresión de dos posibles isoformas de la proteína *Dmp62*, podría deberse a un splicing alternativo en sus últimos exones. Para esto se amplificó la región codificante mediante un ensayo de RT-PCR que abarca desde 125 pb río abajo a partir del ATG de inicio de la traducción hasta abarcar completamente el último exón. Posteriormente se digirió el amplificado con la enzima *EcoRI*, que se localizó cercano a los dos últimos exones (figura 9B). De existir un splicing alternativo el tamaño del fragmento de los últimos exones variarían 175 pb o 125 pb, de no existir splicing alternativo el fragmento sería de 419 pb (figura 9B). En la Figura 9A, se muestra que con éste ensayo no existe un splicing alternativo a lo largo del desarrollo, ya que se observaron 2 fragmentos, uno de 1629 pb y otro de 419 pb

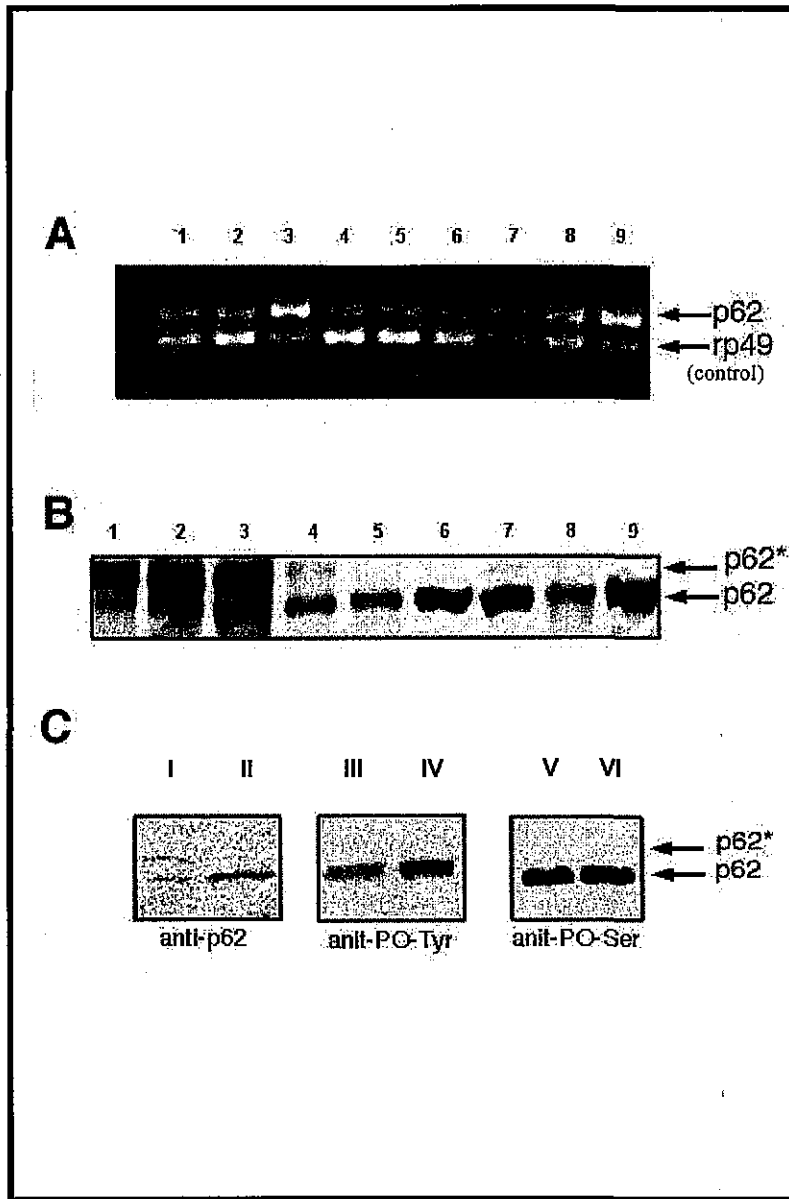


Fig 8. Panel A. Analisis del mRNA de Dmp62 mediante RT-PCR, embriones 0-8 hrs (1), embriones 8-16 hrs (2), embriones 16-24 hrs (3), larvas primer estadio (4), larvas segundo estadio (5), larvas tercer estadio (6), pupa (7), hembras (8), machos (9). Panel B, análisis de la proteína Dmp62 mediante Western Blot, embriones 0-8 hrs (1), embriones 8-16 hrs (2), embriones 16-24 hrs (3), larvas primer estadio (4), larvas segundo estadio (5), larvas tercer estadio (6), pupa (7), hembras (8), machos (9). Panel C, inmunoprecipitación de p62, panel I y II anti-p62, panel III y IV, anti-fosfo tirosinas, panel V y VI, anticuerpo anti-fosfoserinas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

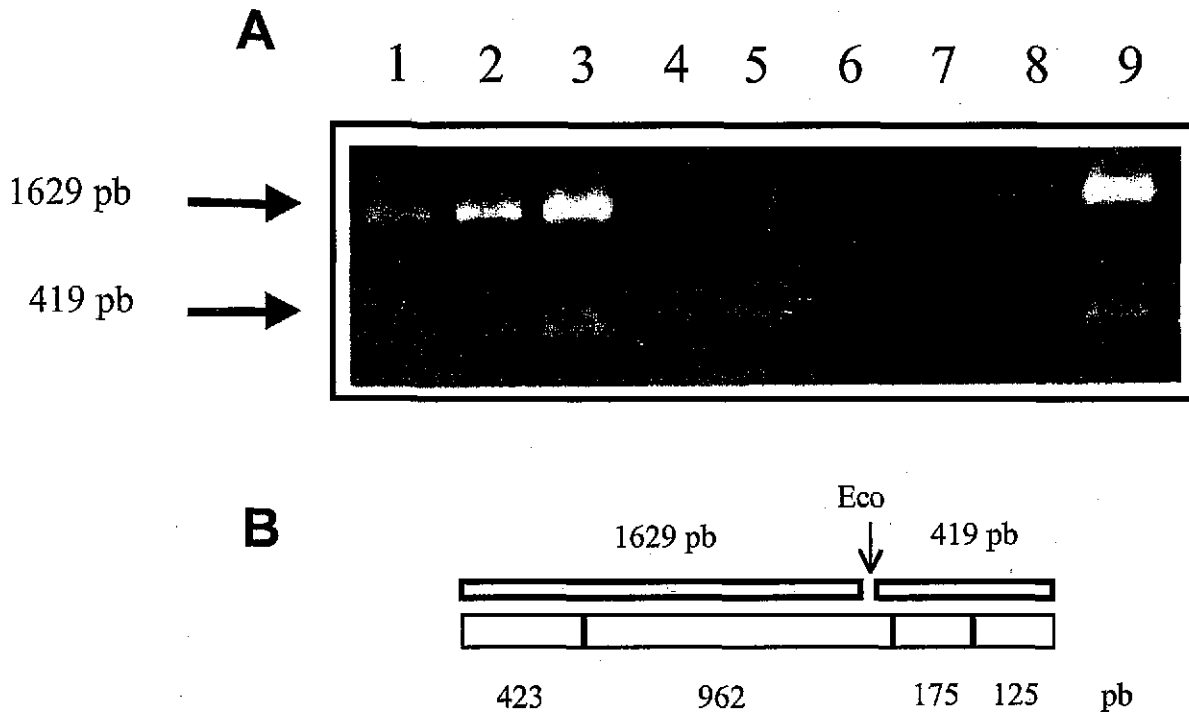


Figura 9: Análisis por RT-PCR si existe splicing alternativo en el mensajero de Dmp62. A: Fragmento de amplificación digeridos con EcoRI y visualizados mediante una electroforesis en gel de agarosa. B: Esquema de los fragmentos obtenidos por la digestión por EcoRI. Carril 1: embriones de 0-8 hrs; carril 2: embriones de 8-16 hrs; carril 3: embriones de 16-24 hrs; carril 4: larvas primer estadio; carril 5: larvas segundo estadio; carril 6: larvas tercer estadio; carril 7: pupas; carril 8: hembras; carril 9: machos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Al no detectar un splicing alternativo que explicara la presencia de las dos isoformas de *Dmp62*, se decidió analizar si existían modificaciones postraduccionales. Se realizó una inmunoprecipitación de *Dmp62* y se reveló mediante un western blot con anticuerpos anti-p62, anti-fosfoserinas y anti-fosfotirosinas. En la inmunoprecipitación y revelado con el anti-p62 se observó la presencia de dos bandas en extractos de la etapa embrionaria (figura 8C I) y de una sola banda en extractos de adultos (figura 8C II). Cuando se incubó con el anticuerpo anti-fosfotirosinas se detectó que en los extractos embrionarios y adultos la proteína se encontraba fosforilada, pero esta correspondía a la forma de mayor migración (figura 8C III y IV). Lo mismo se observó cuando se reveló al emplear el anticuerpo anti-fosfoserinas, en ambos extractos se encontraban fosforilados y la forma de mayor migración se encontraba fosforilada (figura 8C V y VI).

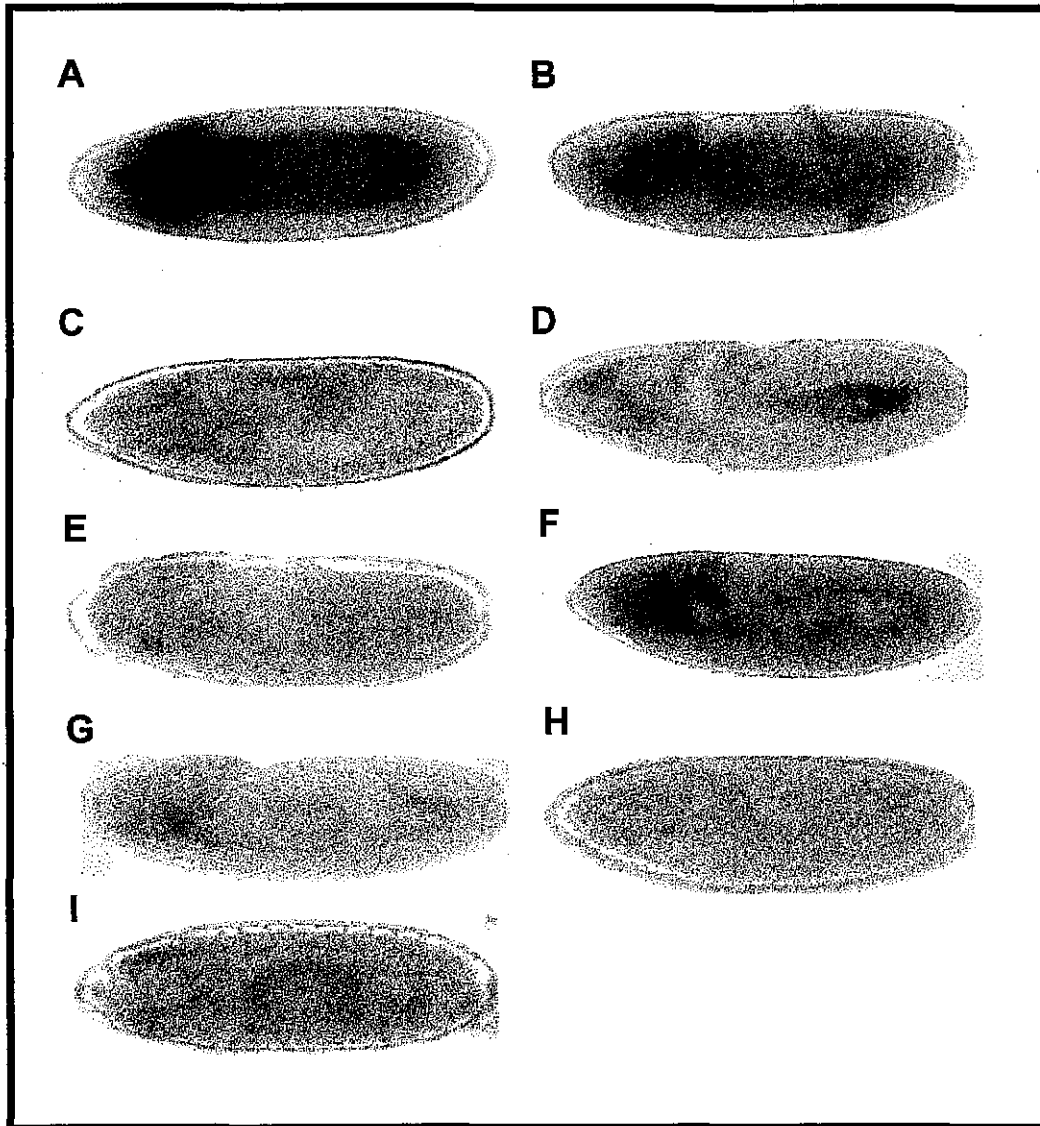
Detección de la expresión de *Dmp62* en adultos.

Se empleó la línea mutante de *Dmp62* con el elemento P "enhancer trap" para rastrear de manera indirecta la expresión del gene en los diferentes tejidos de *D. melanogaster*. El gene *lacZ* en este transposon se encuentra en fase de lectura con respecto al promotor, por lo que con un ensayo de β -gal, podemos de manera indirecta detectar la actividad transcripcional del gene *Dmp62*.

La expresión del "enhancer trap" en la fase de blastodermo sincial se observó en dos regiones (figura 11A), en la parte anterior y otra en la posterior. Al inicio de la gastrulación, únicamente se detectó la expresión en la región anterior hasta el surco cefálico (figura 11B). Con el transcurso de la gastrulación, la expresión en la parte posterior cada vez fué más débil, mientras que en la parte anterior del embrión se mantuvo la expresión (figura 11C, D, E, F y G). En el estadio 12-14 (figura H) la expresión es mas notoria en la región anterior, aunque se observaron en grupos de células en todo el embrión. La expresión fue más notoria en el estadio 15 (figura 11 I) la expresión es mayor en la región anterior y en el resto del organismo, aunque no de manera uniforme.

La expresión del enhancer trap en los adultos fue tejido específica (figura 12), ya que en la línea parental no se detectó inicial alguna. En los machos se detectó en la capa exterior del intestino medio. Una de las señales más intensa fue en los testículos (figura 12D), no se detectó en los conductos seminíferos (figura 12A). En las hembras se detectó en el útero (figura 12B) y en el intestino medio (figura 12C). Sorprendentemente se detectó

en un grupo particular de células, que se localizan a lo largo de eje antero -posterior. Este grupo particular de dos hileras de células, se llaman pericardiales. Son células auxiliares en el sistema circulatorio (figura 12E).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 11. Expresión embrionaria del "enhancer trap" de Dmp62.

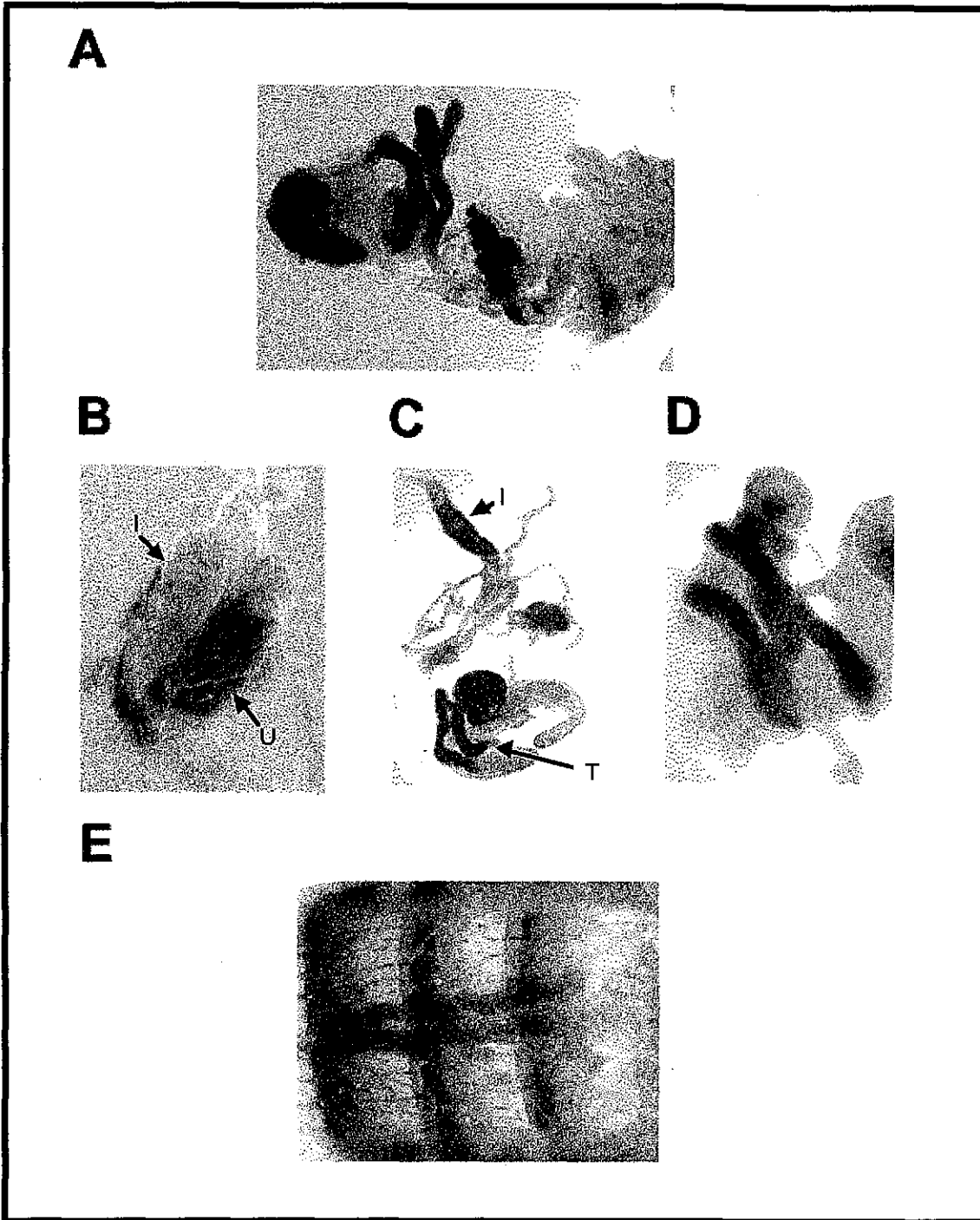


Figura 12. Expresión del "enhancer trap" de Dmp62 en tejidos adultos. A, vista lateral de un abdomen de macho. B, Útero. C, parte superior del intestino y en la parte inferior del testículo. D, testículo. E. Vista ventral del abdomen de las células pericardiales: I: intestino; U, útero; T. testículo.

DISCUSION

El complejo basal de transcripción TFIIH esta conformado por 9 subunidades conservadas a lo largo de la escala evolutiva (de Laat, 1999). Este complejo participa en el mecanismo de reparación de nucleótidos (NER), en la transcripción de los genes por la RNA polimerasa II y en el control del ciclo celular (de Laat, 1999; Friedberg 1996 ; Vandel y Kouzarides, 1999). Mutaciones en algunos de los genes que codifican para las subunidades de TFIIH presentan fenotipos como: una mayor sensibilidad por la luz ultravioleta y/o una disminución en la tasa de transcripción. En humanos se ha observado una correlación entre las mutaciones en estos genes y síndromes, por ejemplo: Cockayne, Ticosidiostrofia, Xeroderma Pigmentosum y Werdnig-Hoffmann (Bürlein *et al* 1997), con mutaciones en varios genes que codifican para el factor TFIIH. A la fecha no se ha tenido reportes de pacientes con alguna mutación en el resto de las subunidades asociada con algún padecimiento. Una de las hipótesis es que posiblemente en estos genes las mutaciones provoquen un cambio conformacional en su estructura, y que el complejo sea muy inestable a estos cambios. A nivel estructural TFIIH forma una dona con una protuberancia muy notable. p52 y p62 conforman un puente entre XPD y XPB, el otro puente lo conforman p44 y p34 entre XPB y el subcomplejo CAK (Schultz *et al* 200; Chang y Kornberg 2000)

Con una organización genética muy sencilla, *tbb1* de levadura está codificado por un solo exon, mientras que en los ratones está codificado por 16 exones (Perez *et al*, 1998). En *Drosophila* la organización genómica de *p62* es más sencilla que en ratón, esta consta de 5 exones y 4 intrones, aunque conserva una gran homología con los humanos y ratones (Tabla 1, Figura 2).

Con la comparación de las secuencias de aminoácidos entre los ortólogos de p62, se detectó una región con un alto grado de conservación (Figura 4 en rojo). Esta región abarca los aminoácidos 289 al 303, esta es una región rica en aminoácidos cargados negativaente (E) y una región en aminoácidos aromáticos (F, W). El concenso: VPNHMTEKEFWTRFF, se encontró en los ortólogos a p62, aunque también esta presente en otras proteínas pero el grado de similitud fue bajo. Entre estas proteínas se encuentran: la Proteína Inmune bactericina de *Pseudomonas aeruginosa* con la siguiente secuencia: **TEREFWVTGFF** (en negritas se denota los aminoácidos conservados), fosfatidil inositol- 4- fostato – 5- cinasa de *A. thaliana* (**KEKFWTRF**); proteína de crecimiento independiente de auxinas de *A. thaliana* (**NMTEEEKEFW**); supresor en el transporte de K⁺ de *Musa acuminata* (**PHNLTEKDF**). Hasta la fecha se desconoce la función de alguna proteína con una región con 4 aminoácidos aromáticos (FW--FF) que está presente en Dmp62.

La presencia de motivos en una proteína ha cobrado importancia, ya que puede reflejar que esas regiones puedan jugar un papel importante en la interacción proteína-proteína o en una función estructural (Tateno *et al*, 1997; Grundy y Bailey 1999; Grundy y Nailor 1999). Se encontraron 6 motivos que se están conservadas en las distintas proteínas. Cabe hacer notar la distribución y la distancia que hay entre cada uno de los motivos (Figura 5). Esto podría reflejar que estas regiones son importantes para la interacción proteína-proteína, ya que el dominio 3 (figura 5 en rojo), en levaduras esta región es importante para la interacción con la proteína Ssl1 (Matsui *et al* 1995). Se conoce un número importante de proteínas que interactúan con p62, como son: E2F-1 (Pearson y Greenbat 1997; Vandel y Kouzarides 1999); VP16; la oncoproteína p53 (Xiao *et al*, 1994) y el receptor de estrógenos α (Chen *et al*, 2000). Hay una región en el N-terminal que presenta dos dominios exclusivos de los metazoarios (figura 5 en verde y amarillo), lo que indique que posiblemente se hayan adquirido funciones adicionales. Aunque para corroborar esto se tendrá que realizar ensayos en el sistema de dos híbridos y mutagénesis sitio dirigida.

Las posibles funciones de estos motivos se desconocen, pero con el análisis computacional se observó que el motivo 1 y 2 podría estar sujeto a glicosilaciones, esta modificación puede descartarse ya que p62 (Tfb1) no porta una secuencia líder que lo ubique en el aparato de Golgi. La fosforilación del motivo 1 y 4 puede ser posible. Lo que se conoce es que la proteína p62 de *Drosophila* presenta un motivo consenso de fosforilación para cdc2 (SPEGK aminoácidos 53 al 57) que está contenido en el motivo 5 y éste motivo está repetido únicamente en los metazoarios superiores (Fisher *et al*, 1992, Long *et al*, 1998). Esta fosforilación se observó en los inmunoprecipitados de extractos embrionarios y la etapa adulta, lo más sorprendente que esta fosforilación está dada en los residuos de serina y tirosina y únicamente en la forma de mayor migración se observó esta fosforilación. Aunque no se descarta una posible glicosilación o miristoilización.

Este es el primer indicio de que hay residuos fosforilados en Dmp62 *Drosophila*. Hay reportes que en humanos p62 tiene un ciclo de fosforilación – defosforilación de acuerdo a la etapa del ciclo celular, y que es llevado por cdc2/cdk2. En la mitosis se encuentra fosforilado p62 y en la interfase se encuentra defosforilada. Esto se correlaciona con un decremento en el nivel de transcripción por parte de la RNA polimerasa II durante la mitosis. Este no es el único factor fosforilado, también lo está el complejo TFIID. Este mecanismo también es utilizado para inactivar la expresión de los promotores de la RNA polimerasa I y II. Posiblemente esta fosforilación en p62 de *Drosophila* sea parte del mecanismo muy fino de

regulación postraduccional por presentar dos residuos fosforilables (Ser y Tyr). Aunque falta por discernir en que región de la proteína están localizados estos residuos fosforilados.

Por otra parte la función de este gene en un organismo metazoario no se ha descrito. En levadura se tienen reportes que su homólogo *ffb1* es letal en una mutante nula en condición homociga. La mutante por el elemento P es letal muy temprana en la embriogénesis en los individuos homocigos, ya que únicamente se recuperan adultos con el fenotipo del cromosoma balanceador (alas CyO). Esto habla de la importancia que tiene este gene para la viabilidad del organismo tanto en levaduras como para *Drosophila*.

En la mutante en el gene *ffb1* es sensible a la luz ultravioleta y se propone que esta sensibilidad es por un déficit en el mecanismo de reparación vía NER. En *Drosophila* esta mutante es sensible en condición heterociga a la exposición de luz ultravioleta y más sensible que las mutantes homocigas para *haywire* (XPB) de *Drosophila* (tesis doctoral Carlos Merino). Esto muestra que *p62* puede participar en la vía de reparación tipo NER como parte del complejo TFIIH. Ya que estudios preliminares mediante co-inmunoprecipitaciones en condiciones nativas con un anticuerpo α -p62, se detectó la presencia de la proteína Haywire (anticuerpo donado por Carlos Merino). Falta por corroborar estos datos preliminares, pero marca un fuerte indicio que Dmp62 y Haywire forman parte de TFIIH en *Drosophila*, hasta hoy no descrito funcionalmente y que actúan en la reparación al daño por luz ultravioleta mediante NER.

No solamente se observó que en esta mutante hay una mayor sensibilidad por la luz ultravioleta, posiblemente haya un déficit a nivel transcripcional de las células encargadas de la formación de la cutícula del abdomen. Otra posibilidad es que el efecto no sea a nivel transcripcional, sino que se deba a la muerte de este grupo celular por el daño excesivo en el DNA (Figura 7).

El análisis de la expresión de este gene a lo largo del desarrollo abarcó ventanas muy precisas, la expresión de *Dmp62* a lo largo de todo el desarrollo (Fig 8A). Aunque hay una mayor expresión en embriones tardíos y en machos. Esta correlación también está presente en ratones y humanos, ya que en estos organismos hay una mayor expresión en los testículos. En un análisis indirecto de la expresión del gene, se observó una mayor expresión, en los testículos pero no los ovarios (Figura 11). Esto puede sugerir un papel en la espermatogénesis, por requerirse en ese tejido de una alta actividad transcripcional, pero al no encontrarse en los ovarios, abre un campo importante para elucidar la función en este tejido. Aunque hay que hacer notar, que el "enhancer trap" no refleja la expresión en todos los

tejidos, para corroborar este dato será necesario hacer la detección del mRNA de Dmp62 mediante un ensayo de hibridación *in situ*.

Por otra parte, la expresión de dos isoformas de Dmp62 se observó durante el desarrollo. En la etapa embrionaria están presentes las dos isoformas, pero con la eclosión a larva de primer estadio desaparece la isoforma de menor migración (figura 8A). A nivel molecular esto hace más complicada la función de p62 en el complejo TFIIH, ya que esto nos indicaría que hay dos formas de TFIIH, una con la p62 no fosforilado y otra con p62 fosforilado. Esto indica que el papel de la fosforilación en p62 no sería para una inactivación transcripcional, ya que en la forma adulta se encuentra fosforilado p62. Estos datos abre un campo de estudio más profundo. Se propone la existencia del core-TFIIH y TFIK, con las dos isoformas en Dmp62 se duplica el nivel de complejidad en TFIIH. El papel que desempeñaría cada una de estos subcomplejos sería en teoría distintos. En humanos la forma fosforilada de p62 esta asociada a la forma inactiva transcripcionalmente de TFIH, en *Drosophila* en el estadio embrionario estan presentes ambas formas, pero en adultos esta presente en su gran mayoría la forma fosforilada. ¿Cómo es la actividad bioquímica de TFIH con la subunidad de p62 fosforilada?, es una de las preguntas interesantes a responder.

En la etapa adulta la expresión de este gene se localizó en el intestino (Figura 12A), en el ovario y en los testículos. Pero de manera muy particular también se encontró en las células pericardiales (Figura 12 E). Existen pocos reportes de marcadores moleculares para este grupo celular. Se han tenido reportes a cerca de la laminina. Este es un dato interesante ya que no se habia detectado la expresión mayoritaria de un gene del complejo basal de transcripción TFIH en células pericardiales.

Se ha detectado en *Drosophila* que la proteína p62 se encuentra dispersa en las primeras etapas del desarrollo embrionario (Reynaud *et al*, 1999) En humanos se ha detectado la presencia de p62 en el núcleo, con énfasis en una estructura particular, los Cuerpos de Cajal (Grande *et al* 1997; Gali 2000). Además de p62 se encuentran otras proteínas del complejo TFIH como son: CDK7, ciclina H y Mat1 (Jordan *et al*, 2000). Se ha detectado proteínas encargadas en la transcripción de snRNA (Schul *et al*, 1998), aunque estos cuerpos fueron descritos hace mas de 100 años no se conoce a detalle su función. Es interesante saber si Dmp62 esta presente en estos cuerpos de Cajal y también ¿Cuál de las subunidades de Dmp62 estarían presentes en estos cuerpos?.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

CONCLUSIONES

En *Drosophila melanogaster* se aisló un cDNA que codifica para *Dmp62*, que en levadura y humanos forma parte del complejo basal de transcripción TFIID.

Entre los ortólogos de p62 se encontró 6 motivos que sugieren una relevancia bioquímica y funcional.

La mutante heterociga de *Dmp62* es sensible a la luz ultravioleta, esto sugiere que *Dmp62* forma parte del mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos.

No hay interacción genética entre *haywire* y *Dmp62*.

La expresión de *Dmp62* se observó a lo largo de todo el desarrollo, pero con una mayor acumulación en los embriones tardíos y machos.

En la etapa embrionaria temprana, la expresión del "enhancer trap" en *Dmp62* se observó en la región anterior como en la posterior. En la embriogénesis media, la expresión es en la región anterior y en la embriogénesis tardía su expresión es homogénea.

En los machos adultos el "enhancer trap" se expresó en: los intestinos, testículos y células pericardiales. En las hembras se observó en los intestinos, útero y células pericardiales.

Este es el primer reporte de la expresión de *Dmp62* en las células pericardiales.

La proteína *Dmp62* se detectó en todo el desarrollo. Este es el primer reporte donde se describen dos isoformas para *Dmp62*. Las dos isoformas están presentes en la etapa embrionaria, mientras que en la etapa adulta esta presente la isoforma de mayor migración (fosforilada).

La proteína *Dmp62* está fosforilada en los residuos de tirosina y serina. Este es el primer reporte que se observa estos residuos fosforilados de *Dmp62*.

PERSPECTIVAS

Determinar la velocidad en la remoción de los dímeros de timina del DNA de la línea mutante de *Dmp62*.

Corroborar con anticuerpos anti-p62 la localización celular de *Dmp62* en embriones y adultos.

Corroborar que *Dmp62* es parte de el complejo TFIIH con ensayos de coimmunoprecipitación.

Identificar la etapa de la embriogenesis que es letal en la línea mutante homociga con el empleo de un cromosoma balanceador que porta a el gene de la *GFP* (proteina verde fluorescente)

Elaborar mutantes puntuales en *Dmp62* para un análisis genético con genes que codifican para las subunidades del complejo TFIIH.

Realizar ensayos de mutaciones sitio dirigidas para cada uno de los motivos y discernir su papel en el complejo TFIIH.

Referencias

- Austin R.J. y Biggin M.D. (1996) Purification of the *Drosophila* RNA polymerase II general transcription factors. *Proc Natl Acad. Sci. USA.* **93**: 5788-5792.
- Batty D.P. y R.D. Wood (2000) Damage recognition in nucleotide excision repair of DNA. *Gene.* **241**: 193-204.
- Bürlein L., Seroz T., Minjou P., Lefebvre S., Burlat P., Munnich A., Pequignot E.V., Egly J.-M. y Melki J. (1997) The gene encoding p44, a subunit of a transcription factor TFIIH, is involved in large-scale deletions associated with Werdnig-Hoffmann disease. *Am J. Hum Genet.* **60**: 72-79.
- Buschta-Hedayata N., T. Buterin, M.T. Hess, M. Missura y H. Naegeli (1999) recognition of nonhybridizing base pairs during nucleotide excision repair of DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**: 6090-6095.
- Chen D., T. Riedl, E. Washbrook, P. E. Pace, R. C. Coombes, J.-M. Egly y S. Ali (2000) Activation of estrogen receptor α by S118 phosphorylation involves a ligand-dependent interaction with TFIIH and participation of CDK7. *Molecular Cell.* **6**:127-137.
- Cordonnier A.M., A.R. Lehmann y R.P.P. Fuchs (1999) Impaired translesion synthesis in Xeroderma pigmentosum Variant extracts. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 2206-2211.
- Corpet F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* **16**(22):10881-90
- Drapkin R., J.T. Reardon, A. Ansari, J.C. Huang, L. Zawal, K. Ahn, A. Sancar y D. Reinberg (1994) Dual role of TFIIH in DNA excision repair and in transcription by RNA polymerase II. *Nature.* **368**: 769-772.
- Dusenbery R.L. y P.D. Smith (1996) Cellular response to DNA damage in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res. DNA Repair.* **364**: 133-145.
- Elfring L.K., C. Daniel, O. Papoulias, R. Deuring, M. Sarte, S. Moseley, S.J. Beek, W.R. Waldrip, G. Daubresse, A. DePace, J.A. Kennison y J.W. Tamkun (1998) Genetic analysis of *brahma*: The *Drosophila* homolog of the yeast chromatin remodeling factor SWI2/SNF2. *Genetics* **148**: 251-265.
- Evans E., J. Fellows, A. Coffey y R. D. Wood (1997) Open complex formation around a lesion during nucleotide excision repair provides a structure for cleavage by human XPG protein. *EMBO J.* **16** (3): 625-638.
- Feaver W.J., J. Q. Svejstrup, L. Bardwell, A.J. Bardwell, S. Buratowski, K.D. Gulyas, T.F. Donahue, E.C. Friedberg y R.D. Kornberg (1993) Dual roles of a multiprotein complex from *S. cerevisiae* in transcription and DNA repair. *Cell.* **75**: 1379-1387.
- Fisher L., M. Gerard, C. Chalut, Y. Lutz, S. Humbert, M. Kanno, P. Chambon y J.-M. Egly. (1992) Cloning of the 62-Kilodalton component of basic transcription factor BTF2. *Science* **257**: 1392-1395.
- Franklin W.A., P.W. Doetsch y W.A. Haseltine (1985) Structural determination of the ultraviolet light-induced thymine-cytosine pyrimidine-pyrimidone (6-4) photoproduct. *Nucleic Acid Res.* **13**(14): 5317-5325.
- Friedberg E.C. (1996) Relationship between DNA repair and transcription. *Ann. Rev. Biochem.* **65**: 15-42.
- Gall J.G. (2000) Cajal Bodies: The first 100 years. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**: 273-300.
- Gleadi O., W.J. Feaver y R.D. Kornberg (1992) Cloning of a subunit of yeast RNA polymerase II transcription Factor b and CTD kinase. *Science* **257**: 1389-1392.
- Grande M.A., van der Kraan I., de Jong L. y van Driel R. (1997) Nuclear distribution of transcription factors in relation to sites of transcription and RNA polymerase II. *J Cell Sci.* **110**: 1781-1791.

- Grundy WN y Bailey TL (1999) Family pairwise search with embedded motif models. *Bioinformatics*. **15**(6): 463-470.
- Grundy WN y Naylor GJP (1999) Phylogenetic inference from conserved sites alignments. *J. Exp. Zoo (Mol. Dev. Evol)* **285**: 128-139.
- Gumán E y J T Lis (1999) Transcription factor TFIIH is required for promoter melting in vivo. *Mol. Cell Biol.* **19**(8):5652-5658.
- Guzder S N; H. Qiu; C H Sommers; P. Sung; L Prakash y S. Prakash (1994) DNA repair gene RAD3 of *S. cerevisiae* is essential for transcription by RNA polymerase II. *Nature* **367**: 91-94.
- Hampsey M (1998) Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62** (2): 465-503.
- Hara R, C.P. Selby, M. Liu, D.H. Princes y A. Sancar (1999) Human transcription release factor 2 dissociates RNA polymerase I and II stalled at a cyclobutane thymine dimer. *J. Biol. Chem.* **274** (35): 24779-24786.
- He Z., L.A. Henricksen, M.S. Wold y C. J. Ingles (1995) RPA involvement in the damage-recognition and incision steps of nucleotide excision repair. *Nature*. **374**: 566-569.
- Henning K. A., L. Li, N. Iyer, L.D. McDaniel, M. S. Reagan, R. Legerski, R. A. Schultz, M. Stefanini, A. R. Lehmann, L. V. Mayne y E. C. Friedberg (1995) The Cockayne Syndrome group A gene repeat protein that interacts with CSB protein and subunit of RNA polymerase II TFIIH. *Cell*. **82**: 555-564.
- Hermanson-Miller IL y JJ Turchi (2002) Strand-Specific Binding of RPA and XPA to Damaged Duplex DNA. *Biochemistry*. **41**(7): 2402-8
- Holstege F C P; D. Tantin; M. Carey; P.C. van der Vliet y H.T.M. Timmers (1995) The requirement for the basal transcription factor TFIIE is determined by the helical stability of promoter DNA. *EMBO J.* **14**: 810-819.
- Holstege F.C.P ; P.C. van der Vliet y H.T.M. Timmers (1996) Opening of an RNA polymerase II promoter occurs in two distinct steps and requires the basal transcription factors TFIIE and TFIIH. *EMBO J.* **15**: 1666-1677.
- Holstege F C P; U. Fiedler y H.T.M. Timmers (1997) Three transitions in the RNA polymerase II transcription complex during initiation. *EMBO J.* **16**: 7468-7480.
- Houtsmuller A. B., S. Rademakers, A.L. Nigg, D. Hoogstraten, J. H.J. Hoeljmackers y Win Vermeulen (1999) Action of DNA repair Endonuclease ERCC1/XPF in living cells. *Science*. **284**: 958-961.
- Iyer N., M.S. Reagan, K.-J. Wu, B. Canagarajah y E.C. Friedberg (1996) Interaction involving the human RNA polymerase II transcription/nucleotide excision repair complex TFIIH, the nucleotide excision repair protein XPG, and Cockayne Syndrome group B (CSB) protein. *Biochemistry*. **35**: 2157-2167.
- Jordan P, Cunha C y Carmo-Fonseca M (1997) The Cdk7-Cyclin-MAT1 complex associated with TFIIH is localized in coiled bodies. *Mol Biol Cell*. **8**: 1207-1217.
- Kolpashchikov DM, SN Khodyreva, DY Khlimankov, MS Wold, A Favre y OI Lavrik (2001) Polarity of human replication protein A binding to DNA. *Nucleic Acids Res.* **29**(2):373-
- de Laat WL, E Appeldoorn, K Sugawara, E Weterings, NG Jaspers y JHJ Hoeljmackers (1998) DNA-binding polarity of human replication protein A positions nucleases in nucleotide excision repair. *Genes Develop.* **12**(16):2598-609
- de Laat L., W., N.G.J. Jaspers y J.H.J. Hoeljmackers (1999) Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Develop.* **13**: 768-785.
- Laemli U K (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**:680-685.

- Lee DK, Duan HO y Chang C (2000) From androgen receptor to the general transcription factor TFIID. *J. Biol. Chem.* **275**: 9308-9313.
- Lehmann, A. R. (1995) Nucleotide excision repair and the link with transcription. *Trends Biochem. Sci.* **20** (237): 402-405.
- Lévillard T., L. Andera, N. Bissonnette, L. Schaeffer, L. Bracco, J.-M. Egly y B. Wasyluk (1996) Functional interactions between p53 and the TFIID complex are affected by tumor-associated mutations. *EMBO J.* **15**: 1615-1624.
- Long J.J., A. Leresche, R. W. Kriwacki y J.M. Gottesfeld (1998) Repression of TFIID transcription activity and TFIID-Associated cdk7 kinase activity at mitosis. *Mol. Cell. Biol.* **18** (3): 1467-1476.
- Masutani C., M. Araki, A. Yamada, R. Kusumoto, T. Noylomi, T. Maekawa, S. Iwai y F. Hanaoka (1999) Xeroderma pigmentosum variant (XP-V) correcting protein from HeLa cells has a thymine dimers bypass DNA polymerase activity. *EMBO J.* **18**: 3491-3501.
- Matsuda T., M. Saijo, I. Kuraoka, T. Kobayashi, Y. Nakatsu, A. Nagai, T. Enjoji, C. Masutani, K. Sugawara, F. Hanaoka, A. Yasui y K. Tanaka (1995) DNA repair protein XPA binds replication protein A (RPA). *J. Biol. Chem.* **270**: 4152-4157.
- Matsui P., J. De Paulo y S. Buratowski (1995) An interaction between the Tfb1 and Ssl1 subunits of yeast TFIID correlates with DNA repair activity. *Nucleic Acids Res.* **23** (5): 767-772.
- Melendy T y B Stillman (1993) An interaction between replication protein A and SV40 T antigen appears essential for primosome assembly during SV40 DNA replication. *J Biol Chem.* **268**: 3389-95.
- Mounkes L.C., R.S. Jones, B.-C Liang, W. Gelbart y M.T. Fuller (1992) A Drosophila model for Xeroderma pigmentosum and Cockayne's syndrome: *haywire* encodes the fly homolog of ERCC3, a human excision repair gene. *Cell.* **71**: 925-937.
- Mounkes L.C. y M. T. Fuller (1999) Molecular characterization of mutant alleles of the DNA repair/basal transcription factor *haywire*/ERCC3 in Drosophila. *Genetics.* **152**: 291-297.
- Nocentini S., F. Coin, M. Saijo, K. Tanaka y J-M Egly. (1997) DNA damage recognition by XPA protein promotes efficient recruitment of transcription factor II H. *J. Biol. Chem.* **272** (37): 22991-22994.
- Öğrünç M., D.F. Becker, S.W. Ragsdale y A. Sancar (1998) Nucleotide excision repair in the third kingdom. *J. Bacteriol.* **180** (21): 5796-5798.
- Ohkuma Y. y R.G. Roeder (1994) regulation of TFIID ATPase and kinase activities by TFIIE during active initiation complex formation. *Nature.* **368**: 160-163.
- Ohkuma Y. (1997) Multiple functions of general transcription factors TFIIE y TFIID in transcription: possible points of regulation by Trans-acting factors. *J. Biochem.* **122**: 481-489.
- Orphanides G., T. Lagrange y D. Reinber (1996) The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Develop.* **10**: 2657-2683.
- Park C.-H., D. Mu, J.T. Reardon y A. Sancar (1995) The general transcription-repair TFIID is recruited to the excision repair complex by the XPA protein independent of the TFIIE transcription factor. *J. Biol. Chem.* **270**: 4896-4902.
- Pearson A y Greenblatt J (1997) Modular organization of the E2F1 activation domain and its general transcription factors TBP and TFIID. *Oncogene.* **15**: 2643-2658.
- Perez C., J. Aurilio, T. Seroz, J-M Egly. (1998) Genomic organization and promoter characterization of the mouse and human genes encoding p62 subunit of the transcription/DNA repair factor TFIID. *Gene* **213**: 73-82
- Reynaud E, Lomeli H, Vázquez M Y Zurita M (1999) The Drosophila melanogaster homologue of the Xeroderma pigmentosum D gene product is located in Euchromatic regions and has a dynamic response to UV light-induced lesions in polytene chromosomes. *Mol Biol Cell.* **10**:1191-1203.

Ryong H. J., V. Moncollin, W. Vermeulen, T. Seroz, H. van Vuuren, J.H.J. Hoeijmakers y J.M. Egly (1996) A 3' → 5' XPB helicase defect in repair/transcription factor TFIIH of Xeroderma pigmentosum group B affects both DNA repair and transcription. *J. Biol. Chem.* **271** (27) 15898-15904.

Sancar A. y G.B. Sancar (1988) DNA repair enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* **57**: 29-67.

Santagati F, Botta E, Stefanini M y Pedrini AM (2001) different dynamics in nuclear entry of subunits of the repair/transcription factor TFIIH. *Nucleic Acid Res.* **29**: 1574-1581.

Schul W, van Driel R y de Jong L (1998) Coiled bodies and U2 sn RNA genes adjacent to coiled bodies are enriched in factors required for snRNA transcription. *Mol Biol Cell.* **9**: 1025-1036.

Schultz P, fribourg S, Poterszman A, Mallouh V, Mórás D, Egly J-M (2000) Molecular structure of human TFIIH. *Cell* **102**: 599-607.

Selby C. y A. Sancar (1997) Human transcription-repair coupling factor CSB/ERCC6 is a DNA-stimulated ATPase but is not a helicase and does not disrupt the ternary transcription complex of stalled RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* **272**: 1885-1890.

Spradling AC, D Stern, A Beaton, EJ Rhem, T Lavery, N mozden, S Misra y GM Rubin (1999) The berkley Drosophila Genome Project gene disruption project: Single P-element insertions mutating 25% of vital Drosophila genes. *Genetics.* **153**: 135-177.

Sung P., S.N. Guzder, L. Prakash Y S. Prakash (1996) Reconstitution of TFIIH and requirement of its DNA helicase subunits, Rad3 and Rad25, in the incision step of nucleotide excision repair. *J. Biol Chem.* **271** (18): 10821-10826.

Sweder KS, Chun R, Mori T y Hanawalt PC (1996) DNA repair deficiencies associated with mutations in genes encoding subunits of transcription initiation factor TFIIH in yeast. *Nucleic Acid Res.* **24**: 1540-1546.

Tateno Y, Ikeo K, Imanishi T, Watanabe H, Endo T, Yamaguchi Y, Suzuki Y, Takahashi K, Tsunoyama K, Kawai M, Kawanishi Y, Naitou K y Gojobori T (1997) Evolutionary motif and its biological and structural significance. *J. Mol Evol.* **44**(suppl 1):S38-S43.

Sweder K. S. R. Chun, T. Mori y P. C. hanawalt (1996) DNA repair deficiencies associated with mutations in genes encoding subunits of transcription initiation factor TFIIH in yeast. *Nucleic Acid Res.* **24**(8): 1540-1546.

Tantin D., A. Kansal y M. Carey (1997) Recruitment of putative transcription-repair coupling factor CSB/ERCC6 to RNA polymerase II elongation complexes. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 6803-6814.

Tantin D. (1998) RNA polymerase II elongation complexes containing the Cockayne Syndrome Group B protein interact with a molecular complex containing the transcription factor IIH components Xeroderma Pigmentosum B and p62. *J. Biol. Chem.* **273**: 27794-27799.

Tu Y., S. Bates y G. P. Pfeifer (1998) The transcription-repair coupling factor CSA is required for efficient repair only during elongation stages of RNA polymerase II transcription. *Mutat. Res.* **400**: 143-151.

Vandel L. Y T. Kouzarides (1999) Residues phosphorylated by TFIIH are required for E2F-1 degradation during S-phase. *EMBO J.* **18** (15) 4280-4291.

Wang Z., J:Q. Svejstrup, W.J. Feaver, X. Wu, R.D. Kornberg y E.C. friedberg (1994) Transcription factor b (TFIIH) is required during nucleotide excision repair in yeast. *Nature.* **368**:74-76.

Wang Z., S. Buratowski, J. Q. Svejstrup, W. J. Feaver, X. Wu, R.D. Kornberg, T. F. Donahue y E. C. Friedberg (1995) The yeast TFB1 and SSL1 genes, which encode subunits of transcription factor IIH, are required for Nucleotide Excision repair and RNA polymerase II transcription. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 2288-2293.

Winkler G. S., K. Sugawara, A.P. Eker, W.L. de Laat y J.H.J. Hoeijmakers (2001) Novel functional interactions between nucleotide excision repair DNA repair proteins influencing the enzymatic activities of TFIIH, XPG and ERCC1-XPF. *Biochemistry* **40**: 160-165.

Xiao H., A. Pearson, B. Coulombe, R. Truant, S. Zhang, J. L. Regier, S. J. Triezenberg, D. Reingberg, O. Flores, C. J. Ingles y J. Greenblatt (1994) Binding of basal transcription factor TFIIF to the acidic activation domains VP16 and p53. *Mol. Cell. Biol.* 14(10): 7013-7024.

ANEXO



ELSEVIER

DNA Repair 1 (2002) 359–368

**DNA
REPAIR**

www.elsevier.com/locate/dnarepair

Molecular characterization and developmental expression of the TFIIH factor p62 gene from *Drosophila melanogaster*: effects on the UV light sensitivity of a p62 mutant fly

Juan Castro, Carlos Merino, Mario Zurita*

Department of Genetics and Molecular Physiology, Institute of Biotechnology, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Apdo. Postal 510-3, Morelos 62250, Mexico

Received 15 January 2002; accepted 1 February 2002

Abstract

TFIIH is a multiprotein complex that has a central role in the RNA pol II mediated transcription, in DNA repair and in the control of the cell cycle. Mutations in some components of TFIIH are associated with three hereditary human syndromes: xeroderma pigmentosum (XP), Cockayne syndrome (CS) and trichothiodystrophy (TTD). The p62 protein is a structural component of the TFIIH core and no syndromes have been identified up to date by mutations in this human gene. In this work we report the molecular and genetic characterization of the *Drosophila melanogaster* p62 gene (*Dmp62*). The *Dmp62* gene product shows high identity with its human and mouse homologues. Using computer analysis we identified several common motifs in the p62 proteins from different organisms, suggesting that these motifs could be involved in possible protein–protein interactions within the TFIIH complex or with other transcription and DNA repair factors. The *Dmp62* transcript is expressed at similar levels throughout development, although there is a significant increase of the transcript level during the late embryogenesis and in the adult male. The analysis of a *Drosophila* line with a P-element enhancer trap insertion at the *Dmp62* 5'-UTR that directs the *lac-Z* expression from the *Dmp62* promoter, showed a high level of expression in the gut, the testis and the pericardial cells. A P-element that disrupts the *Dmp62* gene (*Dmp62^{mut}*) produces early embryo lethality in homozygous flies. Heterozygous *Dmp62^{mut}* larvae are more sensitive to UV light irradiation, and those individuals that are able to develop into adults have severe abdominal cuticular damage after UV light irradiation. © 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: TFIIH-mutant; p62; DNA repair; Development

1. Introduction

TFIIH factor has a central role in some of the most fundamental functions of the eukaryotic cell, such as DNA repair, transcription by RNA polymerase II and in the cell cycle control. TFIIH is composed of nine polypeptides that are part of two sub-complex. The

core complex containing five sub-units (XPB, p62, p52, p44 and p34) and the kinase complex containing three additional proteins (Cdk7, CycH and MAT1). The XPD helicase interacts in vitro with either of the two sub-complexes [1]. The TFIIH three-dimensional structure has been recently resolved at low resolution; it forms a ring with a central cavity that seems to interact with the DNA [2,3]. In DNA repair, the core TFIIH functions in nucleotide excision repair (NER) and it has been recently reported that it may also participate in base excision repair (BER) [4,5]. During

* Corresponding author. Tel.: +52-555-622-7659;
fax: +52-7773-172388.
E-mail address: marioz@ibt.unam.mx (M. Zurita).

transcription, TFIIF is involved in the formation of the open complex by the action of its helicase activities and in the RNA pol II elongation. The TFIIF kinase activity phosphorylates the CTD domain of the polymerase allowing the transcription elongation [6–8]. In addition, TFIIF interacts with multiple factors involved in transcription regulation. It has been shown a connection between TFIIF and the mediator, with the *c-myc* activator FBP and the repressor FIR, with the transcription factors EBNA2, HBX, VP16, p53 and with some hormone receptors [9–11].

In the cell cycle control, TFIIF regulates cell division by activating both Cdc2/Cyclin A and Cdc2/Cyclin B complexes. TFIIF also phosphorylates E2F-1 modulating its activity [12,13]. In this direction, it has been shown that a knockout of *MAT1* gene in mice, affects the entrance to the S phase in pre-implantation embryos producing early developmental lethality [14].

Mutations in the helicases XPB and XPD of the TFIIF may produce three hereditary disorders, xeroderma pigmentosum (XP), Cockayne syndrome (CS) and trichothiodystrophy (TTD) [15]. In addition, defects in TFIIF may be involved in the generation of cancer cells [16]. XP patients have sunlight hypersensitivity, high risk of skin cancer and in some cases neurological disorders [17]. TTD patients have the distinguished phenotype of brittle hair, fragile nails, ichthyosis as well as some neurological abnormalities [18]. The CS patients have also problems in the development of the nervous system and show slow post-natal growth [19]. Besides XPB, XPD, p44 another TFIIF protein, has been shown to be involved in the Werdnig–Hoffmann disease and maybe in the spinal muscular atrophy [20,21]. Up to date, there are no reports of human syndromes that results from mutations in other TFIIF components. This might be due because mutations in other TFIIF components produce severe defects during development, causing early embryo lethality.

In yeast, mutations in the p62 gene (*tfb1*) results in intermediate UV light sensitivity and deficiencies in both global NER and in transcription coupled repair (TCR) [22]. Therefore, the molecular and genetic analysis of TFIIF components in model animal systems is relevant for the understanding of its functions during development. In this work, we report the genetic and molecular characterization of the p62 *Drosophila*

homologue gene (*Dmp62*). Sequence analysis of the p62 protein revealed conserved motifs from yeast to humans, while other motifs are only present in some of the p62 orthologues. We characterized a *Drosophila* P-element insertion mutant that affect the *Drosophila melanogaster* p62 (*Dmp62*) gene. The heterozygous flies have higher sensitivity to UV light irradiation, compared to wild type flies. In addition, severe cuticular damage is produced by irradiation of the *Dmp62* mutant when compared with wild type flies.

2. Materials and methods

2.1. *Drosophila* strains

The wild type strain in all experiments was OreR. The *Dmp62* mutant strain (named in the paper as *Dmp62^{mut}*) is an insertion of the $P\{ry[+t7.2] = PZ\}$ transposable element at the cytological position 51A2. The flybase ID is FBgn0010631 and reports the partial sequence of the insertion localized at the 5' end of the first exon of the *Dmp62* gene. This strain was originally named as *l(2)06949* [23], and the genotype is: $P\{ry[+t7.2] = PZ\}l(2)06949[06949]cn[1]/CyO; ry[506]$. The parental strain used as control in the irradiation experiments was $cn[1]/CyO; ry[506]$.

2.2. Recombinant DNA and nucleic acids manipulations

A partial (622 bp) EST-cDNA clone (EST 3527) from the *Drosophila* genome project was used as a probe to screen a Uni-Zap XR Stratagene library (cat no. 937602) prepared with Canton-S 2–14 h embryo poly A+ RNA. Hybridization conditions were 50 °C in 5× SCC, 50% formamide, 5X Denhardt's, 0.5% SDS, 0.5mg/ml salmon sperm DNA with 6×10^5 cpm/ml of the ^{32}P -dCTP labeled probe. After hybridization, the filters were washed in 0.1× SSC, 0.1% SDS at 50 °C. Several clones were identified, the largest clone with an insert of about 2.2 kb encoding for the complete *Dmp62* protein was sequenced. All routine cloning procedures were carried out essentially as previously described [24].

For the RT-PCR experiments, total RNA from embryos (0–8, 8–16, 16–24 h of development), larvae

(first, second and third instar), pupae, males and females were purified following the protocol previously reported in [25]. cDNA was made using the cDNA preparing kit from Amersham Inc., following the supplier recommendations. The amplification reactions were done as follows: 2 μ l of the cDNA was incubated in the presence of the four dNTPs (5 mM), 10 U of Taq polymerase (Boehringer/Roche) and 20 pmol of each of the oligo-primers. For the p62 reactions the primers used were 5'-CGAACGGGATGAATGGAAAG-3' and 5'-CGGACAGCGAAAGGTATAAG-3'. PCR reaction was performed at 95 °C/30 seg, 59 °C/30 seg and 72 °C/2 min. For the *rp49* reactions the primer sequences were 5'-CATCCGCCAGCATAACAG-3' and 5'-CTTCTTGAGGAGACGCC-3'. The reaction conditions for this were the same as the ones used for the *Dmp62* cDNA amplification. All reactions were performed in an Applied Biosystem 2400 thermocycler.

2.3. Sequence analysis

Sequences of the p62 proteins reported to date were pulled using the NCBI BLAST program (<http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>). The sequences analyzed include: *Mus musculus* (CAA05340), *Homo sapiens* (P32780), *Caenorhabditis elegans* (AAB94149), *Arabidopsis thaliana* (CAB71072), *Saccharomyces cerevisiae* (AAA35143), *Schizosaccharomyces pombe* (CAB11039) and *D. melanogaster* (AAF58253). The alignment was performed using the Multaling program (<http://w3.toulouse.inra.fr/multaling.html>). The degree of identity was performed with the Bestfit program from GCG. Motif consensus identification was made using the multiple EM for motif elicitation (MEME) program (<http://w3.toulouse.inra.fr/multaling.html>). The identified motifs were analyzed in the Prosite data to identify putative functions. Phylogenetic tree was performed using the CLUSTAL W algorithm (<http://bimas.dcrn.nih.gov/clustalw.html>).

2.4. β -Galactosidase detection in *Drosophila* embryos and tissues

β -Galactosidase activity in the enhancer trap line (*l(2)06949*) containing the transposable element $P\{ry[+t7.2] = PZ\}$ inserted in the 5' of the *Dmp62* gene was detected using the protocol reported [26].

The embryos and the tissues were visualized in a Nikon ECLIPSE E600 light microscope.

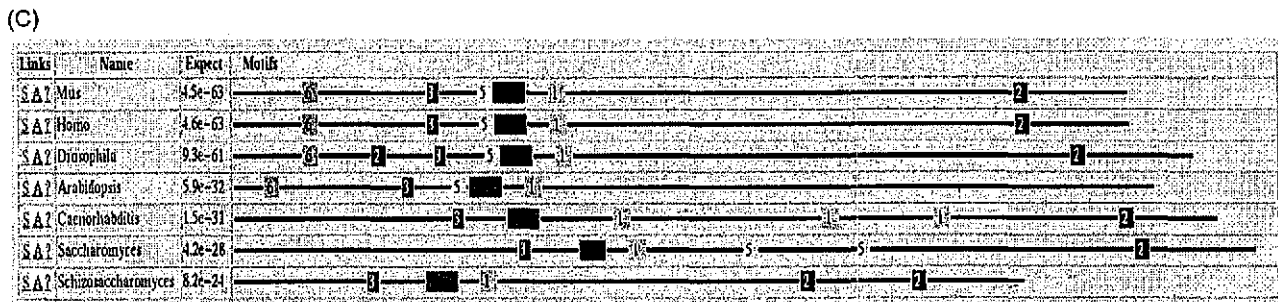
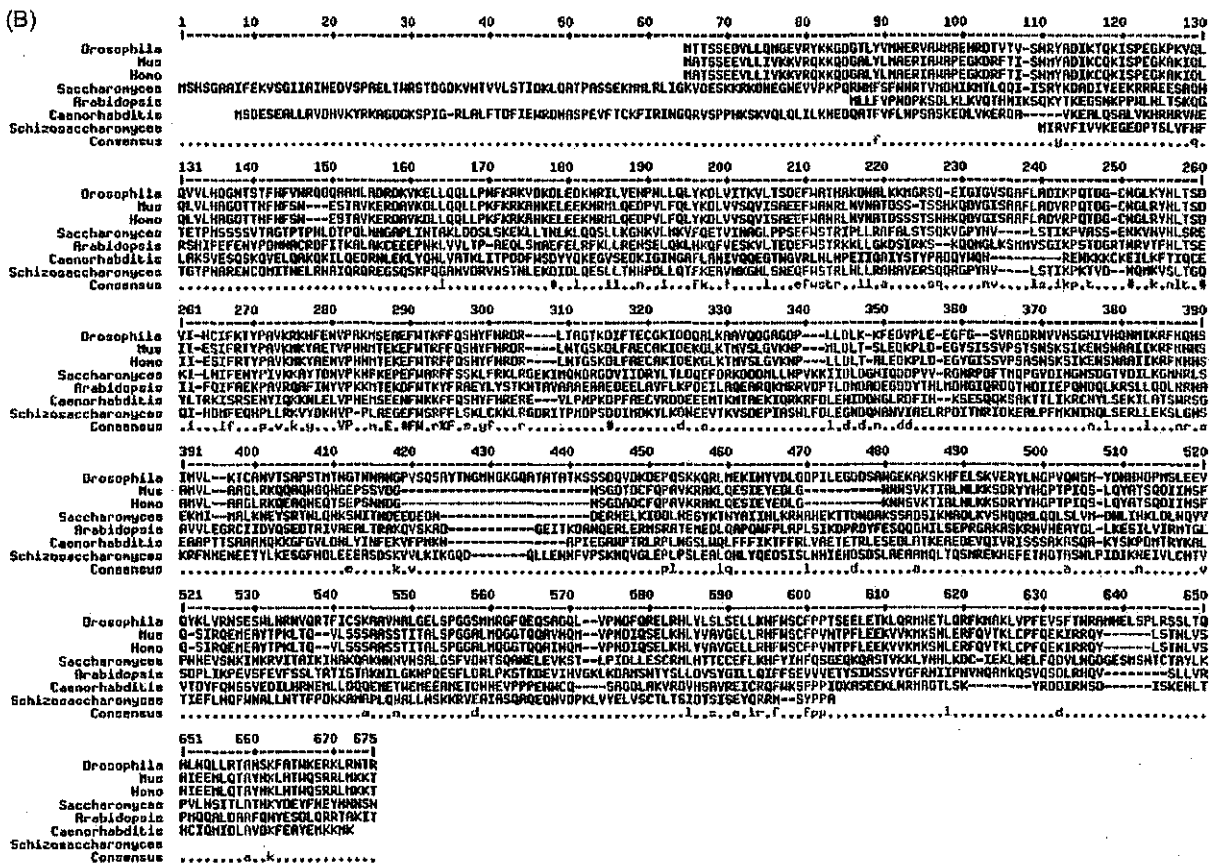
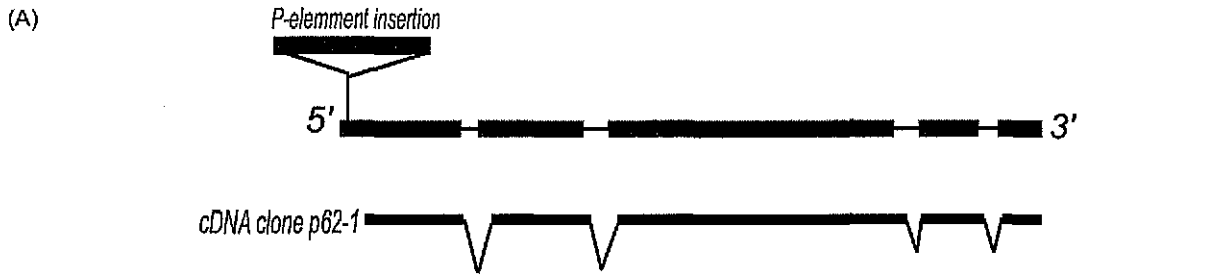
2.5. UV light sensitivity determination

Hundred larvae samples from each weight, *l(2)06949[06949] cn[1]/CyO; ry[506]* and *cn[1]/CyO; ry[506]* were subjected to a UV_{254nm} radiation of 45.55, 91.10 and 136.65 J/m², using a sterilization short-wave UV lamp (model XX-15S, 254 nm, Ultraviolet Products) and a radiometer (UVX-25, range: 0.1–20 mW/cm², with a 240–320 nm sensor, Ultraviolet Products) used to determine the UV dose. The irradiated larvae were incubated in fly medium at 18 °C and then the number of adult individuals quantified and visualized in Nikon SMZ1000 stereo-microscope.

3. Results

3.1. Analysis of the *Drosophila* p62 gene and protein

The *Dmp62* is described in the annotation of the fly genome sequence with the gadfly number CG8151. It contains five exons and four short introns (Fig. 1A). We confirmed *Dmp62* size, organization and sequence complete coding region by the isolation of a full-length cDNA clone (clone p62-1, Fig. 1A, see Section 2). The intron–exon organization of the *p62* gene in different species is variable. For instance, the mouse and human genes have 16 exons and 15 introns [27], whereas the yeast *p62* homologue does not contain any introns [28]. In spite of the variability, there is a high degree of identity in the p62 proteins from human (49.52), mouse (59.96) and *Drosophila* (Fig. 1B). Lower identity is found with *C. elegans* (33.8), *Arabidopsis* (32.8) and yeast (27.27) (Fig. 1B). The alignment and dendrogram performed with the reported p62 orthologues clearly shows that the p62 proteins from animals form a group, where the *C. elegans* protein is the most divergent of the animals. Plant (*Arabidopsis*) p62 is separated from all the others and also the two yeast sequences that form a different group. Since p62 is a protein that makes multiple protein–protein contacts with other TFIIH components and probably with other factors, we looked for common conserved motifs in the different p62 sequences analyzed using the MEME motif program (see Section 2).



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Fig. 1C shows the different motifs found from the program and the consensus sequence for each motif is indicated in the caption. Some of these motifs are found in all p62 sequences that we analyzed and they are present in identical positions along the protein, for instance, motifs number 1–4. Some of them like the 1, 2 and 5 are actually present more than once in the same protein. Motif 5 is absent in *S. pombe* and motif 6 is only present in human, mouse, *Drosophila* and *Arabidopsis*; localized near the N-terminal of the protein. The differences and similarities of the motifs found in the different organisms may indicate putative interaction sites of p62 with other TFIIH components or with other factors that interact with TFIIH.

3.2. Developmental expression pattern of the *Dmp62* gene transcript and analysis of an enhancer trap line that directs the expression of *lac-Z* from the *Dmp62* promoter

The analysis of the expression pattern of the *p62* gene in mice and humans [27], shows that there are differences in the *Dmp62* mRNA level in different tissues. In order to know whether there are differences in the *p62* expression levels during *Drosophila* development, we analyzed both the RNA and the protein levels during development. Using total RNA from different developmental stages, RT-PCR reactions were performed. Fig. 2A shows that the *p62* mRNA levels are relatively constant during fly development, although higher levels of the RT-PCR product are present during late embryogenesis and in males.

In order to complement the analysis of the *Dmp62* gene, we followed its expression using a P-element insertion (*l(2)06949*) located just upstream of the *Dmp62* ATG initiation codon [23]. This transposable element directs the β -galactosidase expression using control

elements located upstream of the *Dmp62* gene, acting as enhancer trap. The *lac-Z* activity was initially detected in the *l(2)06949* heterozygous embryos just before cellularization (Fig. 2B). Interestingly this activity was preferentially localized in the middle anterior part as well as in the posterior part of the embryos (Fig. 2B), indicating that the first zygotic expression of this enhancer trap line is in these cells. After gastrulation and until the final embryonic stages, *lac-Z* is detected in all the tissues (Fig. 2B–D), suggesting that the *Dmp62* gene is expressed at the same levels in all embryonic tissues. In adults, the *lac-Z* activity was preferentially detected in males (Fig. 2E and F), in particular in the testis and in the gut (Fig. 2F). In the females, some stain was also detected in the gut (data not show). An interesting pattern was observed in the dorsal abdomen in adults, where two parallel cells lines have a very intense *lac-Z* activity (Fig. 2G). These cells correspond to the pericardial cells, part of the fly circulatory system [29]. These results indicate that the enhancer trap transposable element inserted in the 5' region of the fly *p62* gene is directing the *lac-Z* expression preferentially in some of the adult cells.

3.3. *l(2)06949* Heterozygous flies carrying a P-element insertion in the *Dmp62* gene produce an increase in the UV irradiation sensitivity

As mentioned earlier, until now there are no reports of mutants in the *p62* gene in animals. Therefore, it was important to characterize the possible effects of the disruption of the *Dmp62* gene by a P-element insertion in the fly. This insertion was initially reported as an embryonic lethal when homozygous [23]. Mutations in some TFIIH components in *Drosophila* produce an increase in the sensitivity to UV light. For

Fig. 1. *Dmp62* gene organization and protein sequence analysis. (A) Organization of the *Dmp62* gene. The intron–exon organization of the *Dmp62* gene and of a full length cDNA clone is indicated. The gene structure proposed in the *Drosophila* genome edition (gadfly number CG8151) and the one deduced from the cDNA clone isolated in this work, are identical. The insertion point of the P{*ryI*+*r7.2*} = PZ} transposable element at the 5' of the gene is indicated. (B) Alignment of amino acid sequences for *Drosophila* p62 protein and p62 proteins from other organisms. The p62 protein sequences used were retrieved from the GenBank, the accession numbers are indicated in the Section 2. The most conserved residues are red. A putative consensus sequence is also indicated. (C) Motifs conserved in the p62 proteins. The different motifs found are indicated as boxes with different number and each number correspond to a particular color. The consensus sequences for each motif are: motif 1, FWRFFQSHYF; motif 2, ELLRHWSCF; motif 3, LSPDEFWS; motif 4, NGLRYNLTSEIIHSIFEYPAVK; motif 5, DIKPQTDGC; motif 6, IKCQKISPEG. The program used for this analysis is indicated in the Section 2.

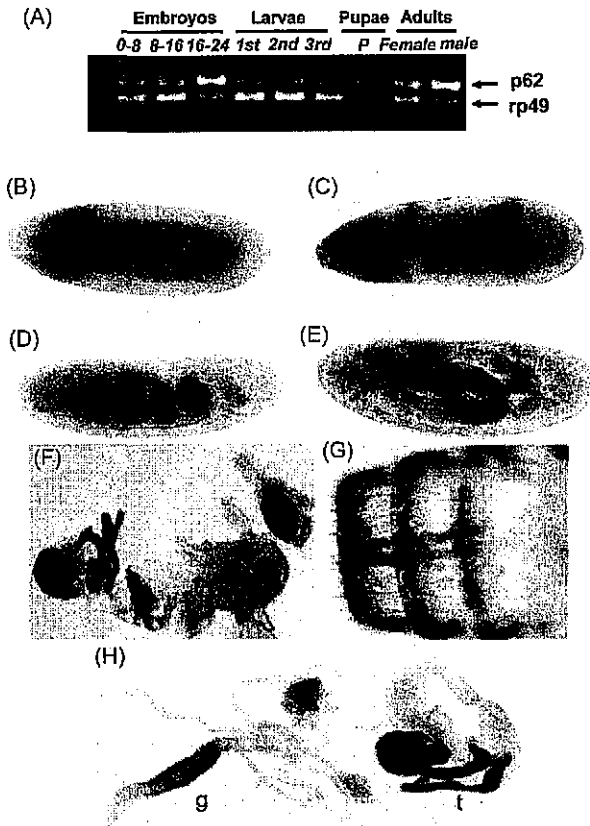


Fig. 2. Expression pattern of the *Dmp62* transcript and β -galactosidase expression pattern in the *Dmp62-lacZ* strain. (A) *Dmp62* RT-PCR products from different *D. melanogaster* developmental stages. The *rp49* was used as internal control. Note that even though in embryos of 16–24 h and males the total amount of *rp49* is less compared to other preparations, these are the samples that have more *Dmp62* RT-PCR product. The β -galactosidase protein encoded by the $P\{ry/+7.2\}=PZ\}$ element was detected using the appropriate color-producing substrate (X-Gal) in embryos and adult tissues of the strain *l(2)06949*. (B) Embryo at the stage of cellular blastoderm. Note, the staining pattern in two broad strips at the middle anterior part and the posterior region of the embryo. (C) Gastrulated embryo. (D and E) Examples of late embryos. Note, that all the tissues show β -galactosidase activity. (F) Dissected adult male showing the internal tissues with β -galactosidase activity. (G) Dorsal view of the abdomen showing the β -galactosidase activity in the pericardial cells. (H) β -Galactosidase activity in the gut (shown by g) and the testis (shown by t). For details see the relevant text.

instance heterozygous flies affected in the haywire gene (the *Drosophila* XPB homologue) are more sensitive to UV light irradiation [30]. Also, flies that over-express the antisense RNA of *Drosophila* XPD

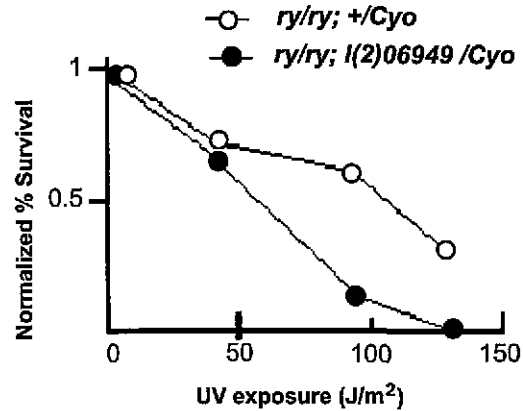


Fig. 3. Sensitivity to UV irradiation in the *Dmp62^{mut}* strain. The *Dmp62^{mut}* strain ($P\{ry/+7.2\}=PZ\}l(2)06949[06949]cn[1]/CyO; ry[506]$) and the parental strain $cn[1]/CyO; ry[506]$ were irradiated at different UV light doses (Section 2). For each dose 100, third instar larvae were irradiated and then allowed to develop. The heterozygous adults were scored and counted. Average of two independent experiments was plotted. The open circles are the parental strain and the black circles the *Dmp62^{mut}* strain.

gene are more sensitive to UV light [31]. We decided to analyze if the *l(2)06949* heterozygous flies are also more sensitive to UV light irradiation. In order to simplify the nomenclature of the insertion affecting the *Dmp62* gene, we named this line as *Dmp62^{mut}*. Third instar larvae obtained from either *ry/ry; Dmp62^{mut}/CyO* or the parental stock *ry/ry; +/CyO* flies were subjected to different UV irradiation doses and then the number of organisms that develop until adults quantified. Fig. 3 shows that the heterozygous flies carrying the *Dmp62^{mut}* allele survive less after different UV irradiation doses when compared with its parental strain. For example, when heterozygous flies carrying the *Dmp62^{mut}* allele were irradiated with 136 J/m², none of them were able to develop until adults. In contrast, about 30% of the parental flies survive with this radiation dose. This is a very dramatic effect on the UV light sensitivity for heterozygous flies affected in one of the TFIIH components and suggests that the dose reduction of the *Dmp62* product in the mutant flies has a drastic effect on the DNA repair mechanisms. Interestingly, the *Dmp62^{mut}* heterozygous flies that survive the irradiation treatment show severe cuticular damages (Fig. 4). This kind of cuticular damage is characteristic of the effect of severe irradiation on normal flies.

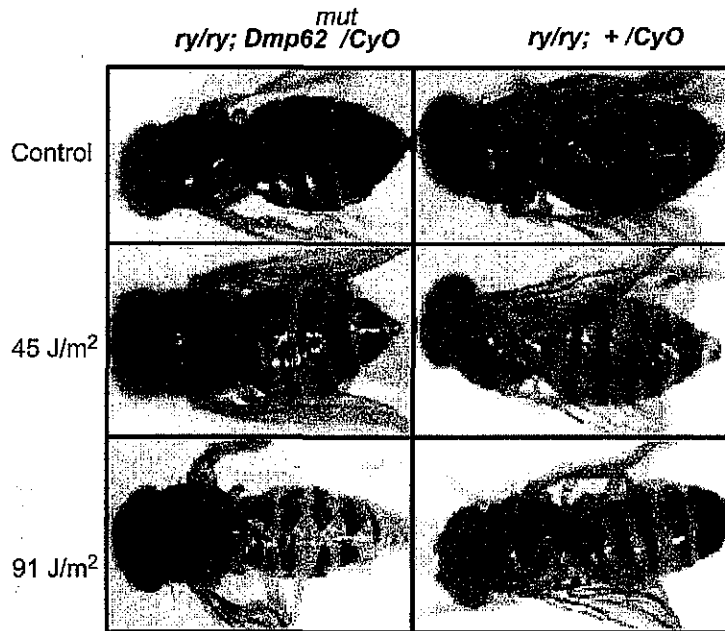


Fig. 4. Cuticular damage in adult flies after UV light irradiation. Adult flies that developed after the irradiation of third instar larvae of the *Dmp62^{mut}* strain and the parental strain are shown. The UV light dose is indicated, at 136 J/m² none *Dmp62^{mut}* adults survive.

Even in the presence of low UV irradiation doses dramatic burns in heterozygous mutant flies were detected while no significant damage is observed in the parental or wild type flies (Fig. 4).

4. Discussion

Mutations affecting some of the human *TFIIH* genes have been reported to produce different human pathologies [15,16]. Interestingly so far for the *p62* human gene there are no reports of human syndromes related to defects in this gene. With the exemption of a *TTD*-allele in the *XPD* gene [32], all of the gene disruptions and allele substitution experiments in mice affecting components of *TFIIH* have a phenotype of early embryo lethality [14,33,35]. In *Drosophila*, it has been possible to analyze multiple alleles of some of the *TFIIH* components and relate the different phenotypes with the multiple functions of this factor [30,34,35]. Thus, the characterization of the *Dmp62* and the analysis of mutants that affect this gene will be complementary to the studies of the role of *TFIIH* during development.

The *Dmp62* gene product is highly conserved in the evolution as are the other *TFIIH* components. In particular we observed the presence of motifs in all the *p62* orthologues described so far. There is a clear correlation of the position of these motifs even in the different *p62* proteins from animals and *Arabidopsis*. The *C. elegans* *p62* protein is the most divergent sequence between animals, in fact some motifs that are present between mammals, *Drosophila* and *Arabidopsis* are absent in this nematode (Fig. 1). A possible explanation could be that the *p62* functions in *C. elegans* have diverged and specialized with some differences to other multicellular organisms. The sequence comparisons of the other *C. elegans* *TFIIH* components with other multicellular organisms will give important information in this subject. It is known that *p62* has multiple contacts with other *TFIIH* components of the complex and with other transcription factors [36,37]. The *p62* homologue from yeast, *Tfb1* requires a region of 114 amino acids from the C-terminal to contact *Ssl1* (human *p44*) [38]. In this direction, we identified a motif (motif 2) within this region that is present in all the *p62* homologues at the C-terminal of the protein and therefore

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

is a candidate motif that could be involved in the p44 contact.

An interesting feature about the *p62* gene is that even though there are highly conserved fragments in the coding DNA and therefore in the protein, the intron–exon organization is not. It is striking while in the human and mouse *p62* genes have a similar intron–exon organization of 16 exons [27], the *Drosophila* gene contains only five exons. However, the most conserved domains of the protein are located in the same order. Thus, while the gene has suffered different rearrangements during evolution, the fundamental role of *p62* has forced it to maintain a high degree of conservation at the protein level.

We observed a basal *Dmp62* expression in *Drosophila*. This expression pattern is expected for a gene that is a component of the basal transcription machinery (TFIIH). The only clear difference at the transcript level was found during late embryogenesis and in the adult male. In fact, the tissue that has the highest β -galactosidase activity as result of the *p62* enhancer trap line analyzed in this work is the testis. It is interesting that in human and in the mouse the testis, is also the tissue that accumulates the higher levels of *p62* mRNA [27]. It is likely that the high transcription levels of specific genes during spermatogenesis require large amounts of TFIIH. This possibility is supported by the fact that spermatogenesis is one of the process that presents a significant affection in mutants of the *Drosophila* XPB homologue, *haywire* [30].

A P-element inserted at the 5' of the *Dmp62* gene directs the expression of the *lac-Z* gene under the control of the putative *Dmp62* enhancers. In the early embryo, the enhancer trap activity is first detected in both the middle anterior part as well as in the posterior part. However, later in development, all the cells of the embryo seem to have a similar β -galactosidase activity. As mentioned earlier, there is a stronger β -galactosidase activity in males, in particular in the testis. The gut is also strongly stained in both males and females. Interestingly, the pericardial cells that are part of the adult circulatory system, have an important *lac-Z* expression, that can be easily observed through the cuticle (Fig. 3), suggesting very high levels of *Dmp62* expression. The function of the pericardial cells is not well understood, these cells are present in all the insects and they have been proposed to be stationary macrophages which may also require high

levels of transcription of specific genes. The data obtained with this enhancer trap line, shows that in some adult tissues the *Dmp62* gene expression is higher than in others. These results suggest that the *Dmp62* expression is different between different tissues.

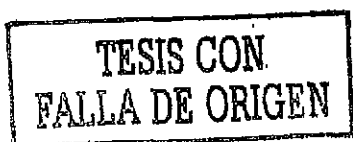
The P-element used as enhancer trap also disrupts the *Dmp62* gene, as it is located just upstream of the first amino acid codon (flybase ID: FBgn0010631). Thus, it is possible that this insertion may produce a hypomorphic mutant. Since no mutants affecting the *p62* gene in multicellular organism have been reported, it was important to determine if there was a phenotype in these flies. As expected, the homozygous flies are lethal and the heterozygous are viable and fertile. However, our results show that the heterozygous flies are more sensitive to UV light irradiation than the wild type (data not show) and the parental line (Fig. 4). In addition, the *Dmp62^{mut}* flies that develop until adult present severe cuticle damage at low irradiation levels compared with the parental line. These kind of lesions are typical in severe irradiation in wild type flies (our own unpublished results), however in the case of the *Dmp62^{mut}/+* the damage is very high. These results suggest that the DNA repair mechanisms, in which TFIIH is involved, are affected when the dosage of wild type *Dmp62* product is reduced in the fly. Similar results have been obtained with other TFIIH components in *Drosophila*, like *haywire* and *DmXPD* [30,31]. Therefore, it seems that any defect that affects DNA repair by mutations in any of the TFIIH components in the fly can be easily analyzed. The type of experiments presented here can not be easily performed in other organisms, showing once more the advantages of the fly as a model system for the study of TFIIH. In addition, the fact that the *l(2)06949* line is an allele of the *Dmp62* gene, opens the possibility for the isolation of new *Dmp62* mutants allowing the analysis of the genetic interaction between *Dmp62* with other TFIIH components.

Acknowledgements

We thank Drs. P. León, L. Peresgasga and Enrique Reynaud for commenting on the manuscript; V. Barajas for her technical support and the Bloomington stock center. This work was supported by the CONA-CyT grant 31786 and DGPA grant IN-200799.

References

- [1] J.M. Elgy, TFIIF: from transcription to clinic, FEBS Lett. 24884 (2000) 124–128.
- [2] W.H. Chang, R.D. Kornberg, Electron crystal structure of the transcription and DNA repair complex, core TFIIF, Cell 102 (2000) 609–613.
- [3] P. Schultz, S. Fribourg, A. Poterszman, V. Mallouh, D. Moras, J.M. Elgy, Molecular structure of human TFIIF, Cell 102 (2000) 599–607.
- [4] F. Le Page, E. Kwoh, A. Avrutskaya, A. Gentil, S. Leadon, A. Sarasin, P. Cooper, Transcription-coupled repair of 8-oxoguanine: requirement for XPG, TFIIF and CSB and implications for Cockayne syndrome, Cell 101 (2000) 159–171.
- [5] A.R. Lehmann, Dual functions of DNA repair genes: molecular, cellular and clinical implications, Bioessays 20 (1998) 146–155.
- [6] W.J. Feaver, J.Q. Svejstrup, N.L. Henry, R.D. Kornberg, Relationship of CDK-activating kinase and RNA polymerase II CTD kinase TFIIF/TFIIK, Cell 79 (1994) 1103–1109.
- [7] E.R. Friedberg, Relations between DNA-repair and transcription, Annu. Rev. Biochem. 65 (1996) 15–42.
- [8] C.E. Vermeulen, J.H. Hoeijmakers, Transcriptional healing, Cell 101 (2000) 447–450.
- [9] J.L. Liu, S. Akoulitchev, A. Weber, H. Ge, S. Chuikov, D. Libutti, X.W. Wang, R.C. Conaway, D. Reinberg, D. Levens, Defective interplay of activators and repressors with TFIIF in xeroderma pigmentosum, Cell 104 (2001) 353–363.
- [10] H. Lu, R.P. Fisher, P. Bailey, A.J. Levine, The CDK7–CycH–p36 complex of transcription factor IIF phosphorylates p53, enhancing its sequence-specific DNA binding activity in vitro, Mol. Cell. Biol. 17 (1997) 5923–5934.
- [11] T. Leveillard, L. Andera, N. Bissonnette, L. Schaeffer, L. Bracco, J.M. Elgy, B. Wasylyk, Functional interactions between p53 and the TFIIF complex are affected by tumor-associated mutations, EMBO J. 15 (1996) 1615–1624.
- [12] S. Larochelle, J. Pandur, R.P. Fisher, H.K. Salz, B. Suter, In vivo Cdk7-activating kinase activity, Genes Dev. 12 (1998) 370–381.
- [13] L. Vandel, T. Kouzarides, Residues phosphorylated by TFIIF are required for E2F-1 degradation during S-phase, EMBO J. 18 (1999) 4280–4291.
- [14] D.J. Rossi, A. Londesborough, N. Korsisaari, A. Pihlak, E. Lehtonen, M. Henkemeyer, T.P. Mäkelä, Inability to enter S phase and defective RNA polymerase II CTD phosphorylation in mice lacking Mat1, EMBO J. 20 (2001) 2844–2856.
- [15] A.R. Lehmann, The xeroderma pigmentosum group D (XPD) gene: one gene, two functions, two diseases, Genes Dev. 15 (2001) 15–23.
- [16] J. de Boer, J.H.J. Hoeijmakers, Cancer from outside, aging from the inside: mouse models to study the consequences of defective nucleotide excision repair, Biochimie 81 (1999) 127–137.
- [17] J. de Boer, J.H.J. Hoeijmakers, Nucleotide excision repair and human syndromes, Carcinogenesis 21 (2000) 453–460.
- [18] P.H. Itin, M.R. Pittelkow, Trichothiodystrophy: review of sulfur-deficient brittle hair syndromes and association with the ectodermal dysplasias, J. Am. Acad. Dermatol. 20 (1990) 705–717.
- [19] P.C. Hanawalt, The bases for Cockayne syndrome, Nature 405 (2000) 415–416.
- [20] I. Biros, S. Forrest, Spinal muscular atrophy: untangling the knot? J. Med. Genet. 36 (1999) 1–8.
- [21] L. Burglen, T. Seroz, P. Miniou, S. Lefebvre, P. Burlet, A. Munnich, E.V. Pequignot, J.M. Elgy, J. Melki, The gene encoding p44, a sub-unit of the transcription factor TFIIF, is involved in large-scale deletions associated with Werdnig–Hoffmann disease, Am. J. Hum. Genet. 60 (1997) 72–79.
- [22] K.S. Sweder, R. Chun, T. Mori, P.C. Hanawalt, DNA repair deficiencies associated with mutations in genes encoding sub-units of transcription initiation factor TFIIF in yeast, Nucleic Acids Res. 24 (1996) 1540–1546.
- [23] A.C. Spradling, D. Stern, A. Beaton, E.J. Rhem, T. Laverty, N. Mozden, S. Misra, G.M. Rubin, The Berkeley *Drosophila* Genome Project gene disruption project: single P-element insertions mutating 25% of vital *Drosophila* genes, Genetics 153 (1999) 135–177.
- [24] J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, Molecular cloning, A Laboratory Manual Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- [25] F. Ausebel, R. Brent, R.E. Kingston, D.R. Moore, J.A. Seidman, J.K. Struhl, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, New York, 1994.
- [26] C. O'kane, W.J. Gehring, Detection in situ of genomic regulatory elements in *Drosophila*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84 (1987) 9123–9127.
- [27] C. Perez, J. Auriol, T. Seroz, J.M. Elgy, Genomic organization and promoter characterization of the mouse and human genes encoding p62 sub-unit of the transcription/DNA repair factor TFIIF, Gene 213 (1998) 73–82.
- [28] Z. Wang, S. Buratowski, J.Q. Svejstrup, W.J. Feaver, X. Wu, R.D. Kornberg, T.F. Donahue, E.C. Friedberg, The yeast *TFBI* and *SSL1* genes, which encode sub-units of transcription factor IIF, are required for nucleotide excision repair and RNA polymerase II transcription, Mol. Cell. Biol. 15 (1995) 2288–2293.
- [29] M. Demerec, Biology of *Drosophila*, Chapman & Hall, New York, 1950, pp. 178–179.
- [30] L.C. Mounkes, R.S. Jones, L. Bee-Choo, W. Gelbart, M.T. Fuller, A *Drosophila* model for xeroderma pigmentosum and Cockayne syndrome: haywire encodes the fly homologue of *ERCC3*, a human excision repair gene, Cell 71 (1992) 925–937.
- [31] M.T. Sandoval, M. Zurita, Increased UV light sensitivity in transgenic *Drosophila* expressing the antisense *XPD* homolog, Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 11 (2001) 125–128.
- [32] J. de Boer, I. Donker, J. de Wit, J.H.J. Hoeijmakers, G. Weeda, A mouse model for the basal transcription/DNA repair syndrome trichothiodystrophy, Mol. Cell 1 (1998) 981–990.
- [33] J. de Boer, I. Donker, J. de Wit, J.H.J. Hoeijmakers, G. Weeda, Disruption of the mouse xeroderma pigmentosum group D DNA repair/basal transcription gene results in pre-implantation lethality, Cancer Res. 58 (1998) 89–94.



- [34] E. Reynaud, H. Lomeli, M. Vázquez, M. Zurita, The *Drosophila melanogaster* homologue of the xeroderma pigmentosum D gene product is located in euchromatic regions and has a dynamic response, *Mol. Biol. Cell* 10 (1999) 1191–1203.
- [35] C. Merino, E. Reynaud, M. Vazquez, M. Zurita, Dissecting the DNA repair and transcriptional effects of the TFIIH factor in the *Drosophila* development, submitted for publication, 2002.
- [36] X. Tong, R. Drapkin, D. Reinberg, Kieff, The 62- and 80-kDa sub-units of transcription factor IIH mediate the interaction with Epstein–Barr virus nuclear protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92 (1995) 3259–3263.
- [37] A. Tremeau-Bravard, C. Perez, J.M. Egly, A role of the C-terminal part of p44 in the promoter escape activity of transcription factor IIH, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 27693–27697.
- [38] P. Matsui, J. DePaulo, S. Buratowski, An interaction between the Tfb1 and Ssl1 sub-units of yeast TFIIH correlates with DNA repair activity, *Nucleic Acids Res.* 23 (1995) 767–772.