



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

“Localización subcelular de la proteína Tonalli A en  
*Drosophila melanogaster*”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA**

P R E S E N T A:

ROSARIO PÉREZ MOLINA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARTHA VÁZQUEZ LASLOP

CIUDAD UNIVERSITARIA, MÉXICO, D.F.

FEBRERO 2005

m340685



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **Agradecimientos**

A mis padres por su constante apoyo, en donde cada quien a su manera, me brindó lo mejor de sí.

A mis hermanas, Ericka y Sandra, por ayudarme en todo momento, por su amistad, sus recaditos por doquier y sobre todo por esas lágrimas que compartimos tantas veces juntas.

A Martha Vázquez por sus enseñanzas en el momento exacto no nada más en lo académico, sino también en lo personal y sobre todo por la enorme paciencia al revisar esta tesis. Gracias por tus comentarios.

A Aiiif! por hacer de los tiempos difíciles los más didácticos para así poder saborear con el mismo placer que da la felicidad, esa tristeza que a todos en algún momento nos invade.

A mi amiga Alicia, donde el tiempo y la distancia no existe, pues aún sueño con esos días de cuadritos blancos y cafés.

A mis amigos Cristina, Paco, Luis y Eda por convencerme día a día que la licenciatura me guardaba además, unos amigos como ustedes. Cristina gracias por enseñarme esa calma, esa suerte y por haber vivido tantas cosas juntas.

A Enrique Reynaud por sus ideas y ese tan particular entusiasmo hacia la investigación.

A Louis por presentarme a tonalli con todos sus pros y contras.

Al laboratorio de la Dra. Salceda por iniciarme en el camino de la ciencia.

A Julieta y Clemen por la gran experiencia que fue aprender de ustedes y por quererme y cuidarme como una más de sus "hijas".

Al laboratorio del Dr. Coria por su apoyo y en especial por seguirme adoptando todos estos años.

A Carlos por esas charlas tan reflexivas que extraño tanto!

Al laboratorio del Dr. Zurita, gracias por su ayuda para la realización de este trabajo, a mis compañeros del lab. por hacer del ambiente de trabajo un lugar placentero, a Ingrid por lo compartido, Eria y Mayra por su amistad.

A la UNAM, por darme la oportunidad de acercarme a este universo de conocimiento y sobre todo por hacerme sentir tan orgullosa de estudiar en un lugar inigualable.

A la Unidad de Microscopía Confocal del IBT, para la elaboración de mis imágenes.

A mis revisores de tesis por sus comentarios y sugerencias que ayudaron a darle el toque final a esta tesis.

# ÍNDICE

Pag

<b>Resumen</b> .....	5
<b>Introducción</b>	
1. <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo de estudio.....	7
2. Generalidades de la transcripción.....	9
3. Los complejos remodeladores de cromatina.....	11
4. Los genes homeóticos en <i>Drosophila melanogaster</i> .....	14
5. La regulación de la transcripción durante el desarrollo.....	15
5a. Los genes del grupo trithorax (TrxG).....	16
5b. Los genes del grupo Polycomb (PcG).....	17
6. La sumoilación.....	17
7. Las E3 ligasas de SUMO.....	19
<b>Antecedentes</b> .....	21
<b>Hipótesis</b> .....	23
<b>Objetivo General</b> .....	23
<b>Objetivos Particulares</b> .....	23
<b>Metodología</b>	
1. Obtención de cDNA.....	24
1.1 Purificación de RNA.....	24
1.2 RT-PCR.....	24
1.3 Amplificación por PCR.....	24
1.3.1 cDNA.....	24
1.3.2 DNA plasmídico.....	25
2. Clonación en plásmidos.....	27
2.1 Vectores utilizados.....	27
2.2 Preparación de vector.....	27
2.3 Purificación de fragmentos de DNA.....	28
2.4 Tratamiento con T4 DNA polimerasa.....	28
2.5 Reacciones de ligasas.....	29
2.6 Transformación por electroporación de <i>E. coli</i> .....	29
2.7 Análisis de plásmidos recombinantes.....	30
3. Secuenciación de los plásmidos construídos.....	31
4. Líneas de <i>Drosophila melanogaster</i> empleadas.....	31
5. Obtención y mapeo de inserciones en líneas transgénicas.....	32
5.1 Inyección de embriones.....	32
5.2 Mapeo de la inserción y ensayo de complementación.....	34
6. Localización subcelular de TnaA.....	34
6.1 Colecta de embriones.....	34

6.2 Preparación de los embriones para microscopía.....	35
6.3 Imágenes por microscopía.....	37
7. Fusiones de tna-GST.....	37

## Resultados

1. Clonación de <i>tnaA</i> .....	39
2. Secuencia de cDNA de <i>tnaA</i> .....	40
3. Fusión de TnaA con YFP.....	42
4. Obtención y mapeo de inserciones en líneas transgénicas.....	49
4.1 Inyección de embriones.....	49
4.2 Mapeo de la inserción.....	50
4.3 Complementación del transgén TnaA-YFP.....	52
4.4 Observación de TnaA-YFP en embriones de <i>D. melanogaster</i> .....	57
5. Fusiones de tna-GST.....	59

<b>Discusión</b> .....	62
------------------------	----

<b>Conclusiones</b> .....	70
---------------------------	----

<b>Perspectivas</b> .....	70
---------------------------	----

<b>Bibliografía</b> .....	71
---------------------------	----

## Resumen

Los grupos de los genes trithorax y Polycomb son esenciales para el mantenimiento de la activación y de la represión de los genes homeóticos. El gen del grupo trithorax, *tonalli* (*tna*), se identificó por su interacción con *brahma*, que codifica para la ATPasa del complejo remodelador de cromatina Brahma. *tna* codifica para dos isoformas, TnaA y B. A diferencia de TnaB, TnaA posee un dominio SP-RING, firma asociada a las E3 ligasas de SUMO y una señal de localización nuclear. La sumoilación es una modificación postraducciona similar a la ubiquitinación. Se ha propuesto que la sumoilación puede modificar la interacción entre proteínas, la localización subcelular, la actividad y/o la estabilidad de sus blancos. En base a las interacciones genéticas de *tna* con genes que codifican para subunidades del Mediador y de complejos remodeladores de cromatina se ha propuesto que los blancos de TnaA pudieran ser proteínas constituyentes de la cromatina o factores transcripcionales de genes homeóticos y por lo tanto TnaA debería estar en sitios donde encuentre a sus blancos.

Con el propósito de buscar estos blancos de sumoilación, es relevante conocer la localización subcelular de TnaA. Para esto se construyeron líneas de moscas transgénicas que contienen una fusión de TnaA con la proteína amarilla fluorescente (YFP). Para demostrar la funcionalidad silvestre del transgén se rescataron los fenotipos letales de mutantes en *tna*. Posteriormente con microscopía confocal y de fluorescencia, se analizó el comportamiento de TnaA-YFP en embriones transgénicos.

Su localización cambia de un estadio a otro ya que en las primeras horas de la embriogénesis TnaA-YFP es citoplásmica en las células polares mientras que en

embriones tardíos (posteriores a la gastrulación) observamos una distribución punteada que en algunos casos se localizaba principalmente en la amnioserosa.

Además con el propósito de generar anticuerpos específicos anti-TnaA, se establecieron las condiciones óptimas para expresar el carboxilo-terminal de la proteína TnaA fusionada a la GST.

## Introducción

### 1. *Drosophila melanogaster* como modelo de estudio

Durante décadas *D. melanogaster* se ha utilizado para tratar de contestar muchas preguntas en las diferentes áreas de la ciencia. Trabajar con este organismo es ideal porque tiene varias ventajas. Posee una capacidad reproductiva elevada, el tiempo por generación es muy corto (su ciclo de vida es de diez a catorce días), se cultiva fácilmente en el laboratorio y es de tamaño pequeño lo que hace que su manipulación sea económica. Y para los fines de esta tesis, este organismo es ideal para el estudio genético de un gran número de procesos biológicos. Tiene cuatro cromosomas y un genoma de 175 mb (Bennett *et al.*, 2003). *Drosophila* cuenta con una estructura muy utilizada por los citogenetistas: los "cromosomas politénicos". En este tipo de cromosomas, el DNA se replica varias veces sin separación de las cromátidas. Los cromosomas politénicos se encuentran en las glándulas salivales de las larvas de 3<sup>er</sup> instar. El patrón de bandas que presenta cada cromosoma es único y característico para cada uno de ellos (Griffiths *et al.*, 2000). En este organismo se han aislado grandes colecciones de mutaciones que producen esterilidad y letalidad durante el desarrollo (Demerec, 1994). También se cuenta con el mapa genético más completo que el de cualquier otro organismo complejo además de que se conoce la secuencia de casi todo su genoma.

Su ciclo de vida comienza cuando después de la fertilización y la ovoposición del huevo se inicia el desarrollo embrionario, el cual se divide en dieciséis estadios y dura alrededor de quince horas (ver Fig. 1).

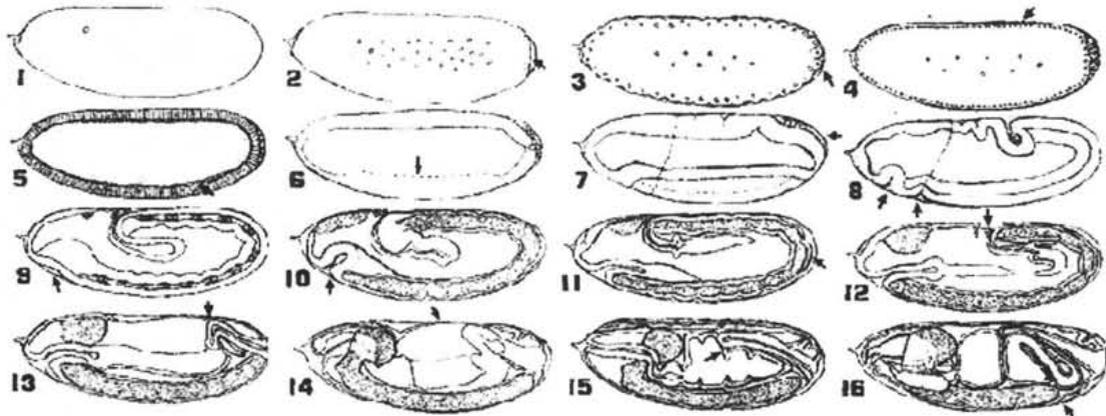


Figura 1. Esquema de los 16 estadios en los que se divide la embriogénesis en *Drosophila*. Las flechas en cada diagrama indican un cambio morfológico característico de esa etapa (Wieschaus y Nüsslein-Volhard, 1987).

En el primer estadio el citoplasma del embrión es homogéneo. Durante el estadio 2 el núcleo se replica y se diferencia el plasma polar. En el estadio 3 los núcleos migran hacia la corteza y se forman las células polares. En el estadio 4 llamado blastodermo sincicial, los núcleos se replican en la corteza manteniéndose la comunicación entre ellos a través del citoplasma. Durante el estadio 5, conocido como blastodermo celular, se forman membranas que separan a cada núcleo y se produce la celularización completa de la corteza. A partir del estadio 6 se inicia la gastrulación durante la cual se originan las capas endodérmica, mesodérmica y ectodérmica del embrión que posteriormente darán origen a todos los órganos y tejidos del embrión durante la organogénesis (Wieschaus y Nüsslein-Volhard, 1987). Durante todo el desarrollo embrionario el huevo se encuentra protegido por varias cubiertas (ver más adelante).

Una vez concluida la embriogénesis, el embrión pasa por tres estados de larva (1°, 2° y 3° "instar") donde se identifican unas estructuras en forma de pequeños sacos conocidos como discos imaginales los cuales poseen conjuntos de células diferenciadas que posteriormente dan origen a los distintos tipos celulares dentro del organismo. Finalmente se forman las pupas donde se lleva a cabo la metamorfosis para convertirse en una mosca adulta.

## 2. Generalidades de la transcripción

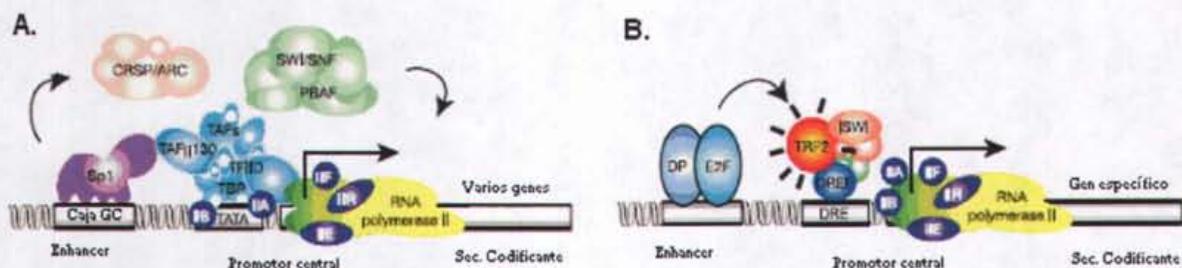
En el caso de los genes que codifican para proteínas, se requiere del ensamblaje coordinado de la RNA pol II y al menos cinco factores "basales" o "generales" de transcripción (TFIID, TFIIB, TFIIF, TFIIE y TFIIH). El inicio de la transcripción se da cuando el factor TBP, subunidad del complejo TFIID, se une únicamente a los promotores con caja TATA. El promotor central o "core" que abarca aproximadamente 40 nucleótidos, contiene diversos elementos. Entre ellos se encuentran la caja TATA (TATAAA), el -Inr- iniciador ( $TCA^G_TT^T_c$ ), el -BRE- elemento de reconocimiento de la TFIIB ( $^G G G C G C C$ ) y el -DPE- "downstream promoter element" ( $^A G^A C G T T A$ ). Cada uno de estos elementos se puede encontrar en ciertos promotores en específico, otorgando a esta secuencia de DNA una función regulatoria de la transcripción (Butler y Kadonaga, 2002).

*D. melanogaster* tiene promotores caracterizados de la clase TATA (que contienen la caja TATA), de la clase DPE (que contienen la secuencia DPE) o aquellos que alternan entre ambos (un gen que contiene dos promotores, uno TATA y otro DPE). Existen promotores con nuevos elementos como el MTE "motif ten element" (CGAACGCAACGG), cuya caracterización apenas se está iniciando (Lim *et al.*, 2004). Cada uno de estos elementos es reconocido por diferentes factores (Butler y Kadonaga, 2001). Por ejemplo la caja TATA se une al factor TBP o a factores similares conocidos como TRF's ó TLF's ("TBP-like transcription factors") y otros como el elemento DPE reclutan factores llamados TAF's ("TBP associated factors") cuya finalidad es atraer al complejo TFIID. Inicialmente se une TFIID a través de los elementos presentes en ese promotor. TFIID contiene a la TBP/TRF's y TAF's correspondientes que en algunos casos forman un octámero que semeja la estructura de una histona (Woychik y Hampsey, 2002).

Posteriormente se recluta TFIIB que es el puente que permite la interacción entre la TBP/TRF/TAF (TFIID) y la RNA pol II no fosforilada. TFIIF otorga estabilidad a este complejo ternario siendo esto un prerrequisito para la entrada de TFIIIE y TFIIH. Cuando se forma el complejo de preiniciación, se da la apertura del promotor. TFIIH fosforila el dominio CTD de la RNA pol II para promover la salida del promotor. Después de liberar todos los TFII's, se inicia la fase de elongación. Por último una fosfatasa se encarga de defosforilar a la RNA pol II para finalizar la transcripción (Sims *et al.*, 2004).

A pesar de que los factores basales son suficientes para dar inicio a la transcripción *in vitro*, *in vivo* es necesaria la presencia de factores adicionales más aún si tomamos en consideración a la estructura de la cromatina.

Además del promotor central, existen otras secuencias que actúan en *cis* para regular la transcripción de genes específicos por la RNA pol II. Éstas se encuentran a varias kilobases arriba o abajo del inicio de la transcripción por lo que son conocidas como elementos distales. Algunos ejemplos son los enhancers, los silenciadores y los aisladores ó "insulators". Estos sitios son específicos para el reconocimiento por reguladores que a su vez permiten el contacto con correguladores.



**Figura 2.** Ejemplos de la gran diversidad de complejos que dan inicio a la transcripción general. **A.** El aparato transcripcional eucarionte se subdivide en tres clases; el "core" de la RNA polII con sus distintos TF's (TFII-A, -B, -D, -E, -F y -H), cofactores (mediador, CRSP, TRAP, etc.) y los complejos modificadores de la cromatina (SWI/SNF, PBAF, NURF, etc.). **B.** La TFIID a su vez presenta especificidad al unirse a través de sus distintas TAF's o TRF's (Levine y Tjian, 2003).

Los correguladores se clasifican en dos grupos. Los que forman parte de la "maquinaria basal" o tienen contacto con ella (TAFs y componentes del Mediador), y aquéllos que

contienen con el efecto represor que tiene la cromatina sobre la transcripción (Featherstone, 2002).

El Mediador es un complejo de al menos 20 proteínas que se encarga de transducir la información regulatoria entre activadores o represores específicos y la maquinaria de transcripción basal ubicada en el promotor (Rachez y Freedman, 2001). Este complejo actúa sobre la actividad de cinasa de TFIIF lo cual sugiere que dicha regulación es a través del CTD de la RNA polII. No todos los componentes del Mediador responden a los mismos reguladores. Existen subunidades específicas del contexto celular y/o molecular (Woychik y Hampsey, 2002). Esto refleja un nivel más de complejidad en la regulación de la expresión génica por la RNA pol II. Una subunidad del Mediador particularmente relevante para este trabajo es la TRAP240 conocida como Skuld en *Drosophila* (Treisman, 2001). Skuld forma parte del grupo de proteínas trithorax (ver más adelante).

### 3. Los complejos remodeladores de cromatina

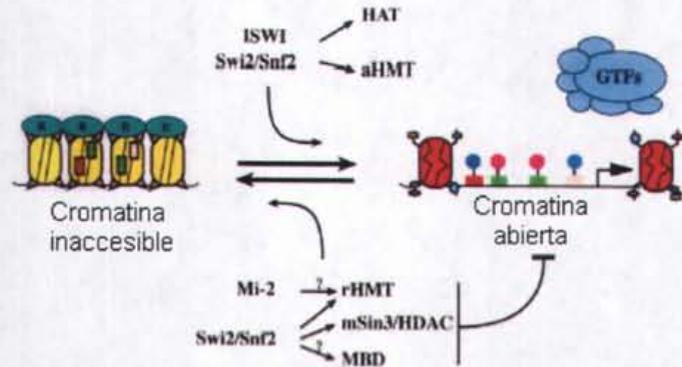
Con la reciente secuenciación de un gran número de genomas, entre ellos el de *Drosophila*, se ha abierto un nuevo panorama que nos permite abordar el tema de regulación de procesos nucleares (recombinación, replicación, transcripción, reparación, etc.) desde el punto de vista de interacción de reguladores con secuencias específicas de DNA. La cromatina es un complejo DNA/proteína donde se compacta todo el material genético al interior del núcleo de una célula. Su unidad fundamental es el nucleosoma que abarca 147 pb de DNA organizadas por un octámero de histonas (2•H2A, 2•H2B, 2•H3 y 2•H4). Por lo tanto existe un nivel de regulación superior el cual permite o no, la interacción de dichas proteínas con sus secuencias blanco. Debido a la estructura de la cromatina se crea una barrera estable que provoca que ciertas

secuencias de DNA se vuelvan inaccesibles para todo tipo de interacción. Por lo anterior, la función de complejos que alteran el empaquetamiento y por lo tanto la accesibilidad al DNA es fundamental como un modulador más en la expresión de genomas.

Existen dos categorías estructurales de complejos modificadores de la cromatina:

- a) ATP-dependientes: requieren la hidrólisis de ATP para permitir el movimiento de nucleosomas lo que incrementa la accesibilidad al DNA. Se dividen en cuatro familias (SWI2/SNF2, ISWI, DOMINO y Mi-2) basadas en la identidad de su subunidad catalítica (ATPasa) (Sif, 2004). Además su clasificación radica en sus diferencias bioquímicas, en el requerimiento por substratos específicos, en su contacto con el templado y en los distintos mecanismos que utilizan para remodelar la cromatina (desplazamiento de nucleosomas "sliding" o cambios conformacionales en histonas) (Narlikar *et al.*, 2002).
- b) Modificadores de histonas: estas enzimas o complejos añaden o quitan modificaciones covalentes de los extremos N-terminal de las histonas. Existen varias clases de modificaciones: la acetilación, la fosforilación, la metilación, la ubiquitinación y la sumoilación entre otras (Shiio y Eisenman, 2003).

Actualmente no existe un orden establecido para la acción de cada uno de estos complejos. Parece ser que todo depende de la naturaleza del promotor, de los factores presentes en el momento y del estado de la estructura de la cromatina en el que reside el promotor. Finalmente el gen puede ser sujeto a una regulación específica en la que se permitirá o no la apertura y formación de un templado accesible (Fig. 3).

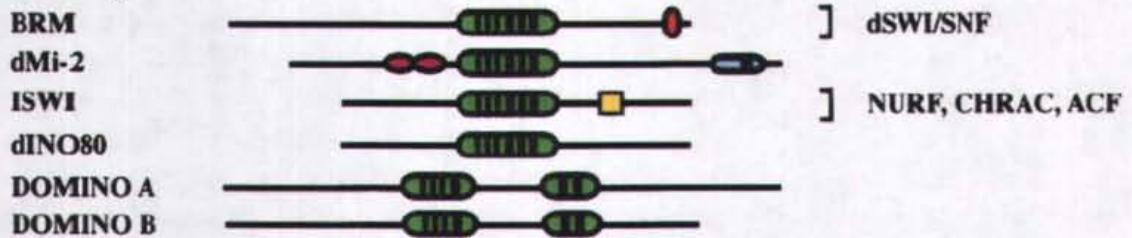


**Figura 3.** Modelo de la regulación de la estructura de la cromatina. Complejos remodeladores de cromatina ATP-dependientes (Swi2/Snf2 o ISWI), alteran individualmente o en combinación con HAT's o con activadores HMT's (aHMT), la estructura de los nucleosomas. Para reestablecer dicha estructura, complejos remodeladores (Mi-2 o Swi2/Snf2) asociados a represores HMT's (rHMT), MBD's o HDAC's estabilizan la interacción DNA-histonas. Distintas modificaciones covalentes en los extremos N-terminal de las histonas mostrados en distintos colores y nucleosomas estables en amarillo. HAT: acetiltransferasas de histonas, HMT: metiltransferasas de histonas, R: proteínas represoras, GTFs: factores generales de la transcripción, HDAC: deacetiltransferasas de histonas, MBD: proteínas de unión a metil-CpG (Sif, 2004).

En *D. melanogaster* se han encontrado miembros conservados de las cuatro familias de remodeladores ATP-dependientes (Fig. 4). Recientemente se purificaron dos subclases de complejos remodeladores de cromatina de la familia SWI/SNF: el complejo BAP, definido por la presencia de Osa, proteína codificada por un miembro del *trxG* (Collins *et al.*, 1999; Vázquez *et al.*, 1999); y el complejo PBAP que contiene a Polybromo y a BAP170, proteínas recientemente identificadas (Mohrmann *et al.*, 2004). Aunque mostraron distintos patrones de distribución en cromosomas politénicos, la asociación de ambos complejos a regiones de cromatina "abierta" hiperacetilada predominó.

Entre los genes *trithorax* que se han identificado (ver más adelante), se encuentra el gen *brahma* que codifica para el homólogo en *Drosophila* de la proteína SWI2/SNF2 en levadura. Brahma (BRM) forma parte de un complejo de al menos siete subunidades. Este complejo está formado por proteínas que poseen sitios de unión a activadores transcripcionales, otras con actividad de remodeladores de cromatina ATP-dependientes y hay algunas cuya función aún es desconocida.

## *D. melanogaster*

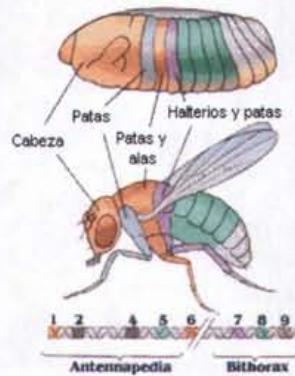


**Figura 4.** Miembros de las distintas familias de remodeladores de cromatina ATP-dependientes en *D. melanogaster*. Dominio ATPasa (verde), bromodominio (rojo), cromodominio (rosa), dominio SANT (amarillo) y dominio de unión a DNA cercano al C-terminal (azul).

### 4. Los genes homeóticos en *Drosophila melanogaster*

El papel de los genes homeóticos (HOM) es fundamental para determinar la identidad de los segmentos durante el desarrollo. Varios de los genes HOM en *Drosophila* se encuentran en dos grupos; el complejo Antennapedia (ANTC) y el complejo bithorax (BXC) (Fig. 5). El complejo ANTC incluye los genes *Antennapedia* (*Antp*), *Sex combs reduced* (*Scr*), *Deformed* (*Dfd*), *proboscipedia* (*pb*) y *labial* (*lab*) (Kaufman *et al.*, 1990). El complejo BXC está formado por los genes *Ultrabithorax* (*Ubx*), *abdominal-A* (*abd-A*) y *Abdominal-B* (*Abd-B*) (Sánchez-Herrero *et al.*, 1985).

Los genes HOM tanto de ANTC como de BXC codifican para factores de transcripción que contienen un motivo de unión a DNA conocido como homeodominio. Estos factores se encargan a su vez de controlar directamente la transcripción de genes río abajo de ellos. Cada uno de los genes HOM se expresa en un dominio específico a lo largo del eje anteroposterior. La expresión de un gen HOM es silenciada fuera de su dominio natural y un error en su silenciamiento resulta en la expresión ectópica de proteínas homeóticas, cambiando la identidad de un segmento (revisado en Kennison, 2004). Por lo tanto es indispensable una regulación muy fina de la expresión de estos genes desde el inicio del desarrollo, que es el momento en que los dominios de expresión o silenciamiento de los genes HOM son establecidos.



**Figura 5.** Esquema que muestra los dos grandes complejos en los que se encuentran agrupados los genes HOM en *D. melanogaster* y las estructuras para las que está involucrada la regulación transcripcional de cada uno de los complejos.

Los genes HOM se empiezan a transcribir poco antes del inicio de la celularización del blastodermo del embrión. Los encargados de su activación son los genes “gap” que a su vez activan a genes de segmentación llamados “pair-rule” (regla par), responsables de reprimir en las fronteras de expresión para cada gen HOM. Por lo que los genes “gap” activan tanto a los genes encargados de delimitar cada uno de los segmentos como a los responsables de su identidad.

## 5. La regulación de la transcripción durante el desarrollo

La regulación de genes HOM es compleja. Desde el momento en que desaparecen los factores de segmentación se requieren factores de mantenimiento que aseguren la continuidad del destino morfológico de cada una de las células blastodérmicas. Estos factores están codificados en dos grupos de genes: los trithorax (trxG) que son factores de regulación positiva para el mantenimiento de su expresión mientras que los genes Polycomb (PcG) mantienen la represión de éstos.

Existen evidencias de que varios genes de ambos grupos codifican para factores que regulan la transcripción modificando la estructura de la cromatina (Simon y Tamkun, 2002). Las proteínas PcG y trxG se unen a sitios específicos conocidos como PREs y TREs (“Polycomb and trithorax response elements”). Estos elementos se encuentran en

particular en las regiones regulatorias de ANTC y BXC. En varios casos se ha visto que los PREs y TREs se sobrelapan (Tillib *et al.*, 1999) por lo que la presencia de cualquiera de estos sitios no es determinante para la función de PcG o trxG. Se ha propuesto que es el estado de la cromatina, reflejo del estado transcripcional, el que podría estar determinando o estabilizando el reclutamiento de dichos complejos (Francis y Kingston, 2001). Por esto se considera que la acción de factores de ambos grupos puede ser un sistema de memoria que mantiene eventos regulatorios previos de manera post-mitótica.

Además se ha observado interacción física entre proteínas de ambos grupos con enzimas modificadoras de histonas, siendo estas enzimas las posibles responsables de las diferencias en el estado de la cromatina de las zonas regulatorias en los genes (Armstrong *et al.*, 2002). Por ejemplo la proteína Trithorax (TRX) interacciona con una acetiltransferasa de histonas (dCBP) (Petruk *et al.*, 2001) mientras que las proteínas "Extra sex combs" (ESC) y "Enhancer of zeste" [E(Z)] interactúan con una desacetilasa de histonas (Rpd3) (Tie *et al.*, 2001).

#### 5a. Los genes del grupo trithorax (trxG)

Estos genes se han definido como supresores de fenotipos de pérdida de función de genes del grupo PcG. Varias de las subunidades codificadas por genes pertenecientes al grupo trxG, forman parte o interaccionan con complejos protéicos que funcionan como corre reguladores de la RNA polIII. En *Drosophila* se han purificado cuatro complejos multiméricos que contienen subunidades codificadas por genes del grupo trxG. El primero de ellos es el complejo Brahma que contiene a las subunidades Brahma, Moira y Osa codificadas por genes trxG (Collins *et al.*, 1999; Kal *et al.*, 2000; Papoulas *et al.*, 1998). Pertenecen también a este grupo los genes *kohtalo* (*kto*) y *skuld*

(*skd*) los cuales codifican para subunidades del complejo Mediador (Boube *et al.*, 2000; Treisman, 2001). Los dos complejos restantes, ASH1 y TAC1, contienen subunidades codificadas por genes *trxG* que están involucradas en la modificación de residuos específicos de histonas (Beisel *et al.*, 2002; Petruk *et al.*, 2001).

#### 5b. Los genes del grupo Polycomb (PcG)

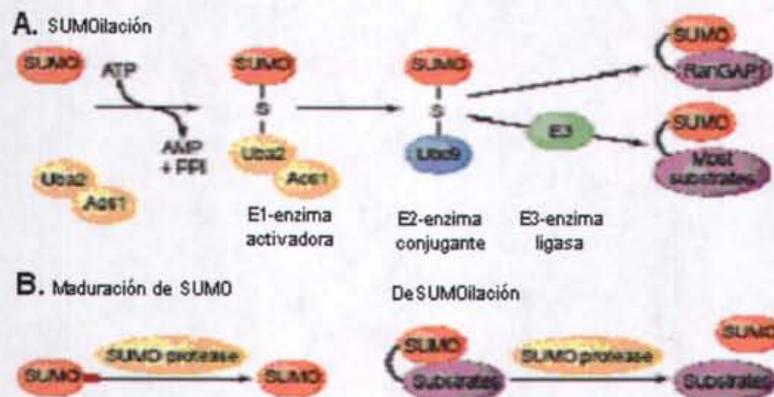
Hasta el momento se han purificado dos clases de complejos PcG que mantienen el estado reprimido de la expresión de los genes HOM en embriones de *Drosophila*. El complejo E(Z)/ESC (600-650 kDa) contiene las proteínas Enhancer de Zeste (E(Z)), Extra sex combs (Esc), la desacetilasa de histonas Rpd3, el Supesor de Zeste 12 (Su(Z)12), Nurf-55 (Czermin *et al.*, 2002) y Pleihomeotic (Pho) (Poux *et al.*, 2001). Se cree que su función es dejar marcas epigenéticas en la cromatina que favorezcan el reclutamiento posterior de otro tipo de complejos PcG.

El segundo complejo es el llamado "Polycomb repressive complex 1" o PRC1 (1-3 MDa) que contiene las proteínas Polycomb (Pc), Polyhomeotic (Ph), Posterior sex combs (Psc), dRING, Sex combs on midleg (Scm) y el factor GAGA entre otras. Poco se conoce sobre las actividades de este complejo, pero se ha observado *in vitro* que bloquea la remodelación de la cromatina mediada por el complejo SWI/SNF (Shao *et al.*, 1999).

#### 6. La sumoilación

La sumoilación es una modificación postraduccional covalente donde se une la proteína SUMO a determinadas lisinas de las proteínas blanco. La ubiquitina y SUMO no comparten gran homología en cuanto a secuencia de aminoácidos (18%) a pesar de que las vías de conjugación con sus substratos son muy similares.

Para que SUMO se una a sus blancos, se requiere del heterodímero Aos1/Uba2 la enzima E1 activadora y una enzima E2 conjugante Ubc9. Las E3 ligasas aportan la especificidad de la vía por sus blancos (Muller *et al.*, 2001) (Fig. 6).



**Figura 6.** Diferentes clases de enzimas involucradas en la vía de sumoilación. A. Vía de conjugación ATP-dependiente donde cada unión enzima-SUMO es por medio de un enlace tioéster y para la unión SUMO-substrato es por medio de un enlace peptídico. B. Doble función que poseen las proteasas de SUMO de la familia de las Ulp1 (Melchior *et al.*, 2003).

La mayoría de las proteínas sumoiladas presenta una secuencia consenso:  $\Psi$ -Lys-X-Glu donde  $\Psi$  es un aminoácido hidrofóbico, comúnmente isoleucina o valina, y la X es cualquier residuo (Verger *et al.*, 2003). Dentro de la gran cantidad de proteínas blanco de la sumoilación podemos encontrar desde factores de transcripción, proteínas involucradas en la transducción de señales y en la remodelación de la cromatina, enzimas o proteínas virales, hasta ribonucleoproteínas involucradas en el metabolismo del mRNA (Li *et al.*, 2004).

Se han sugerido distintas funciones para la sumoilación:

1) Una podría ser otorgar estabilidad como en el caso de la proteína PCNA, proteína de anclaje para DNA polimerasas que está involucrada en la síntesis y reparación del DNA, ya que la unión de SUMO a PCNA inhibe su ubiquitinación y por ende su degradación (Hoege *et al.*, 2002);

2) muchos de los blancos de sumoilación son factores de transcripción que al ser sumoilados, se relocalizan dentro de la célula. Por ejemplo la localización nuclear del factor de transcripción Dorsal permite regular su función al estar o no accesible a sus secuencias blanco (Bhaskar *et al.*, 2000);

3) La sumoilación podría participar en la regulación de interacciones proteína-proteína (Seeler *et al.*, 2001) y proteína-DNA (Hardeland *et al.*, 2002; Mao *et al.*, 2000).

Hasta el momento no se ha reportado que dichas funciones sean excluyentes.

## 7. Las E3 ligasas de SUMO

Se ha observado que las E3 ligasas facilitan la sumoilación de sus proteínas blanco *in vitro*, particularmente en presencia de niveles bajos de la enzima conjugante. Se ha postulado que la presencia de las ligasas dentro de la vía de conjugación podría: a) incrementar la afinidad de Ubc9 por un blanco específico, b) estabilizar la interacción de Ubc9 con sus proteínas blanco, c) orientar la lisina aceptora de SUMO o d) contribuir mecánicamente en la conjugación.

Recientemente se ha descubierto un mayor número de proteínas sumoiladas (más de 50) de las cuales la mayoría presenta la secuencia peptídica consenso mencionada anteriormente, otras tantas han definido una nueva secuencia (TKET) (Hoege *et al.*, 2002) y en menor frecuencia, se han detectado proteínas que no presentan ninguno de los sitios aceptores de SUMO reportados hasta la fecha. En ensayos *in vitro* donde se ha evaluado la sumoilación de proteínas con o sin la secuencia peptídica consenso, se ha incrementado en ambos casos la sumoilación de dichas proteínas blanco. Por lo tanto se ha propuesto que las enzimas E3 ligasas estén permitiendo el reconocimiento de Ubc9 por los distintos sitios de unión de SUMO presentes en las proteínas blanco (Melchior *et al.*, 2003).

Actualmente se han descrito tres tipos de SUMO E3 ligasas:

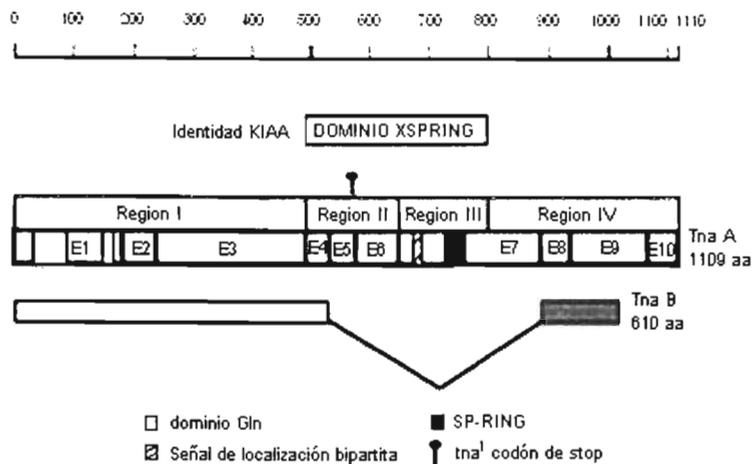
- 1) La familia de las proteínas PIAS contienen un dominio SP-RING esencial para su función. Estas E3 ligasas se unen directamente con Ubc9 y la proteína blanco (Jackson, 2001).
- 2) Representado por la proteína RanBP2/Nup358, componente del complejo del poro nuclear. Este tipo de enzimas no presenta ningún dominio homólogo a las demás E3 ligasas. A diferencia de la interacción con las proteínas blanco, esta clase de enzimas posee una interacción muy estable con Ubc9 (Pichler *et al.*, 2002).
- 3) Representado por el componente Polycomb Pc2 involucrado en el silenciamiento de la expresión génica. Aún se desconoce la manera como funciona (Kagey *et al.*, 2003).

## Antecedentes

Para la identificación de proteínas involucradas en el mantenimiento de la expresión homeótica se han abordado diversos enfoques. El gen *tonalli* (*tna*) se identificó entre otros como un gen que interactúa genéticamente con *brahma* (*brm*), que es el gen que codifica para la subunidad ATPasa del complejo Brm. Los individuos que contienen mutaciones en *tna* y en *brm* tienen un fenotipo de extensión de alas, resultado de una mala regulación en uno de los dos promotores del gen HOM *Antp* (Gutiérrez *et al.*, 2003; Vázquez *et al.*, 1999).

*tna* es considerado un gen trithorax por varias evidencias. Una de ellas es que suprime fenotipos de pérdida de función de genes del grupo Polycomb (Pc-G) y aumenta el efecto de mutaciones de pérdida de función en genes trithorax como por ejemplo *snr1*, *moira*, *osa* y *kismet* que son subunidades de complejos remodeladores de cromatina. *tna* es indispensable para la expresión de varios genes HOM como son *Antp*, *Ubx* y *Scr*.

El *locus* codifica posiblemente para dos isoformas TnaA y B. TnaA posee un dominio SP-RING que es la firma que caracteriza a un tipo de E3 ligasas de SUMO. A diferencia de TnaB, TnaA posee además del SP-RING una señal de localización nuclear (NLS) (Fig. 7).



**Figura 7.** Los dos transcritos de *tna* predichos por la BDGP(2ª versión). En la parte superior se muestra una escala que indica el número de aminoácidos. E1-E10 son los exones que forman a la proteína TnaA. Dominios ricos en glutaminas están indicadas en gris tenue, la NLS bipartita indicada en rayas y el dominio XSPRING se esquematiza por la caja que se ubica debajo de la escala (Gutiérrez *et al.*, 2003).

El estudio de la expresión de *tna* a lo largo del desarrollo reveló que en los primeros estadios embrionarios se detecta un transcrito de 6.1 kb (*tnaA*) que se mantiene hasta las etapas adultas; a partir del tercer instar larvario aparece un segundo transcrito de 4.2 kb (*tnaB*), el cual también prevalece hasta la etapa adulta. Lo anterior sugiere que la función de *tna* se requiere en diferentes estadios del desarrollo de *Drosophila*, lo que hace interesante el estudio en la regulación de los distintos transcritos en las diferentes etapas del desarrollo.

En base a las interacciones genéticas de *tna* con genes que codifican para subunidades del Mediador y de complejos remodeladores de cromatina, se ha propuesto que si TnaA es una E3 ligasa de sumoilación entonces es posible que su(s) blanco(s) sea(n) alguna(s) de las proteínas involucradas en la activación de la transcripción y/o la modificación de cromatina. También podría ser que el blanco fuera una proteína integral de la cromatina como son las histonas (Gutiérrez *et al.*, 2003) como ya se ha reportado previamente donde existe una asociación de la sumoilación de histonas con la regulación transcripcional de ciertas regiones de cromatina (Shiio y Eisenman, 2003).

## **Hipótesis**

Si TnaA es una E3 ligasa de SUMO debería localizarse en sitios que faciliten la interacción con sus blancos.

## **Objetivo General**

Obtener las herramientas necesarias para determinar la localización subcelular de la proteína TnaA.

## **Objetivos Particulares**

- Obtención de una clona completa del cDNA de la región codificante del gen *tonalli*.
- Realizar una fusión de la proteína amarilla fluorescente (YFP) con TnaA.
- Obtener líneas estables de moscas transgénicas que expresen dicha fusión.
- Mapear el sitio de la inserción en diversas líneas y seleccionar algunas de ellas para posteriormente realizar ensayos de complementación donde se demuestre su funcionalidad silvestre.
- Determinar la localización subcelular de TnaA en embriones tempranos de *D. melanogaster*
- Determinación de condiciones de inducción de fusiones Tna-GST para la generación de anticuerpos específicos contra TnaA.

## Metodología

### 1. Obtención de cDNA

Para la obtención de cDNA de TnaA se utilizó la técnica de RT-PCR. A continuación se describirán brevemente los pasos que se llevaron a cabo para dicho propósito.

#### 1.1 Purificación de RNA

El RNA poli-A<sup>+</sup> se extrajo de moscas OreR de 2° instar larvario (Sambrook *et al.*, 1989) y fue proporcionado en el laboratorio por L. Gutiérrez.

#### 1.2 RT-PCR

En esta reacción la enzima transcriptasa reversa sintetiza DNAs complementarios (cDNAs) usando mRNAs como planteados y polímeros de dT (oligo-dT) como primeros, los cuales se aparean con los tramos de poli-A<sup>+</sup> de los mRNAs. Para sintetizar el cDNA, se incubaron 125 ng/μl de RNA poliA<sup>+</sup> a 65°C durante 5 minutos. Después de haber colocado la muestra en hielo, el RNA se puso en presencia de 5 U de transcriptasa reversa murina (BRL), 0.5 μg/μl de oligo-dT, DTT 0.1 M (10X), amortiguador RT (Invitrogen) (5X) y 5 mM de dNTPs durante una hora a 37°C.

#### 1.3 Amplificación por PCR (polymerase chain reaction)

La reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo usando como planteados cDNA y DNA plasmídico, a continuación se describen las condiciones de las reacciones.

1.3.1 cDNA: La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 50 μl. Se añadieron 300 nM de cada oligonucleótido, 200 μM de cada dNTP, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5 μl de amortiguador de reacción y 25 ng del cDNA sintetizado previamente. Después de la primera desnaturalización a 95°C durante 3 minutos, se añadieron 2.6 unidades de la

enzima "Expand High Fidelity polymerase" (Roche). Los parámetros de amplificación fueron: los primeros 10 ciclos, una desnaturalización a 94°C por 15 seg, acoplamiento de los oligonucleótidos a 65°C por 30 seg y extensión a 68°C por 4 minutos; para los siguientes 25 ciclos se emplearon las mismas temperaturas y tiempos con excepción de la extensión donde a 68°C se le fue adicionando 5 seg más por cada ciclo a partir de los 4 minutos iniciales. El último paso fue una incubación de 7 minutos a 68°C para permitir que se completaran todos los productos amplificados que hubieran quedado inconclusos.

1.3.2 DNA plasmídico: La reacción se llevó a cabo en 100 µl. Se añadieron 300 nM de cada oligonucleótido, 200 µM de cada dNTP, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 µl de amortiguador recomendado por el proveedor, 5 ng del DNA plasmídico y 5 U de Taq polimerasa (Roche). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

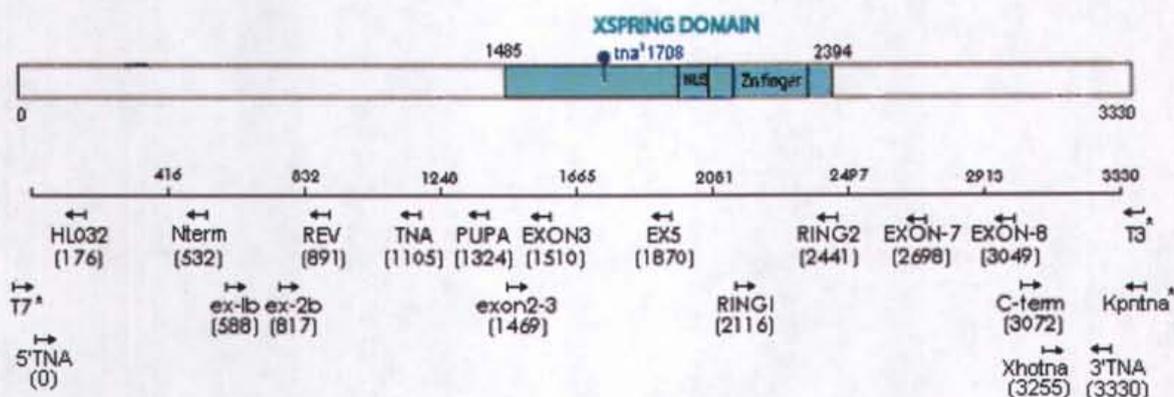
1 ciclo	2 min a 94°C,
10 ciclos	15 seg a 94°C,
	30 seg a 56°C, *
	45 seg a 72°C,
1 ciclo	7 min a 72°C

(\* 20 ciclos más donde la temperatura de apareamiento se cambió a 58°C)

Los oligonucleótidos utilizados en la realización de este trabajo se muestran a continuación en la Tabla 1.

Nombre	Secuencia (5'-3') *
HL032	CGCTGATGCTGCTGCTGG
N-term	GCCGCCACCCATCTGACTGTA
REV	CTGTTGCTGCTGTTGCTGGGTGAG
EXON2-3	CGGCAATCCCTACCAGAATCA
EXON3	GTCAGCGGTGGCGTGGGATT
EX5	GCACACCGCCTTCAAGTAGAG
RING1	AGCAGCAGCAGCAGCAGG
RING2	GATTGCTAGGAACATTCG
EXON-7	GTTGCCACTGAAGCCGTCGTA
EXON-8	CTCCTGCTGCTGCTGTTGGCTATC
C-term	AGCCAACAGCAGCAGCAGGAG
5'TNA	ATGAACCAGCAGGCGGGCTCCTCAAGGGCG
3'TNA	CTAGTCGAATAACGTGGTCAGCAAGTCGTC
Xhotna	TCTTAACACGCCGCCCTC
Kpntna	CCGGGCCCGCGGTACCGTGTCTGAATAACGTGGCCAG
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
T3	CGCATTAAACCCTCACTAAAG
Ex-1b	AACAGCGGCATGATGGGCAAC
Ex-2b	AGGCGGCGCAGCAGCAAATGG
PUPA	TCCGACTCCACCATAGCC
TNA	TGCGTCCGTAACCATTTCTGCTC

**Tabla 1.** Oligonucleótidos utilizados en este trabajo. \*La localización de los oligonucleótidos en la secuencia completa del cDNA de *tnaA* se encuentra representada en la Fig. 8.



**Figura 8.** Localización de oligonucleótidos en la región codificante de *tnaA*. Los números en la barra superior indican los nucleótidos de la región codificante de *tnaA* y los números entre paréntesis, la posición de la primera base de cada oligonucleótido. La dirección 5' 3' de los oligonucleótidos de la Tabla 1 se indican con flechas. \* Son los oligonucleótidos que no aparean con la secuencia de *tnaA*, en el caso de T3 y T7 son homólogos para los extremos del vector pKS y para el Kpntna únicamente la mitad del oligonucleótido aparea con *tnaA* (ver más adelante).

## 2. Clonación en plásmidos

### 2.1 Vectores utilizados

Nombre	Tamaño (Kb)	Características	Resistencia
pBluescript II KS+ (PKS)	2.9	Vector multicopia con <i>lacZ</i> como gen reportero	Ampicilina
PEYFP-N1	4.7	Vector de expresión en mamífero, codifica para la proteína amarilla fluorescente	Kanamicina
PCasper Hs83	8.6	Vector de expresión en <i>D. melanogaster</i> , con el promotor de la Hsp83, marcador <i>w</i> <sup>+</sup>	Ampicilina
PGEX2T	4.9	Vector de inducción para expresar proteínas recombinantes como fusión con GST	Ampicilina

Tabla 2. Vectores utilizados en este trabajo.

### 2.2 Preparación de vector

Se linearizó el vector deseado con la enzima de restricción compatible a los extremos del producto de PCR o al fragmento de DNA que se quería clonar. Se digirió 1 µg del vector en presencia de 2 µl del amortiguador recomendado por el proveedor y 10 U de la enzima de restricción, en un volumen total de 20 µl. Se incubó a 37°C durante 1 h. Los fragmentos de las digestiones se analizaron en un gel por electroforesis (ver más adelante) para posteriormente purificar la banda del fragmento de interés.

Para evitar la religación del vector si los extremos eran cohesivos y afines entre sí, en algunos casos se defosforilaron los extremos 5'-P antes de purificar el vector. La reacción se llevó a cabo por una hora a 37°C en presencia de 0.5 U de la enzima fosfatasa alcalina SAP ("shrimp alkaline phosphatase", USB) y 2.5 µl de amortiguador de reacción. Se inactivó a 65°C durante 15 minutos.

### 2.3 Purificación de fragmentos de DNA

Dependiendo el tamaño del fragmento se trató de las siguientes formas:

a) De 10 a 100 pb: las muestras de DNA se cargaron en geles de acrilamida al 10% (Laemmli). Se corrieron a 120 V durante 40 minutos. Se tiñó el gel con bromuro de etidio (0.5  $\mu\text{g/ml}$ ) en 1x TBE (Tris base 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 1 mM pH 8.0) y se cortó la banda del tamaño esperado. Se purificó el fragmento por el método "Crush and Soak" (Sambrook *et al.*, 1989).

b) De 200 pb en adelante: las muestras de DNA se cargaron en geles de agarosa al 0.8%, se corrieron a 120 V durante 30 minutos. Se tiñó el gel en amortiguador TAE (20 mM Tris acetato, 1 mM EDTA pH 8.0) que contenía 0.5  $\mu\text{g/ml}$  de bromuro de etidio y se cortó la banda del tamaño esperado. Se purificó el fragmento con el kit "GeneClean®" según las especificaciones del proveedor.

### 2.4 Tratamiento con T4 DNA polimerasa

En algunos casos fue necesario clonar fragmentos con extremos rasos y para eso se hizo un tratamiento del DNA que tiene extremos cohesivos, con T4 DNA polimerasa. El fragmento (500 ng/ $\mu\text{l}$ ) fue tratado con 5 U de T4 DNA polimerasa por 20 min a 11°C, en presencia de 1 mM de dNTPs y 3  $\mu\text{l}$  de amortiguador (5X) para así dejar todos los extremos rasos. Se detuvo la reacción a 75°C durante 10 minutos y se precipitó el DNA con 2.5 volúmenes de etanol absoluto, 1/10 de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 1  $\mu\text{l}$  de glucógeno (10 mg/ml). Se dejó una hora a -70°C, se centrifugó a 14,000 rpm por 15 minutos para tomar la pastilla y posteriormente se solubilizó en el volumen de agua necesario para tener una concentración final de 100 ng/ $\mu\text{l}$  de DNA.

## 2.5 Reacciones de ligasas

A lo largo del trabajo se llevaron a cabo ligaciones de productos de PCR o de fragmentos digeridos y purificados de construcciones ya existentes. Al mismo tiempo en cada ensayo, se realizó una reacción control de ligación del vector ligado sobre sí mismo usando 25 ng de DNA del vector y las mismas cantidades de amortiguador, enzima y volumen de reacción que se usaron en la ligación propia del experimento.

Se ligaron 25 ng de vector en una relación inserto/vector de 3:1 y de 5:1 (relación inserto/vector= ng de inserto/ [ng de vector/kilobases del vector] [kilobases del inserto]).

Se incubó la reacción durante 48 h a 16°C en presencia de 1 µl de amortiguador y 5 unidades de T4 DNA ligasa (Invitrogen) en un volumen final de 10 µl.

Después del tiempo de incubación, las reacciones se limpiaron de sales precipitando el DNA con 100 µl de n-butanol y centrifugado a 14000 rpm a 4°C por 10 minutos. Las muestras se lavaron tres veces con etanol frío al 70% y se secaron 3 minutos. Finalmente se resuspendieron en 5 µl de agua bidestilada y filtrada.

## 2.6 Transformación por electroporación de *Escherichia coli* (*E. coli*)

Se transformaron bacterias *E. coli* de la cepa DH5α y BL21-DJ. Se prepararon células electrocompetentes para obtener una eficiencia de transformación de  $1 \times 10^8$  bacterias transformadas por µg de DNA, haciendo lavados exhaustivos con HEPES 1 mM. Se tomaron 2.5 µl de las ligaciones (aprox. 50 ng) y por otro lado se transformaron 25 ng del vector preparado (control para conocer la cantidad de vector superenrollado presente en la muestra). Se electroporaron las células en cada caso y como un control negativo se electroporó la misma cantidad de células sin agregar DNA. Las células sobrevivientes se recuperaron 1 h a 37°C en 1 ml de medio SOB (Sambrook *et al.*,

1989) y posteriormente se plaquearon en cajas con medio LB-agar y el antibiótico para el cual el plásmido confiere resistencia. En el caso de la selección para bacterias resistentes a ampicilina añadimos al medio la concentración de 100  $\mu\text{g/ml}$  y en bacterias seleccionadas por su resistencia a kanamicina se agregó a una concentración de 30  $\mu\text{g/ml}$ . Para las colonias transformantes con el vector pKS utilizamos además un segundo sistema de selección por degradación de Xgal (5-bromo-4-cloro-3-indol- $\beta$ -D-galactósido) en presencia del inductor IPTG (isopropil-1-tio- $\beta$ -D-galactósido) de la enzima codificada por *lacZ*. En este sistema la degradación del sustrato genera colonias con coloración azul si el gen *lacZ* no ha sido interrumpido por el evento de clonación del fragmento deseado. Por ende se seleccionaron colonias blancas  $\text{Ap}^{\text{R}}$  como posibles candidatas donde la ligación había sido exitosa. Le añadimos al medio LB 25  $\mu\text{g/ml}$  de IPTG y 25  $\mu\text{g/ml}$  de Xgal.

## 2.7 Análisis de plásmidos recombinantes

De las colonias candidatas se extrajeron los plásmidos por el método de lisis alcalina. Se digirieron 500 ng de DNA plasmídico con 5 U de cada una de las enzimas apropiadas con el buffer sugerido por el proveedor en un volumen total de 20  $\mu\text{l}$ . La reacción se incubó a 37°C durante 1 h y se analizaron los patrones de restricción de los plásmidos obtenidos para corroborar la presencia del fragmento clonado (en base a su tamaño en kb y sitios de restricción internos). Los DNAs digeridos se analizaron en un gel de agarosa o de acrilamida dependiendo de su tamaño. Se comparó el patrón de restricción obtenido con el esperado si la ligación del fragmento de DNA en el vector hubiera sido exitosa y se seleccionaron los plásmidos con el patrón correcto.

Nota: Cada una de las construcciones que se realizaron a lo largo de este trabajo, se llevaron a cabo bajo los controles de ligación correspondientes al igual que las condiciones en las que se transformaron las bacterias para cada una de ellas.

### 3. Secuenciación de los plásmidos construidos

Para verificar que la clona obtenida estuviera en el marco de lectura correcto y/o que la enzima "Expand High Fidelity Polymerase" no hubiera introducido mutaciones en el caso de los fragmentos amplificados por PCR, se secuenciaron varias de las clonas obtenidas.

El DNA de los plásmidos seleccionados se purificó por el kit de purificación de plásmidos de QIAGEN siguiendo las instrucciones del fabricante y se enviaron 750 ng de plásmido más 5 pmol de oligonucleótido requerido para cada reacción a la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM. Las secuencias obtenidas se analizaron con el programa Edit View (Applied Biosystems). En general se leyeron entre 300 y 400 bases de los fragmentos deseados incluyendo los sitios utilizados para la clonación. En el caso del vector con la clona del cDNA *tnaA* se leyó el gen completo que corresponde a un tamaño de 3330 pb.

### 4. Líneas de *Drosophila melanogaster* empleadas

$w^{1118} / w^{1118}$ : línea con ojos blancos, marcador asociado al cromosoma X. Se utilizó para introducir el pCasper y generar las líneas transgénicas.

$tna^1 / TM6B$ : *tna*<sup>1</sup> es una mutación puntual inducida por EMS (Gutiérrez *et al.*, 2003).

$w^{1118} / w^{1118}$ ; *CyO/Sp*; *MKRS/TM2*: línea "Triple balancer" (TB) se utilizó para marcar todos los cromosomas y permitir el mapeo del elemento P en las distintas líneas transgénicas.

$w^{1118} / w^{1118}$ ; +/+; +/TM6C, *cu*, *Sb*, *e*, *ca*: se utilizó para cambiar el fondo del alelo de *tna<sup>1</sup>* para los ensayos de complementación.

En la siguiente tabla se muestran los distintos balanceadores y marcadores utilizados en este trabajo.

<b>Cromosoma</b>	<b>Balanceador</b>	<b>Marcador</b>	<b>Fenotipo</b>
1 ó X		<i>white (w)</i>	Ojos blancos
2	<i>CyO</i>	<i>Curly (CyO)</i>	Alas curvadas
2		<i>Sternopleural (Sp)</i>	Aumento en el número de microquetas en la placa esternopleural
3	<i>TM2</i>	<i>Ultrabithorax(Ubx)</i>	Quetas en los halterios
3	<i>MKRS</i>	<i>Stubble (Sb)</i>	Quetas cortas
3	<i>TM6B ó TM6C</i>	<i>Tubby (Tb)</i>	Larvas y pupas pequeñas
3		<i>ebony (e)</i>	Cutícula más oscura

Los "stocks" y las cruzas se mantuvieron a 25°C en un medio conocido como Super comida el cual tiene un alto contenido calórico.

#### Super comida

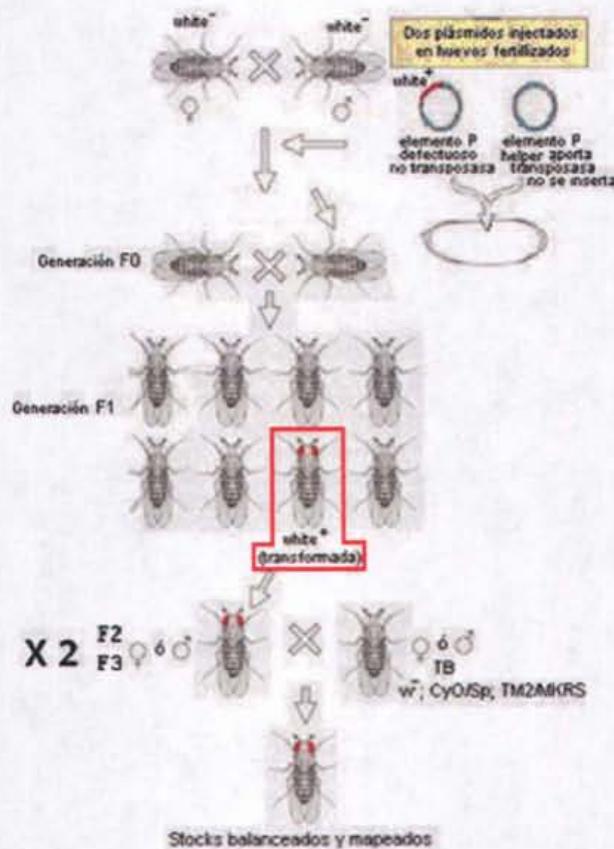
10 g Agar  
 20 g Extracto de levadura  
 80 g Levadura entera  
 20 g Peptona  
 30 g Sacarosa  
 60 g Glucosa  
 0.5 g MgSO<sub>4</sub>•6H<sub>2</sub>O  
 0.5 g CaCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O  
 6 ml Ácido Propiónico  
 10 ml Nipagine  
 Agua destilada para aforar a 1 L

Se mezclan bien todos los compuestos a excepción del ácido propiónico y el Nipagine, para disolverse en un litro de agua destilada. Se deja en el autoclave por 30 minutos a una temperatura de 120°C y 21 psi. Agregar el ácido propiónico y el Nipagine una vez que la mezcla se encuentre a temperatura ambiente. Por último se vierte en viales o botellas de plástico para dejar solidificar.

## 5. Obtención y mapeo de inserciones en líneas transgénicas

### 5.1 Inyección de embriones

La inyección del plásmido pCasper HS83 la llevó a cabo la compañía Genetic Services, Inc. (<http://www.geneticservices.com>). Consistió en microinyectar embriones de la línea  $w^{1118}/w^{1118}$  antes de la formación de las células polares con el plásmido pCasper Hs83: TnaA-YFP. El pCasper Hs83 contiene secuencias del elemento P transponible que contenía la fusión TnaA-YFP y el marcador  $white^+$ , ambos flanqueados por las secuencias invertidas repetidas del elemento P lo cual permite su inserción en el genoma de *Drosophila*. Además los embriones fueron coinyectados con un plásmido "helper" que aportó la transposasa necesaria para insertar el elemento P (Spradling, 1987) (ver Fig. 9).



**Figura 9.** Esquema que representa el procedimiento utilizado para generar líneas independientes que contenían el transgén P[( $w^+$ ) TnaA<sup>+</sup>-YFP] marcado con el gen  $white^+$  (recuadro rojo). Los plásmidos que contenían tanto al transposón como el "helper", fueron microinyectados en embriones preblastodérmicos  $w^{1118}/w^{1118}$ , en la generación denominada F0.

## 5.2 Mapeo de la inserción y ensayo de complementación

Se recuperaron las larvas con inserciones y se establecieron distintas líneas transgénicas. Para poder identificar el cromosoma en donde ocurrió la inserción, cada una de las moscas (♂ ó ♀) que expresaban el gen marcador  $w^+$  (ojos rojos) asociado al transgén, se cruzó con cinco moscas del sexo opuesto de la línea que tenía marcados el cromosoma 2 y 3 con distintos marcadores dominantes (TB,  $w^{1118} / w^{1118}$ ; CyO/Sp; MKRS/TM2).

Se evaluó la progenie de todas las cruzas para determinar el número de líneas que obtuvimos con inserción en cada uno de los cromosomas. Para discernir entre uno u otro cromosoma se cuantificó el número de individuos obtenidos para cada clase de la progenie y se asoció la presencia del transgén ( $w^+$ ) a los marcadores de cada uno de los cromosomas. Al conocer el cromosoma en el que se encontraba la inserción de cada línea, se construyeron líneas estables de varias de ellas.

Para los ensayos de complementación, las cruzas se realizaron con 3 machos y 5 hembras con el genotipo correspondiente. Las cruzas se mantuvieron a 25°C en súper comida. Se cuantificó la clase que presentaba los marcadores esperados en cada caso de toda la progenie obtenida.

## 6. Localización subcelular de TnaA

### 6.1 Colecta de embriones

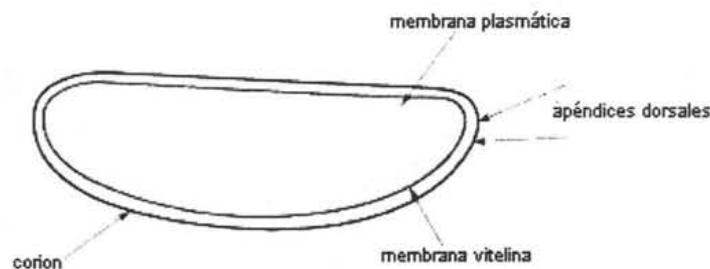
Se utilizaron botellas de plástico con pequeños orificios en la parte superior para permitir la entrada de aire. Se introdujeron alrededor de 50 moscas jóvenes en las botellas un día antes de la colecta para que se adaptaran al cambio de comida. Las moscas fueron alimentadas con una pasta de levadura (levadura de pan con agua).

Esta se untó en platos de colecta, los cuales fueron colocados en las botellas como tapas.

Para preparar los platos de colecta se mezclaron 3 g de agar y 5.4 g de sacarosa con 80 ml de agua. La mezcla se calentó hasta fundir la agarosa e inmediatamente se añadieron 2.4 ml de etanol absoluto, 1.5 ml de ácido acético glacial y 20 ml de jugo de manzana. El medio se vació en platos de cultivo de 35 mm. Las placas se guardaron a 4° C. Para colectar los embriones las placas se embarraron con un poco de pasta de levadura y se sellaron sobre las botellas. Se hicieron colectas de tres y doce horas.

## 6.2 Preparación de los embriones para microscopía

Para observar embriones es necesario el desprendimiento de dos de las capas que lo protegen. En la Fig. 10 se muestra la localización de las distintas cubiertas del embrión.



**Figura 10.** Membranas del embrión de *Drosophila melanogaster*. Las capas removidas para la fijación de embriones son el corion y la membrana vitelina.

a) Fijación de embriones: Los embriones se decorionaron 3 minutos en hipoclorito al 50%. Se lavaron con agua y se pasaron a un vial de centelleo. Posteriormente se trataron con una solución fijadora que contiene 1:1 de 4% paraformaldehído en PBS y n-heptano. Después de veinte minutos se removió la fase acuosa y se agregaron 3 ml de metanol para desvitelinizar los embriones agitando fuertemente por 10 seg. Ya que los embriones se fueron al fondo del vial, se extrajo la fase orgánica junto con los embriones que no se precipitaron (no desvitelinizados). Los embriones se lavaron una

vez más con metanol y se transfirieron a otro tubo. Una vez extraída la mayor parte del metanol, se lavaron dos veces con 1 ml de una solución que contenía 0.1% Tritón en PBS. Después de que los embriones se precipitaron, se extrajo la solución y se añadieron 150 µl de citiflúor (Ted Pella, Inc), compuesto que permite que no se pierda la fluorescencia en períodos cortos. Finalmente se montaron en un portaobjetos y se cubrieron con un cubreobjetos para posteriormente poderlos ver en microscopía de fluorescencia y confocal.

b) Tinción con yoduro de propidio: algunos de los embriones fijados después de haberles extraído la mayor cantidad de metanol, se lavaron en una solución BP (ver abajo) durante 30 minutos. Después se permeabilizaron por dos horas en una solución BPT (ver abajo). Transcurrido el tiempo, se lavaron los embriones dos veces por 5 minutos con BP. Se incubaron 2 h a 37°C en presencia de RNAsa/BP (se añadieron 40 µl de RNAsa (10 mg/ml) a 1 ml de BP). Se hicieron 3 lavados de 5 minutos con BP para después añadirles una solución de BP con yoduro de propidio (10 µg/ml). Después de 20 minutos, se lavaron tres veces los embriones con BP para finalmente montarlos en un portaobjetos con citiflúor.

<b>PBS</b>	<b>BP</b>	<b>BPT</b>
8 g NaCl 0.2 g KCl 0.24 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1.44 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 7.4	1% BSA 1X PBS	10% BSA 1X PBS 0.1% Tween-20

### 6.3 Imágenes por microscopía

Las preparaciones se observaron con microscopía de fluorescencia y confocal con diferentes objetivos. Las imágenes fueron procesadas con el programa Adobe Photoshop (Adobe Systems).

### 7. Fusiones de TnaA-GST

Con el objetivo de obtener diferentes herramientas (entre ellas anticuerpos específicos anti-TnaA) que nos permitan determinar la localización de TnaA entre otras cosas, se buscaron las condiciones de inducción óptimas para expresar fragmentos de TnaA fusionadas a GST. Las clonas utilizadas fueron construídas por Gutiérrez *et al.* (datos no publicados). El sistema que se utilizó fue el pGEX (Smith y Johnson, 1988), el vector pGEX2T incluye a la glutatión-S transferasa (GST) (Amersham Pharmacia Biotech). La cepa huésped fue la BL21-DJ, *E. coli* deficiente en proteasas para evitar que se degrade la proteína recombinante. Para obtener las condiciones óptimas para la inducción de la expresión de la proteína de fusión se probaron diversas variables.

Tiempo de inducción: 3 y 4 hrs.

Temperatura de inducción: 30° y 37°C.

Concentración de IPTG: 0, 0.4 y 1 mM.

La inducción de las proteínas recombinantes se llevó a cabo de la siguiente manera:

Primero se tomó una colonia fresca de la cepa con la fusión de GST y como control una colonia de la cepa que solo tenía transformado el vector con la GST. Se inocularon 3 ml de medio LB con ampicilina 100 µg/ml y se dejó crecer toda la noche a 37°C. De este precultivo se inoculó una dilución 1:50 y se dejó 1.5 a 2 horas creciendo hasta que alcanzó una D.O. ~0.5

Posteriormente se adicionó el IPTG necesario para las distintas concentraciones que se probaron y se dejó 3 ó 4 horas incubándose a las dos temperaturas que probamos. Para el caso del control no se analizaron todas las variables pues ya están bien establecidas las condiciones bajo las cuales se optimiza la inducción de la GST.

Al finalizar el tiempo de inducción, se centrifugaron las bacterias a 12,000 rpm durante 1 minuto y se desechó el sobrenadante. Se resuspendió en 950  $\mu$ l de buffer de lisis y 50  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol. Se agitó hasta disolver en su totalidad y se hirvió cada muestra durante 10 minutos. De cada muestra se cargaron  $\sim$ 20  $\mu$ l en un gel de acrilamida al 10% (manual de instrucciones de cámaras de electroforesis de Bio-RAD). Además se corrieron 5  $\mu$ l de un marcador de peso molecular (Bio-Rad) que se calentó a 40°C previamente.

Al terminar la electroforesis (130 V durante 1h), se tiñó con una solución de azul de Coomassie por una hora y después se lavó con una solución (etanol al 30% y ácido acético al 10%) durante la noche hasta quitar la sobretinción.

Buffer de lisis:

3.55 ml agua desionizada  
1.25 ml Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8  
2.5 ml glicerol  
2.0 ml SDS 10%  
0.2 ml azul de bromofenol 0.5%  
Guardar a temperatura ambiente

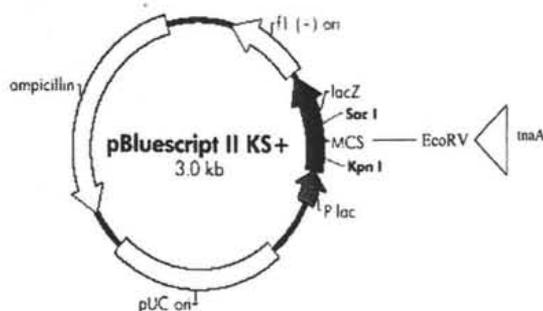
Azul de Coomassie:

22.5 ml metanol  
4.6 ml ácido acético  
0.125 g azul de Coomassie  
22.7 ml de agua desionizada

## Resultados

### 1. Clonación de *tnaA*

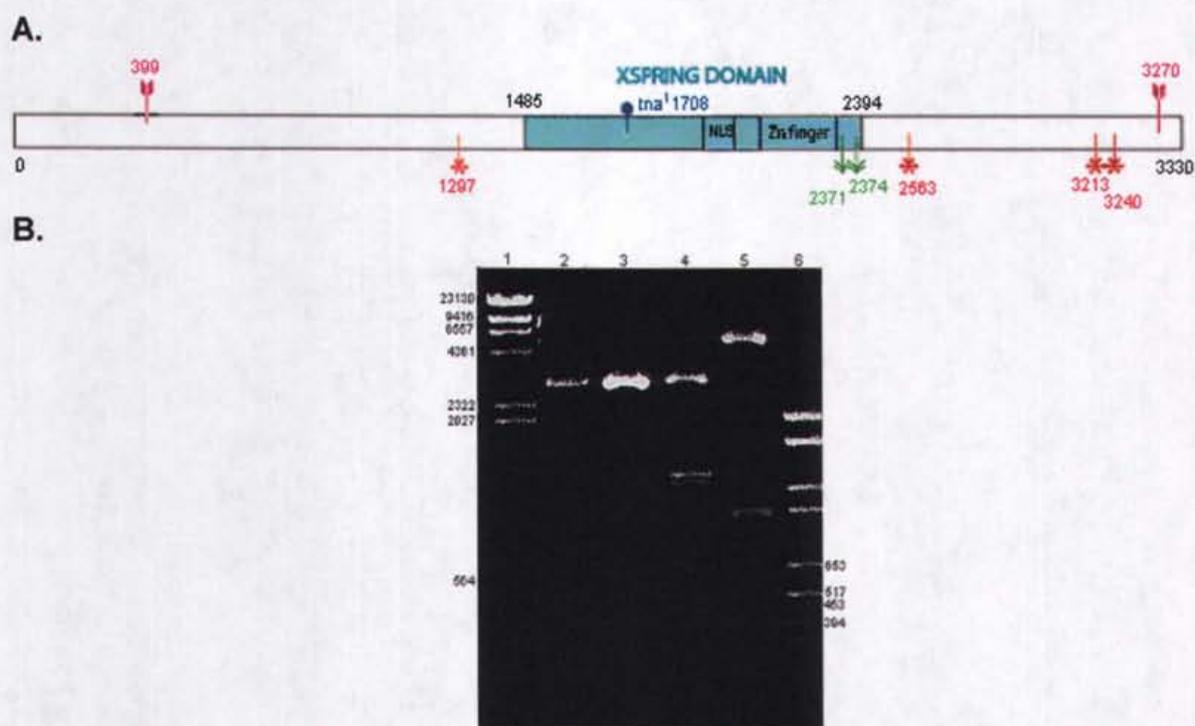
Con el objetivo de obtener una clona completa del cDNA de *tnaA* se realizaron los siguientes pasos. El cDNA se amplificó a partir de RNA poliadenilado de larvas (línea Oregon R) de 2° instar por RT-PCR. Se eligió este estadio ya que el 2° y 3° instar larvario son los estadios donde se ha detectado por Northern blot, una mayor cantidad del transcrito *tnaA* (Gutiérrez *et al.*, 2003). Se utilizaron los oligonucleótidos 5'TNA y 3'TNA (ver Tabla1 en metodología) que contienen las secuencias correspondientes al inicio (incluyendo el ATG) y el final (incluyendo el TAG) de la región codificante de *tna*. Se obtuvo un producto de 3330 pb que correspondía al tamaño de la región codificante esperada del gen. El fragmento de DNA fue rellenado con T4 DNA polimerasa para que los extremos quedaran rasos. Se clonó en el vector pKS en el sitio de restricción *EcoRV* (Fig. 11) y el plásmido recombinante se usó para transformar bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$ .



**Figura 11.** Mapa del vector pBluescript II KS (pKS) donde se indica el sitio de restricción donde se insertó *tnaA* dentro del sitio múltiple de clonación.

Se obtuvieron varias colonias transformantes de las cuales se analizaron 40 colonias positivas (resistentes a ampicilina y de color blanco) en presencia de Xgal e IPTG. Cada una fue digerida con la enzima de restricción *Bam*HI para confirmar que el patrón de digestión era el esperado. Como el vector fue cortado con una misma enzima y el inserto estaba rellenado por los extremos, la unión de los extremos rasos y el vector podía generar plásmidos con el fragmento orientado en ambas direcciones.

De todas las colonias candidatas obtuvimos dos que presentaron el patrón de restricción esperado y en orientaciones opuestas. En la Fig. 12A se muestran los sitios de restricción para *Bam*HI, *Cl*al y *Xho*I de *tnaA*. En la Fig. 12B se muestran únicamente las digestiones con *Bam*HI, *Cl*al y *Eco*RI/*Xho*I de la clona en sentido 5'-3'. El vector pKS tiene un sitio en el MCS para cada una de las enzimas utilizadas. A este plásmido lo llamamos pKS-*tnaA*<sub>TGA</sub>.



**Figura 12. Clonación del cDNA de *tnaA* en pKS. A.** Mapa de restricción de *tnaA* para las enzimas  $\downarrow$  *Bam*HI  $\downarrow$  *Cl*al y  $\uparrow$  *Xho*I. En azul se muestra la región que codifica para el dominio XSPRING.  $\uparrow$  indica el sitio donde se generó el codón de término del alelo *tna*<sup>T</sup>, NLS: señal de localización nuclear. **B.** Patrón de restricción de plásmido pKS-*tnaA*<sub>TGA</sub>, inserto clonado en la orientación 5'-3'. 1:  $\lambda$ HindIII, 2: vector pKS linearizado (2900pb), pKS-*tnaA*<sub>TGA</sub> digerido con 3: *Eco*RI/*Xho*I (2900, 2871, 400 y 85 pb) 4: *Bam*HI (2990, 1321, 1266, 650 y 27 pb), 5: *Cl*al (5211, 968 y 60 pb) y 6: marcador de peso molecular VI (Boehringer) (tamaño de fragmentos de marcadores de peso molecular a los lados).

## 2. Secuencia de cDNA de *tnaA*

Como se utilizó la técnica de PCR y sabemos que la polimerasa puede introducir mutaciones con una alta frecuencia al amplificar los productos, fue necesario comprobar la identidad e integridad de la secuencia del fragmento clonado.

Los oligonucleótidos utilizados para la secuencia fueron los siguientes: HL032, N-term, REV, EXON2-3, EXON3, EX5, RING1, RING2, EXON-7, EXON-8, C-term, ex-1b, ex-2b,

PUPA y TNA los cuales cubrían las regiones del cDNA mostradas en la Fig. 8 (ver metodología), que sirvieron para secuenciar en su totalidad la clona pKS-*tnaA*<sub>TGA</sub>. Para secuenciar los extremos 5' y 3' del fragmento utilizamos los oligonucleótidos, T7 y T3, homólogos a secuencias del vector.

En la Fig. 13 se observa la secuencia obtenida de la clona pKS-*tnaA*<sub>TGA</sub>. En este plásmido el cDNA *tnaA*<sub>TGA</sub> proviene de la línea OreR y la reportada por Gutiérrez *et al.* (2003) proviene de la línea Iso-I. Como se puede observar existen diferencias. Varios de los cambios de una base por otra no tienen efecto a nivel de proteína por la redundancia en el código genético y los aminoácidos que cambian (solo 3) se resaltan en negro en la Fig. 13. Los cambios observados en la secuencia de *tnaA*<sub>TGA</sub> son polimorfismos entre el gen en la línea OreR y en la Iso-I.

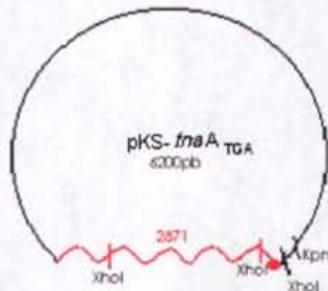
Anteriormente se habían observado por Gutiérrez, L. (datos no publicados) los mismos cambios de aminoácidos en otras clonas aisladas de manera independiente, lo cual nos indicó que no se trataba de una mutación propia de la clona seleccionada.

MNQQAGSSRA	PATGGQISPP	GATTVGVEQQ	QHLQQQHQQQ	YYNQ <b>H</b> QQQQQ	50
QQQYQQQHQR	DNFLAYQQQQ	QQQQQQQQQL	QRSGGGGGNF	MLGNDLVGGD	100
SLRSLNNTFG	PNSEFTSLGG	ANSSASSSLS	GLSSSSSQGY	TGMVAASQQH	150
QQQQPHHHQQ	QQQQQQQHM	GSMDAMGGYS	QMGGGMHPGP	NSGMMGMNMG	200
QYMNGGSGQG	GYNGAQGMGM	GYGGGSGMGP	QRHHQMTPMN	QMQNMSMGPG	250
VGGSGGMMGG	MNPLQQQAAQ	QQMGMNMPMA	KMQGMANGGY	PQQAPPSLTQ	300
QQQQQQRRM	APYPHPQMHM	AQKRAAAGVG	GAGGMYPGNP	MQQQQAQMYG	350
NQQMHPSGG	GVPLPMQAGG	AGNGYGRSGP	<b>M</b> AGNGGYGR	MSAGNGMGPT	400
GGPVMGPMGP	GGMTAGGMGP	GPGCMSQQR	MPQSGGGMP	GVGYGGVGG	450
ASHQQGFYPG	SGQSAGMQQA	GGMCPAGPGA	VATTGNPYQN	QGFQQNYQHS	500
PVPGNPTPPL	TPACSVPYVS	PNPDIKPPMD	NSEEMRLTFP	VRDGILAPF	550
RLLHNLVSNS	HVFHLKQNVY	NTLMCRNDLE	LQLKCFHQDD	RQMNTNWPHT	600
VTVSANATPL	NIERSEKNST	ALRPLYLKAV	CQPGRNTLQL	TASSCCCSHL	650
FVLQLVHRPS	VRQVLQTLHK	RNLLPLEHSV	QKIKRNLSP	EANAGPDATP	700
QQQQQQGGGQ	QCAKISLKCP	<b>I</b> TKSRIRLPA	<b>R</b> GHECKHVQC	<b>F</b> DLEAYLMIN	750
<b>S</b> ERGSWRCPE	<b>C</b> SKSAITDTL	EIDQYIWAII	NTLGNSDVDE	VIIDSSANWR	800
ALQHNGGMPN	APPPSNVPSN	PSGSGSNSG	NGSVNPTLPV	IKQELCDDIA	850
KVMSPGSTQL	PTWDSAQAMS	PYNMMDMNSI	ASGNMMGNGG	NTNQHGRRSS	900
YDGFSGNHSD	GSGGLPGGDG	GVNSLDQLNA	MEKSLSDQMP	HTPH <b>A</b> PGAAS	950
HPMTPGGPPS	VSSSHNEPIS	GGTPNANGSG	SATNGSGNNN	SSTGHNSPQT	1000
PGTPSRMGGG	MGGSGSADSQ	QQQEQLLNS	LMSSQTQLKF	SESDLSAELQ	1050
SFDAAAAAN	DTAHDNLNLLQ	DVDPMEILSY	LDPQPDNLTP	PSSGSSNNA	1100
SDDLATLFD					

**Figura 13. Secuencia de aminoácidos del cDNA del plásmido pKS-*tnaA*<sub>TGA</sub>.** En este plásmido el cDNA de *tnaA* proviene de la línea OreR con respecto a la Iso-I (BDGP). Los cambios de aminoácidos se resaltan en negras. La histidina (H) es una inserción y las dos alaninas (A) sustituyen una valina (V) y una treonina (T) respectivamente. La región de aminoácidos que abarca el dominio SP-RING se encuentra subrayada.

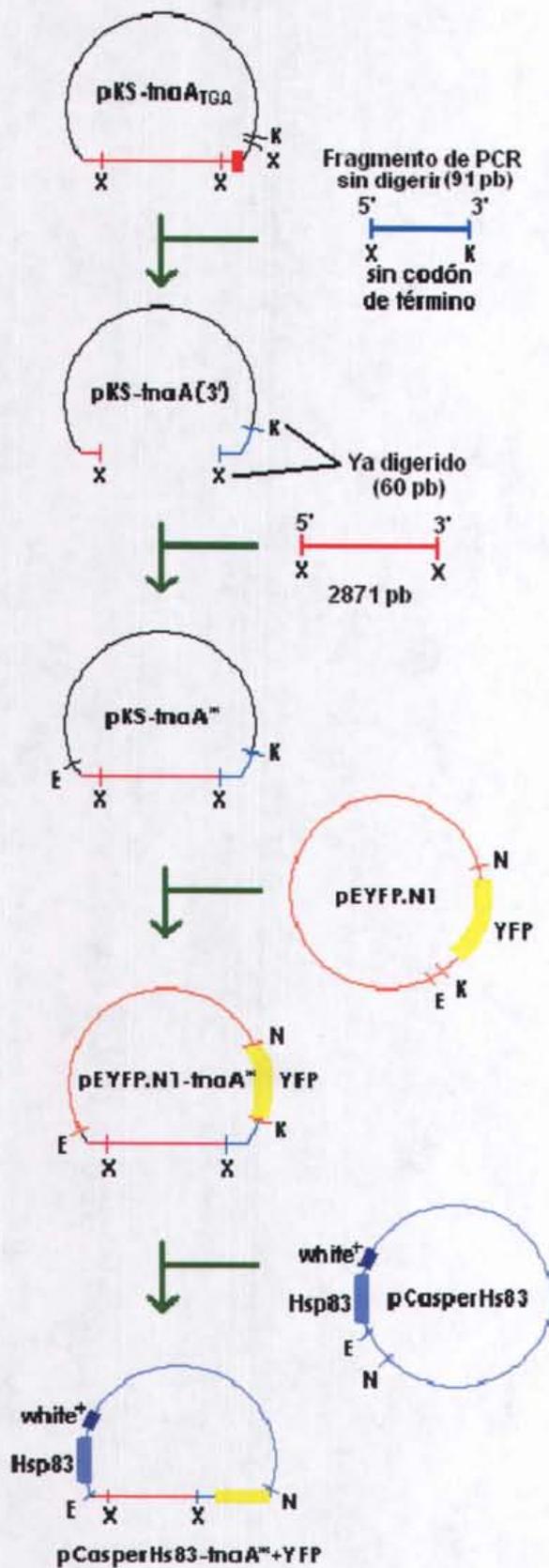
### 3. Fusión de TnaA con YFP

Como se muestra en la Fig. 14, la secuencia de la clona completa de *tnaA* tiene el codón de término (TAG). Como este codón impediría la expresión de la fusión TnaA-YFP fue necesario eliminarlo para poder fusionar la proteína YFP en el extremo carboxilo terminal de TnaA.



**Figura 14. Esquema de la clona pKS-*tnaA*<sub>TGA</sub>.** Se muestran los sitios de restricción *XhoI* y *KpnI* tanto del plásmido (2900 pb) como del cDNA de *tna* (3300pb). (● = codón de término)

Con este objetivo se diseñó una estrategia de varios pasos para eliminar el codón de término y dejar los sitios de restricción apropiados para clonar en fase en el vector, el cDNA de *tnaA* con el gen *YFP*. Esta estrategia se muestra completa en la Fig. 15 y se describirá paso a paso en las siguientes secciones.



A) Mutagénesis por PCR del fragmento 3' de *tnaA*

B) Sustitución del extremo 3' de *tnaA*

C) Reconstitución del fragmento original *XhoI-XhoI* (2871pb) de *tnaA*

D) Clonación de *tnaA\** en el vector pEYFP-N1

E) Clonación de *tnaA\*-YFP* en el vector pCasper Hs83

Figura 15. Estrategia experimental para la fusión *tnaA-YFP*. Sitios de restricción X= *XhoI*, E= *EcoRI*, K= *KpnI* y N= *NotI*. Codón de término (■).

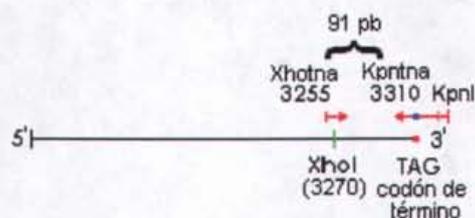
### A) Mutagénesis por PCR del fragmento 3' de *tnaA*

Se mutagenizó la clona pKS-*tnaA*<sub>TGA</sub> por PCR con el objetivo de crear un nuevo extremo 3' de *tnaA* con las siguientes características:

1. El codón de término deletado.
2. Un nuevo sitio de restricción *KpnI* que permitiera unir este fragmento sintetizado a la clona pKS-*tnaA*<sub>TGA</sub>.

Se diseñaron dos oligonucleótidos (Tabla1 en metodología). El utilizado como primero 5' (Xhotna) contiene la secuencia del cDNA *tnaA*<sub>TGA</sub> que corresponde al sitio *XhoI* en el nucleótido 3270 (Fig. 12 y 16).

El oligonucleótido utilizado como primero del extremo 3' (Kpntna) contiene la secuencia 5'CCGGGCCCGCGGTACCGTGTGCGAATAACGTGGCCAG3'. Del nucleótido 1 al 18 se tiene una secuencia con un nuevo sitio de restricción *KpnI* (GGTACC, secuencia subrayada) y bases extra (espaciadoras) que permiten el corte de la enzima. Del nucleótido 19 al 36 se tiene la secuencia de *tnaA* correspondiente al sitio 3327 al 3310 (Fig. 16).



**Figura 16. Esquema del extremo 3' de *tnaA* para eliminar el codón de término.** Se indican los primeros Xhotna y Kpntna (flechas). En azul la posición del codón de término (TAG) eliminado.

La amplificación con los primeros Xhotna y Kpntna genera un fragmento de 91 pb. La síntesis con el oligonucleótido Kpntna genera de la cadena 3'-5', una secuencia sin el codón de término de *tnaA* con un nuevo sitio *KpnI* en el extremo 3'.

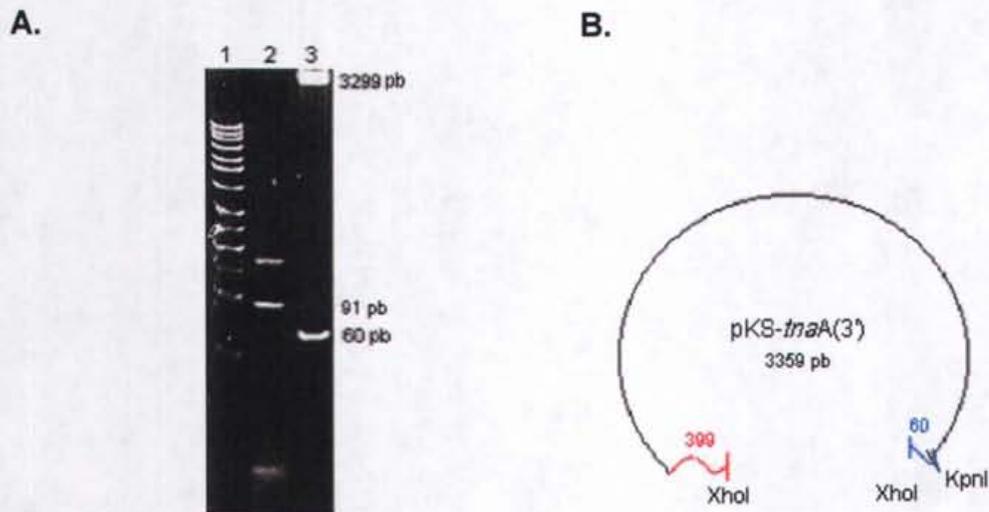
## B) Sustitución del extremo 3' de *tnaA*

La amplificación con los primeros *Xho*tna y *Kpn*tna genera un fragmento de 91 pb. Este fragmento se muestra en la Fig. 17A (carril 2). Aquí se observan tres bandas donde la de menor tamaño corresponde a los oligonucleótidos utilizados en el PCR y la más grande a un producto inespecífico de la amplificación.

El fragmento de DNA de 91 pb se digirió con una doble digestión *Xho*I/*Kpn*I para poder reemplazar el fragmento del cDNA original. Al digerir con estas enzimas se pierden algunas bases (secuencias espaciadoras) de los extremos 5' y 3' del fragmento de 91 pb, lo cual genera un fragmento de 60 pb que sustituye al fragmento *Xho*I/*Kpn*I de la clona original. El nuevo extremo 3' de *tnaA* (60 pb) se purificó y finalmente se ligó al vector para sustituir el extremo que llevaba el codón de término.

El vector utilizado se preparó digiriendo el plásmido pKS-*tnaA*<sub>TGA</sub> con *Xho*I/*Kpn*I, lo cual liberaba tanto al extremo 3' de *tnaA* como al fragmento de 2871 pb que se encontraba entre dos sitios *Xho*I (Fig. 14). El fragmento *Xho*I-*Xho*I (2871 pb) posteriormente se reconstituyó.

La identidad del plásmido se verificó en las colonias resistentes a ampicilina con una doble digestión *Xho*I/*Kpn*I (carril 3 de la Fig. 17A) donde los fragmentos de DNA esperados (3299 y 60 pb) se calcularon en base al mapa de restricción de la Fig. 17B. A este plásmido le llamamos pKS-*tnaA*(3').



**Figura 17. Generación del plásmido pKS-*tnaA*(3').** A. 1: marcador ladder 50pb, 2: obtención por PCR del fragmento *XhoI-KpnI* (91 pb) y 3: plásmido pKS-*tnaA*(3') digerido con *XhoI/KpnI*. B. Mapa del plásmido pKS-*tnaA*(3'). El fragmento *XhoI-KpnI* sin codón de término (azul). Extremo 5' de la clona pKS-*tnaA*<sub>TGA</sub> (rojo). Sitios de restricción *XhoI* (*tna*: en 399 y 3270) y *KpnI* (vector: en MCS) indicados.

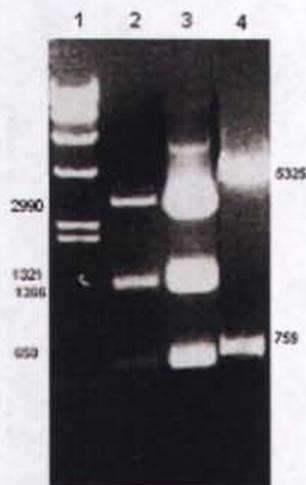
Se purificó una de las clonas correctas por QIAGEN y se secuenció para corroborar que el marco de lectura era el correcto y además que la sustitución se había realizado como lo habíamos planeado. No se encontraron cambios y la sustitución se efectuó como se esperaba.

### C) Reconstitución del fragmento original *XhoI-XhoI* (2871 pb) de *tnaA*

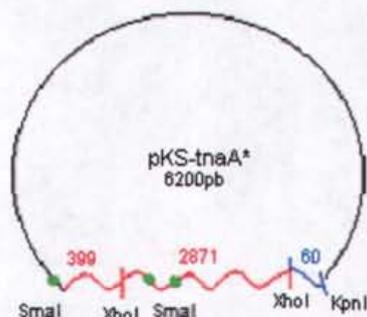
El vector pKS-*tnaA*(3') se digirió con *XhoI* y se defosforiló para evitar la religación de sus extremos. A este vector se ligó el fragmento original *XhoI-XhoI* de 2871 pb. el cual se purificó de la digestión *XhoI* del plásmido pKS-*tnaA*<sub>TGA</sub>. Los plásmidos de las clonas analizadas se digirieron con *Bam*HI y *Sma*I. Como el fragmento *XhoI-XhoI* (2871 pb) se podía ligar en ambas orientaciones, se utilizaron estas enzimas por tener sitios de reconocimiento asimétricos dentro del fragmento de interés. Esto nos permitió elegir el plásmido donde el fragmento *XhoI-XhoI* se ligó en la orientación adecuada. Los fragmentos esperados para *Bam*HI fueron 2990, 1321, 1266, 650 y 27 pb como ya se habían observado para la identificación de la clona pKS-*tnaA*<sub>TGA</sub> (Fig. 12A) y para *Sma*I

5325, 759 y 264 pb, calculados del mapa de la construcción que nombramos pKS-*tnaA\** (Fig. 18).

A.



B.



**Figura 18. Generación del plásmido pKS-*tnaA\**.** A. 1:  $\lambda$ HindIII, 2: pKS-*tnaA*<sub>TGA</sub> digerido con *Bam*HI, 3: pKS-*tnaA\** digerido con *Bam*HI, tamaño de bandas esperadas de carril 2 y 3 a la izquierda. 4: pKS-*tnaA\** digerido con *Sma*I, tamaño de bandas esperadas a la derecha. B. Mapa de pKS-*tnaA\** donde se muestra el cDNA completo de *tnaA* con su extremo 3' modificado. Sitios de restricción indicados: *Kpn*I (vector: MCS), *Xho*I (*tnaA*: 399 y 3270) y *Sma*I (•)(*tnaA*: 741 y 1005) (vector: MCS).

#### D) Clonación de *tnaA\** en el vector pEYFP-N1

El siguiente paso fue clonar el cDNA *tnaA\** en el vector pEYFP-N1 (Clontech) para obtener la fusión *tnaA*-YFP. Primero se digirió el plásmido pKS-*tnaA\** con *Eco*RI y *Kpn*I, sitios de restricción que se encontraban en los límites de cada uno de los extremos del inserto *tnaA\**. El vector pEYFP-N1 se digirió con las mismas enzimas lo que permitió fusionar *tnaA\** en el marco de lectura apropiado para la traducción de ambos genes. Se extrajo el plásmido de algunas clonas seleccionadas por la resistencia a kanamicina conferida por el plásmido pEYFP-N1. Los plásmidos se digirieron con *Xho*I donde los fragmentos esperados si la ligación *tnaA\** era exitosa fueron de los siguientes tamaños: 4744, 2671 y 420 pb (ver Fig. 19). A esta construcción le asignamos el nombre de pEYFP.N1-*tnaA\**.

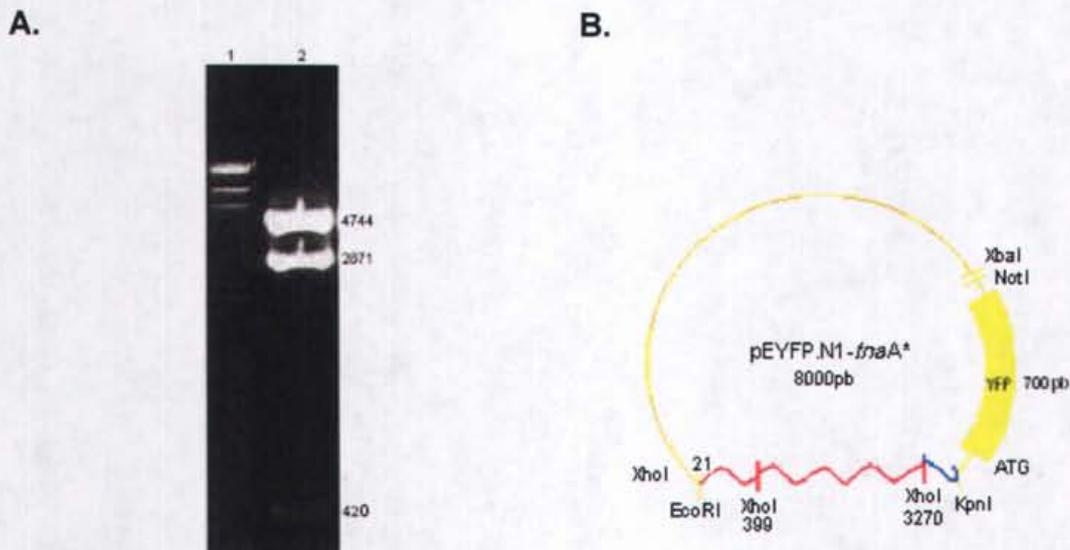
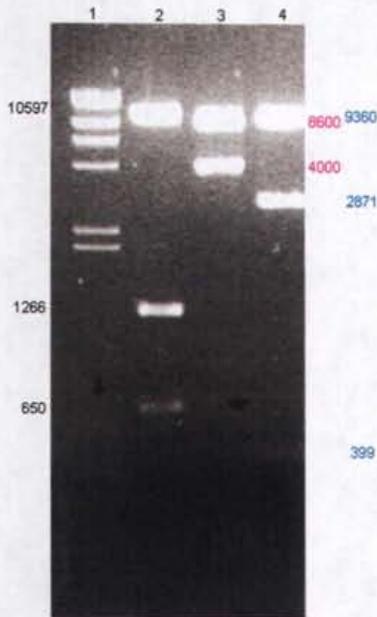
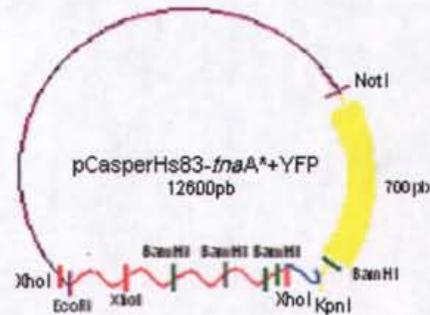


Figura 19. A. Construcción del plásmido pEYFP.N1-*tnaA\**. A. 1:  $\lambda$ HindIII y 2: pEYFP.N1-*tnaA\** digerido con *XhoI*, tamaños esperados a la derecha. B. Mapa de pEYFP.N1-*tnaA\**. La distancia que existe entre el sitio *XhoI* y *EcoRI* en el MCS del pEYFP.N1 es de 21 pb.

#### E) Clonación de *tnaA\**-YFP en el vector Casper Hs83

Como el vector original (pEYFP-N1) es un vector de expresión para mamífero, fue necesario trasladar la fusión *tnaA\**-YFP a un vector de expresión para *D. melanogaster* y se eligió el pCasper Hs83. pCasper es un plásmido que permite que el gen insertado en la orientación adecuada, se exprese bajo el promotor constitutivo de la proteína chaperona Hsp83 involucrada principalmente en la respuesta al estrés calórico.

El plásmido pEYFP.N1-*tnaA\** se digirió con *EcoRI* y *NotI*, sitios de restricción que se encontraban en el extremo 5' y 3' de la fusión *tnaA\**-YFP, respectivamente. Estos sitios de restricción son compatibles con sitios del MCS del pCasper que permiten la clonación del fragmento de DNA en la orientación apropiada para la expresión a partir del promotor de Hsp83. El fragmento *tnaA\**-YFP se ligó y los plásmidos extraídos de las colonias resistentes a ampicilina se digirieron con las enzimas *BamHI*, *EcoRI/NotI* y *XhoI* (Fig. 20A). Como se representa en la Fig. 20B, los patrones de restricción esperados fueron los siguientes: para *BamHI*: 10597, 1266, 650, 90 y 27 pb; para *EcoRI/NotI*: 4000 y 8600 pb y para *XhoI*: 9360, 2871 y 399 pb.

**A.****B.**

**Figura 20. Construcción del pCasperHs83-tnaA\*+YFP.** A. 1:  $\lambda$ HindIII, patrón de restricción de pCasperHs83-tnaA\*+YFP con: 2: BamHI, tamaño de fragmentos esperados a la izquierda (negro), 3: EcoRI/NotI, tamaño de fragmentos esperados a la derecha (rosa) y 4: XhoI, tamaño de fragmentos esperados a la derecha (azul). B. Mapa de la construcción pCasperHs83-tnaA\*+YFP. Sitios BamHI (verde) tnaA: 1297, 2563, 3213 y 3240 y un sitio en el MCS de la YFP. Sitios XhoI (rojo) tnaA: 399 y 3270 y un sitio en el MCS del pCasper. Sitios EcoRI en el MCS del pCasper y NotI en el extremo 3' de la YFP.

#### 4. Obtención y mapeo de inserciones en líneas transgénicas

##### 4.1 Inyección de embriones

El plásmido se purificó por QIAGEN y se envió a la compañía Genetic Services, Inc. (ver metodología). De los embriones inyectados con la construcción pCasperHs83-tnaA\*+YFP se obtuvieron 120 individuos que se cruzaron de manera independiente con la línea  $w^{1118} / w^{1118}$  (ojos blancos) puesto que cada una podía representar una línea independiente debido a que el transgén se inserta al azar dentro del genoma. En 24 de las cruces (20%) se obtuvo progenie con fenotipo de ojos rojos ( $w^+$ ), marcador asociado al transgén. Este porcentaje es mayor al esperado ya que se ha reportado que en la mayoría de los ensayos se obtiene de un 10 a 14% de individuos transformados del total de la progenie obtenida (Spradling, 1987). Cuatro de las líneas fueron estériles y murieron. Del resto de las líneas (20) mantuvimos 11 (nombradas arbitrariamente A, B,

C,...K) para su caracterización posterior que implica determinar el cromosoma donde se insertó el transgén. Lo anterior se llevó a cabo en el fondo  $w^{1118} / w^{1118}; +/+; +/+$  para poder rastrear la presencia del transgén por el marcador asociado ( $w^+$ ).

#### 4.2 Mapeo de la inserción

Para identificar el cromosoma en donde ocurrió la inserción, moscas de las 11 líneas con ojos rojos se cruzaron con moscas de la línea TB. Esta línea TB facilita el mapeo ya que posee marcadores dominantes diferentes en cada uno de los pares cromosomales 2 y 3. Así, el ligamiento del marcador del transgén ( $w^+$ ) con alguno de estos marcadores, nos permite determinar el cromosoma donde se dio el evento de inserción del transgén.

De cada línea se cruzaron 5 moscas por separado con individuos de la línea TB que fueron las fundadoras de las líneas A1, A2,...A5; B1, B2,... hasta K5. En total se pusieron 55 cruzas. Esto se hizo así porque cada individuo puede representar la inserción del transgén en sitios diferentes del genoma (eventos independientes).

Cruza 1:  $P [(w^+)tna-YFP]; w/w^+ \times w/w^-; CyO/Sp; TM2/MKRS$  (línea TB)

A continuación se muestran las clases de genotipos posibles para la inserción del transgén en distintos cromosomas; provenientes de la crua 1.

En el cromosoma X:

$\frac{P[(w^+)tna-YFP]}{w^+ \text{ ó } Y} ; \frac{+}{CyO} ; \frac{+}{MKRS}$	$\frac{P[(w^+)tna-YFP]}{w^+ \text{ ó } Y} ; \frac{+}{CyO} ; \frac{+}{TM2}$	$\frac{P[(w^+)tna-YFP]}{w^+ \text{ ó } Y} ; \frac{+}{Sp} ; \frac{+}{TM2}$	$\frac{P[(w^+)tna-YFP]}{w^+ \text{ ó } Y} ; \frac{+}{Sp} ; \frac{+}{MKRS}$	rojos
$\frac{w^-}{w^- \text{ ó } Y} ; \frac{+}{CyO} ; \frac{+}{MKRS}$	$\frac{w^-}{w^- \text{ ó } Y} ; \frac{+}{CyO} ; \frac{+}{TM2}$	$\frac{w^-}{w^- \text{ ó } Y} ; \frac{+}{Sp} ; \frac{+}{TM2}$	$\frac{w^-}{w^- \text{ ó } Y} ; \frac{+}{Sp} ; \frac{+}{MKRS}$	bancos

En el cromosoma 2:

$\frac{P[(w^+)tna-YFP]}{CyO}$ ; $\frac{+}{MKRS}$	$\frac{P[(w^+)tna-YFP]}{CyO}$ ; $\frac{+}{TM2}$	$\frac{P[(w^+)tna-YFP]}{Sp}$ ; $\frac{+}{MKRS}$	$\frac{P[(w^+)tna-YFP]}{Sp}$ ; $\frac{+}{TM2}$	rojos
$\frac{+}{CyO}$ ; $\frac{+}{MKRS}$	$\frac{+}{CyO}$ ; $\frac{+}{TM2}$	$\frac{+}{Sp}$ ; $\frac{+}{MKRS}$	$\frac{+}{Sp}$ ; $\frac{+}{TM2}$	blancos

En el cromosoma 3:

$\frac{+}{CyO}$ ; $\frac{P[(w^+)tna-YFP]}{MKRS}$	$\frac{+}{CyO}$ ; $\frac{P[(w^+)tna-YFP]}{TM2}$	$\frac{+}{Sp}$ ; $\frac{P[(w^+)tna-YFP]}{MKRS}$	$\frac{+}{Sp}$ ; $\frac{P[(w^+)tna-YFP]}{TM2}$	rojos
$\frac{+}{CyO}$ ; $\frac{+}{MKRS}$	$\frac{+}{CyO}$ ; $\frac{+}{TM2}$	$\frac{+}{Sp}$ ; $\frac{+}{MKRS}$	$\frac{+}{Sp}$ ; $\frac{+}{TM2}$	blancos

Para determinar el cromosoma donde se encontraba la inserción, se seleccionaron los individuos de la F1  $CyO$ ;  $MKRS$  (clase sombreada en gris en las tablas anteriores) porque eran los marcadores más fáciles de seguir y se retrocruzaron con la línea TB. Por diferencias en la expresión de  $w^+$  (tonalidades de rojo), de la progenie de las 55 cruza solo se seleccionaron 25 líneas para la retrocruza. Se evaluó la progenie de cada una de las cruza y se determinó el cromosoma en el que se había insertado el transgén en las 25 líneas por asociación a los diferentes cromosomas marcados.

Para el caso de las líneas que mapearon en el cromosoma X:

Cruza 2a  $\rightarrow X^{P[(w^+)tna-YFP]}/Y$ ;  $+/CyO$ ;  $+/MKRS$  X  $w/w$ ;  $CyO/Sp$ ;  $TM2/MKRS$

Progenie  $\rightarrow$  observamos que todas las hembras tenían ojos rojos.

Para el caso de las líneas que mapearon en el cromosoma 2:

Cruza 2b  $\rightarrow w/w$ ;  $P[(w^+)tna-YFP]/CyO$ ;  $+/MKRS$  X  $w/w$ ;  $CyO/Sp$ ;  $TM2/MKRS$

Progenie  $\rightarrow$  observamos que todos los individuos de la clase  $CyO/Sp$  tenían ojos blancos, que son los marcadores de cada uno de los cromosomas 2. En la siguiente tabla se muestran todos los genotipos obtenidos y se marcan con gris las clases de ojos

rojos. Las clases con una diagonal representan genotipos letales ya que todos los balanceadores (*CyO*, *MKRS*, *TM2*) y el marcador (*Sp*) al quedar homocigotos mueren.

$\frac{P[(w^+)tna-YFP]}{CyO} ; \frac{+}{TM2}$	$\frac{P[(w^+)tna-YFP]}{Sp} ; \frac{+}{TM2}$	$\frac{P[(w^+)tna-YFP]}{CyO} ; \frac{+}{MKRS}$	$\frac{P[(w^+)tna-YFP]}{Sp} ; \frac{+}{MKRS}$
$\frac{P[(w^+)tna-YFP]}{CyO} ; \frac{TM2}{MKRS}$	$\frac{P[(w^+)tna-YFP]}{Sp} ; \frac{MKRS}{TM2}$	$\frac{P[(w^+)tna-YFP]}{CyO} ; \frac{MKRS}{MKRS}$	$\frac{P[(w^+)tna-YFP]}{Sp} ; \frac{MKRS}{MKRS}$
$\frac{CyO}{CyO} ; \frac{+}{TM2}$	$\frac{Sp}{CyO} ; \frac{+}{TM2}$	$\frac{CyO}{CyO} ; \frac{+}{MKRS}$	$\frac{Sp}{CyO} ; \frac{+}{MKRS}$
$\frac{CyO}{CyO} ; \frac{MKRS}{TM2}$	$\frac{Sp}{CyO} ; \frac{MKRS}{TM2}$	$\frac{CyO}{CyO} ; \frac{MKRS}{MKRS}$	$\frac{Sp}{CyO} ; \frac{MKRS}{MKRS}$

Para las líneas que mapearon en el cromosoma 3:

Cruza  $2c \rightarrow w/w ; +/CyO ; P[(w^+)tna-YFP]/MKRS \times w/w ; CyO/Sp ; TM2/MKRS$

Progenie  $\rightarrow$  observamos que todos los individuos de la clase *TM2/MKRS*, marcadores de cada uno de los cromosomas 3, tenían ojos blancos como se muestra en la siguiente tabla.

$\frac{+}{CyO} ; \frac{P[(w^+)tna-YFP]}{TM2}$	$\frac{+}{Sp} ; \frac{P[(w^+)tna-YFP]}{TM2}$	$\frac{+}{CyO} ; \frac{P[(w^+)tna-YFP]}{MKRS}$	$\frac{+}{Sp} ; \frac{P[(w^+)tna-YFP]}{MKRS}$
$\frac{+}{CyO} ; \frac{TM2}{MKRS}$	$\frac{+}{Sp} ; \frac{TM2}{MKRS}$	$\frac{+}{CyO} ; \frac{MKRS}{MKRS}$	$\frac{+}{Sp} ; \frac{MKRS}{MKRS}$
$\frac{CyO}{CyO} ; \frac{P[(w^+)tna-YFP]}{TM2}$	$\frac{Sp}{CyO} ; \frac{P[(w^+)tna-YFP]}{TM2}$	$\frac{CyO}{CyO} ; \frac{P[(w^+)tna-YFP]}{MKRS}$	$\frac{Sp}{CyO} ; \frac{P[(w^+)tna-YFP]}{MKRS}$
$\frac{CyO}{CyO} ; \frac{MKRS}{TM2}$	$\frac{Sp}{CyO} ; \frac{TM2}{MKRS}$	$\frac{CyO}{CyO} ; \frac{MKRS}{MKRS}$	$\frac{Sp}{CyO} ; \frac{MKRS}{MKRS}$

De las 25 líneas mapeadas obtuvimos:

Cromosoma X: 2 líneas

Cromosoma 2: 13 líneas

Cromosoma 3: 10 líneas

#### 4.3 Complementación del transgén TnaA-YFP en individuos mutantes de TnaA

Para demostrar que la fusión TnaA-YFP conserva las funciones de TnaA silvestre se realizaron dos estrategias donde se evaluó si el transgén rescata la letalidad de

individuos homocigos para el alelo  $tna^1$  que es una mutación puntual que genera un producto truncado de la proteína TnaA (Gutiérrez *et al.*, 2003).

Para este ensayo se utilizaron líneas que mapearon en el cromosoma 2 ya que  $tna$  mapea en el 3. Las líneas del cromosoma 2 permiten construir el genotipo de prueba fácilmente ( $P [(w^+)tna-YFP]/+; tna^1,red,e/tna^1,red,e$ ).

Obtención de la línea  $w^-; tna^1, TM6C$ :

Primero se hizo un "stock" donde  $tna^1$  estuviera en un fondo  $w^-/w^-$  (ojos blancos) para que a lo largo del ensayo fuera identificada la presencia o ausencia del transgén únicamente por el color de ojos (rojo). Las moscas con el alelo  $tna^1$  se cruzaron con una línea  $w^-$  que presentaba además, marcadores fenotípicos en el cromosoma 3 para posteriormente poder distinguir entre todas las clases de la progenie.

Fo  $w^+/Y; +/+; tna^1,red,e/TM6C$  X  $w^-/w^-; +/+; +/TM6C,cu,Sb,e,ca$

De la progenie de esta cruce se obtienen machos con ojos blancos y hembras que tienen una copia de  $w^-$  y otra de  $w^+$ . Por lo tanto se cruzaron entre ellos para obtener ojos blancos en ambos sexos.

F1  $w^-/Y; +/+; tna^1,red,e/TM6C,cu,Sb,e,ca$  X  $w^-/w^+; +/+; tna^1,red,e/TM6C,cu,Sb,e,ca$

Finalmente de la progenie, la cruce entre ellos nos permitió obtener la línea estable de  $tna^1$  con ojos blancos en ambos sexos.

F2  $w^-/Y; +/+; tna^1,red,e/TM6C,cu,Sb,e,ca$  X  $w^-/w^-; +/+; tna^1,red,e/TM6C,cu,Sb,e,ca$

A) Primera estrategia: cruzamos ocho líneas transgénicas con el stock de  $w^-; tna^1$ .

$w^-/Y; P[(w^+)tna-YFP]/CyO; TM2/MKRS$  X  $w^-/w^-; +/+; tna^1,red,e/TM6C,cu,Sb,e,ca$

Seleccionamos de la progenie la clase que tuviera una copia del transgén y otra de  $tna^1$ .

Para obtener la línea con  $tna^1$  homociga cruzamos de nuevo con el stock de  $w^-; tna^1$ .

$w^-/Y; P[(w^+)tna-YFP]/+; tna^1,red,e/TM2$  X  $w^-/w^-; +/+; tna^1,red,e/TM6C,cu,Sb,e,ca$

Por último contamos toda la progenie de la cruce anterior. En cada una de las líneas a evaluar observamos con especial atención la presencia o ausencia de la siguiente clase:

$w/Y; P [(w^+)tna-YFP]/+; tna^1, red, e/tna^1, red, e$  (resaltada en gris en la siguiente tabla de progenie) que sólo aparece si el transgén está complementando la función de *tnaA* silvestre. La clase con una diagonal es la homóciga letal para *tna*<sup>1</sup>.

$\frac{P[(w^+)tna-YFP]}{+}; \frac{tna^1, red, e}{tna^1, red, e}$	$\frac{P[(w^+)tna-YFP]}{+}; \frac{tna^1, red, e}{TM6C, SB, cu, e, ca}$
$\frac{P[(w^+)tna-YFP]}{+}; \frac{TM2}{MKRS}$	$\frac{P[(w^+)tna-YFP]}{+}; \frac{TM2}{TM6C, SB, cu, e, ca}$
$\frac{+}{+}; \frac{tna^1, red, e}{tna^1, red, e}$	$\frac{+}{+}; \frac{tna^1, red, e}{TM6C, SB, cu, e, ca}$
$\frac{+}{+}; \frac{tna^1, red, e}{TM2}$	$\frac{+}{+}; \frac{TM2}{TM6C, SB, cu, e, ca}$

Cuatro líneas (D1.2, E1.1, E1.2 y J1.1) de las ocho evaluadas rescataron la letalidad al ser homócigas para *tna*<sup>1</sup>. En la tabla 3 se muestran los porcentajes de individuos de la clase complementada en cada una de las líneas que complementó.

Línea	Genotipo	Sobrevivencia
	<i>tna</i> <sup>1</sup> / <i>tna</i> <sup>1</sup>	0%
D1.2	$P [(w^+)tna-YFP]; tna^1/tna^1$	33%
E1.1	$P [(w^+)tna-YFP]; tna^1/tna^1$	21%
E1.2	$P [(w^+)tna-YFP]; tna^1/tna^1$	44%
J1.1	$P [(w^+)tna-YFP]; tna^1/tna^1$	19%

Tabla 3. Porcentajes de complementación en la primera estrategia.

B) Segunda estrategia: este método nos permitió evaluar la complementación de diferentes líneas transgénicas con el uso de marcadores más fáciles de identificar y

también el efecto de dos copias del transgén *tnaA*-YFP. De las cinco líneas evaluadas, dos eran viables (en bajas proporciones) al tener doble dosis del transgén. Cruzamos las líneas transgénicas con el stock de  $w^-; tna^1$ .

$w^-/Y; P [(w^+)tna\text{-YFP}]/CyO; +/MKRS \times w^-/w^-; +/+; tna^1, red, e/TM6C, cu, Sb, e, ca$

Seleccionamos de la progenie la clase con fenotipo silvestre, clase que tenía una copia del transgén y otra de *tna*<sup>1</sup>. Para obtener la línea con *tna*<sup>1</sup> homociga cruzamos con los hermanos del mismo genotipo.

$w^-/Y; P [(w^+)tna\text{-YFP}]/+; tna^1, red, e/+ \times w^-/w^-; P [(w^+)tna\text{-YFP}]/+; tna^1, red, e/+$

Por último contamos toda la progenie de la cruce anterior. En cada una de las líneas a evaluar observamos con especial atención la presencia o ausencia de la siguiente clase:

$w^-/Y; P [(w^+)tna\text{-YFP}]/+; tna^1, red, e/tna^1, red, e$  (resaltada en gris en la siguiente tabla de progenie) y en el caso de las líneas viables para *tna*-YFP homocigo, la presencia o ausencia de la clase  $w^-/Y; P [(w^+)tna\text{-YFP}]/P [(w^+)tna\text{-YFP}]; tna^1, red, e/tna^1, red, e$ . Estas sólo aparecen si el transgén está complementando la función de *tnaA* silvestre.

$\frac{P[(w^+)tna\text{-YFP}]}{+}; \frac{tna^1, red, e}{tna^1, red, e}$	$\frac{P[(w^+)tna\text{-YFP}]}{+}; \frac{+}{+}$
$\frac{P[(w^+)tna\text{-YFP}]}{+}; \frac{+}{+}$	<del><math>\frac{P[(w^+)tna\text{-YFP}]}{+}; \frac{tna^1, red, e}{tna^1, red, e}</math></del>
$\frac{P[(w^+)tna\text{-YFP}]}{+}; \frac{tna^1, red, e}{+}$	$\frac{P[(w^+)tna\text{-YFP}]}{+}; \frac{tna^1, red, e}{+}$
$\frac{+}{+}; \frac{+}{+}$	$\frac{+}{+}; \frac{tna^1, red, e}{+}$

Cuatro líneas (D1.2, D1.3, E3 y J1.1) de las cinco evaluadas rescataron la letalidad de *tna*<sup>1</sup>. En las líneas viables para *tna*-YFP homocigo, no encontramos la clase complementada con doble dosis del transgén (clase con una diagonal). En la Tabla 4 se muestran los porcentajes de individuos de la clase complementada en cada una de las líneas que complementó.

Línea	Genotipo	Sobrevivencia
	$tna^1 / tna^1$	0%
D1.2	$P [(w^+)tna-YFP]; tna^1/tna^1$	18%
D1.3	$P [(w^+)tna-YFP]; tna^1/tna^1$	25%
E3	$P [(w^+)tna-YFP]; tna^1/tna^1$	13%
J1.1	$P [(w^+)tna-YFP]; tna^1/tna^1$	16%

Tabla 4. Porcentajes de complementación en la segunda estrategia.

Los porcentajes en ambas estrategias se calcularon tomando como 100% el número de moscas obtenidas de la misma cruce en la clase que presentó la mayor viabilidad. Los individuos que se obtuvieron de la clase  $w^-$ ;  $P [(w^+)tna-YFP]/+; tna^1,red,e/tna^1,red,e$  presentaron fenotipo anormal. En general tenían problemas de motilidad y defectos en las alas (Fig. 21).



Figura 21. Fenotipos mutantes de clase complementada para  $tna^1$ . En los paneles de la izquierda se muestra el fenotipo silvestre de la clase  $w^-/Y; P [(w^+)tna-YFP]/+; tna^1,red,e/TM6C,cu,Sb,e,ca$  y en los de la derecha un individuo de la clase  $w^-/Y; P [(w^+)tna-YFP]/+; tna^1,red,e/tna^1,red,e$

#### 4.4 Observación de TnaA-YFP en embriones de *D. melanogaster*.

Una vez demostrada la funcionalidad de la proteína de fusión TnaA-YFP por los ensayos de complementación de la letalidad de *tna<sup>1</sup>*, se determinó la localización de la proteína de fusión por microscopía de fluorescencia y confocal.

A) Se eligieron las líneas D1.2, D1.3 y E3 por ser las mismas que complementaron. En la progenie de estas líneas se obtienen los embriones observados con genotipo  $P[(w^+)tnaA-YFP]/CyO; +/+$  y además se observaron embriones de la línea  $w^{1118} / w^{1118}$  como control. Algunos se observaron *in vivo* y otros se fijaron.

Después de doce horas posteriores a la fertilización, se colectaron embriones de estas líneas para observarse por microscopía de fluorescencia. En la Fig. 22 observamos embriones (entre la etapa 7 y 10) de la línea E3 a la izquierda (A) y de la línea control  $w^{1118} / w^{1118}$  a la derecha (B). La distribución punteada observada corresponde a la señal de TnaA-YFP, la cual se localiza en el sitio donde se encuentra la amnioserosa. Este tejido extraembrionario no contribuye en la formación de ningún tejido durante la embriogénesis, el cual se requiere para la extensión de la banda germinal y la fusión dorsal.

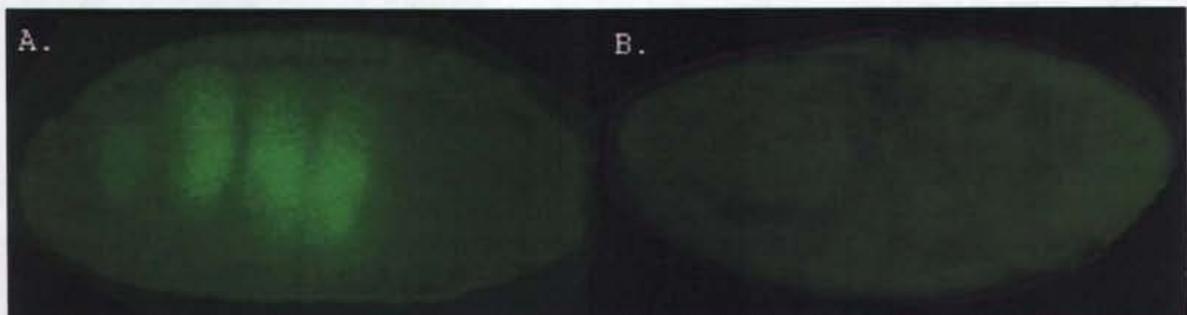
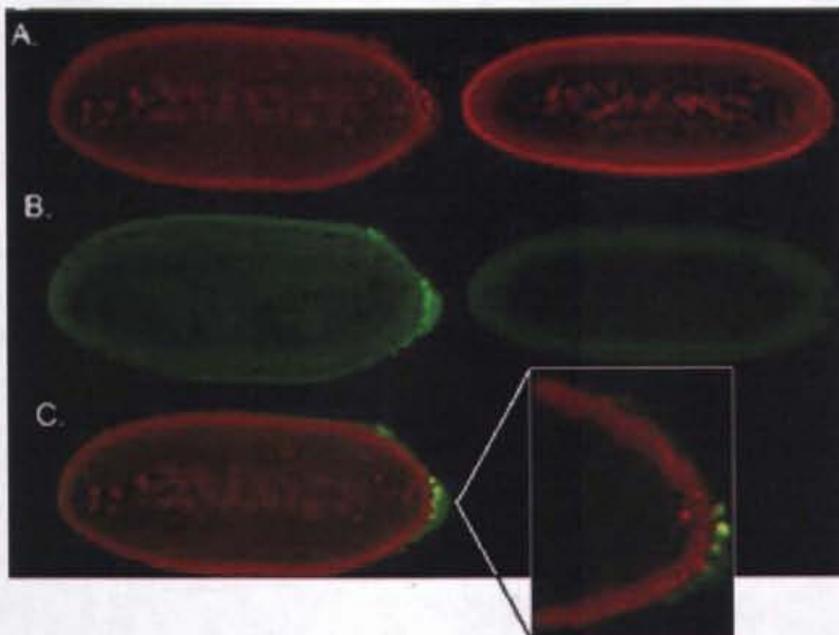


Figura 22. Localización de TnaA-YFP en embriones tardíos de la línea transgénica E3. A. Fluorescencia de TnaA-YFP por microscopía de fluorescencia de un embrión entre las etapas 7 y 10. B. Embriones de la línea control  $w^{1118}/w^{1118}$  sin fusión.

B) Se colectaron embriones de las tres primeras horas de la embriogénesis de las líneas D1.2, D1.3 y J1.1, siendo líneas que complementaron. Se fijaron y se tiñeron núcleos con yoduro de propidio (ver metodología). La localización observada en los

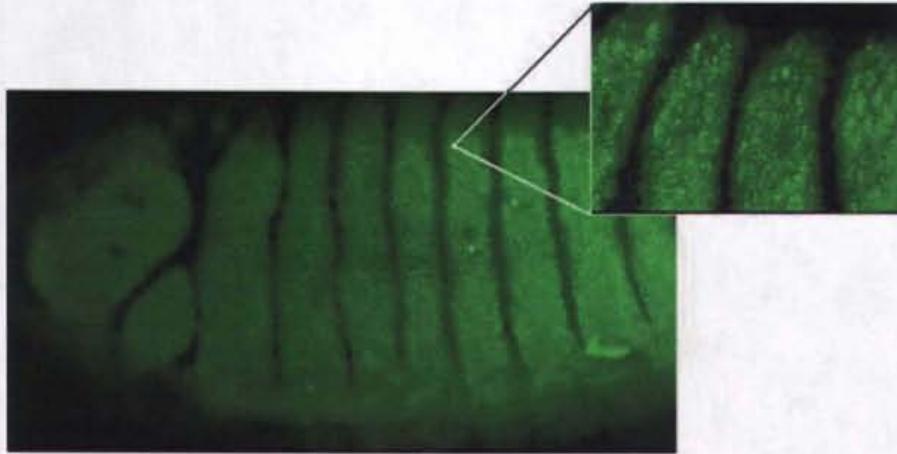
embriones de la línea transgénica D1.3 (Fig. 23) es representativa de las tres líneas analizadas.

En la Fig. 23A, se observa a la izquierda un embrión de la línea transgénica y a la derecha un embrión de la línea control sin fusión  $w^{1118} / w^{1118}$ . En ambos casos se distinguen con yoduro de propidio la mayoría de los núcleos en la periferia y en la parte posterior las células polares. Además observamos la localización de TnaA-YFP (Fig. 23B), donde en la línea transgénica se localiza mayoritariamente en el citoplasma de las células polares y en la control no observamos señal. En C observamos para los embriones transgénicos la colocación de ambas señales. En el recuadro encontramos un acercamiento de la parte posterior de los embriones transgénicos donde se distingue la colocación del yoduro de propidio con la señal de TnaA-YFP.



**Figura 23. Localización de TnaA-YFP en embriones tempranos (blastodermo sincicial) de la línea transgénica D1.3. Microscopía confocal de: embriones transgénicos (izq.) y embriones de la línea control sin fusión (der.). A. Tinción de núcleos con yoduro de propidio. B. Fluorescencia de TnaA-YFP. C. Colocalización.**

En la Fig. 24 observamos el patrón de fluorescencia punteado de TnaA-YFP en embriones tardíos (etapa 11) de la línea D1.2.



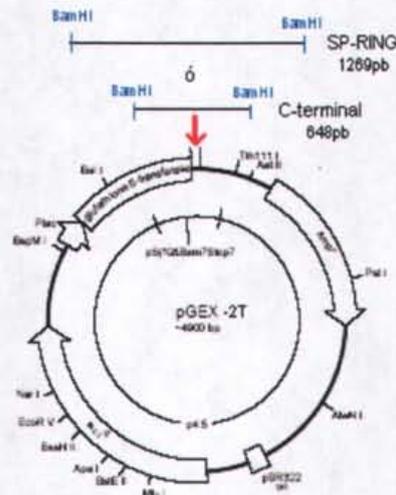
**Figura 24. Localización de TnaA-YFP en embriones tardíos de la línea transgénica D1.2.** Microscopia confocal de un embrión de etapa 11. En el recuadro un acercamiento de la distribución punteada. La línea control sin fusión no fluoresce.

## 5. Fusiones de TnaA-GST

Con el objetivo de obtener las herramientas necesarias para conocer más sobre el funcionamiento de TnaA, se construyeron por Gutiérrez, L. fragmentos de TnaA fusionados a la GST. Para posteriormente obtener anticuerpos específicos para TnaA lo cual nos permite abordar distintas preguntas, entre ellas la localización subcelular de esta proteína de acuerdo con el objetivo de este trabajo.

Se utilizó una clona *tnaA*-GST que contenía del a.a. 857 al 1072 de la proteína TnaA que corresponde al C-terminal y un fragmento del a.a. 434 al 856 que corresponde al dominio SP-RING. Así es como el extremo C-terminal y la región del SP-RING servirán de antígeno para la generación de dichos anticuerpos. La clona del C-terminal comprende un fragmento de 648 pb y la clona del SP-RING de 1269, ambos fragmentos limitados en los extremos por un sitio de restricción para *Bam*H1 (ver Fig. 25). El vector pGEX2T permitió fusionar en fase los fragmentos de DNA que codifican

para el C-terminal de 216 a.a. ( $\approx 24$  KDa) ó el SP-RING de 423 a.a. ( $\approx 46$  KDa) y la glutatión-S transferasa (GST) ( $\approx 27$  KDa). Peso total de  $Tna_{C-term}$ -GST  $\approx 51$  KDa y de  $Tna_{SP-RING}$ -GST  $\approx 73$  KDa.



**Figura 25. Mapa del vector pGEX-2T.** La flecha indica el sitio donde estaba insertado cada uno de los fragmentos de DNA de *trnA*. Sitio de restricción utilizado: *Bam*HI.

Las dos fusiones de GST ( $Tna_{C-term}$ -GST y  $Tna_{SP-RING}$ -GST) se trataron bajo distintas condiciones de inducción (ver metodología) para obtener las ideales para su expresión. En el caso de la fusión  $Tna_{C-term}$ -GST el peso calculado fue de  $\approx 51$  KDa, el cual coincide con el observado con respecto al marcador de peso molecular (ver Fig. 26). Por el contrario en la fusión  $Tna_{SP-RING}$ -GST el peso esperado era de 73 KDa y como se muestra en la Fig. 26 (carril 6 y7) observamos una banda mayoritaria donde su peso es menor a 59 KDa. Como control se realizó la inducción de la GST donde observamos una banda con el peso reportado de 27 KDa (Smith y Johnson, 1988).



**Figura 26. Inducción de proteínas recombinantes TnaA-GST.** Muestras de proteínas de fusión TnaA-GST 1: marcador de peso molecular (tamaños indicados a la izquierda), 2 y 3: inducción de control (GST), 4 y 5: inducción Tna<sub>C-term</sub>-GST y 6 y 7: inducción Tna<sub>SP-RING</sub>-GST.

Para las dos fusiones las condiciones óptimas de inducción fueron las siguientes:

	Tiempo de inducción	Temp. de inducción	Concentración de IPTG
Tna <sub>C-term</sub> -GST	4.0 hrs	37 °C	0.4 mM
Tna <sub>SP-RING</sub> -GST	3.5 hrs	30 °C	1.0 mM

## Discusión

### E3 ligasas nucleares y citoplásmicas

Con base a la caracterización genética y molecular del gen *tna* como parte del grupo Trx, se postuló que *tnaA* codifica para una enzima E3 ligasa de SUMO (Gutiérrez *et al.*, 2003) por lo que la determinación de su ubicación indicaría donde pueden estar sus blancos. Gutiérrez *et al.*, (2003) observaron que *tna* interacciona genéticamente con genes que codifican para subunidades del complejo Brm y Mediador, y con el gen *kismet* que codifica para un miembro de la familia de ATPasas SWI/SNF. Estos complejos protéicos se sintetizan en el citoplasma, funcionan en el núcleo y se desconoce el sitio de su ensamblaje. Es factible que TnaA junto con las enzimas E1 y E2 sumoilen alguna(s) de estas subunidades. También es posible que la E1, E2 y E3 (TnaA) se encuentren en cualquiera de las localizaciones celulares mencionadas (núcleo o citoplasma). No sabemos si la posible sumoilación de estas subunidades funcionaría para facilitar su ensamblaje, su transporte al núcleo, la subcompartimentalización intranuclear y/o la actividad *per se* de los complejos modificados.

En el presente estudio, con el uso de un transgén TnaA-YFP encontramos que durante las primeras etapas del desarrollo, TnaA se localiza principalmente en el citoplasma de las células polares. En embriones en etapas posteriores a la segmentación, donde ya se inició la transcripción cigótica, se observó una distribución punteada que podría corresponder a la localización nuclear de TnaA. Este hallazgo nos habla de una localización dinámica a lo largo del desarrollo lo que sugiere que dependiendo del estadio, TnaA se puede localizar en diferentes compartimentos celulares.

Inicialmente se reportó la sumoilación de factores transcripcionales (como p53 y c-Jun) en el núcleo (Eaton y Sealy, 2003; Muller *et al.*, 1998). Sin embargo posteriormente se determinó que proteínas citoplásmicas como el factor transcripcional Dorsal requiere de la sumoilación para transportarse al núcleo y actuar sobre sus genes blanco (Bhaskar *et al.*, 2000). Otro ejemplo es la GTPasa activadora de Ran (RanGAP1), involucrada en el transporte nucleocitoplásmico (Matunis *et al.*, 1998). La sumoilación de esta GTPasa facilita su interacción con otras proteínas del poro nuclear como Nup358. Además otras proteínas exclusivamente citoplásmicas modificadas por SUMO son las septinas Cdc3, Cdc11 y Shs1 en levadura, que al ser sumoiladas promueven la citocinesis y su localización en sitios específicos que permiten la gemación (Johnson y Gupta, 2001). También encontramos como proteínas blanco a los transportadores de glucosa dependientes de insulina GLUT1 y GLUT4, que se encuentran asociados a la membrana plasmática. Su sumoilación aumenta la estabilidad y regula su interacción con otras proteínas (Lalioi *et al.*, 2002). Algunas ligasas de SUMO (Watts, 2004) son a su vez proteínas blanco ya que se autosumoilan, como es el caso de la RanBP2 y la Pc2 (Kagey *et al.*, 2003; Pichler *et al.*, 2002).

En *Drosophila* se caracterizó la localización de las proteínas responsables de sumoilar (E2 conjugante y SUMO) en septinas. Con el uso de anticuerpos específicos contra Uba2 y SUMO, se demostró que durante la embriogénesis en estadios tempranos (blastodermo sincicial) gran parte de estas proteínas se encontraban en citoplasma y solo en estadios tardíos (posteriores a la celularización) su localización se distribuía de manera punteada siendo en su mayoría nuclear (Shih *et al.*, 2002). La caracterización del sistema en relación a la translocación entre citoplasma y núcleo en diferentes estadios embrionarios, mostró una regulación de la localización de Uba2 y SUMO dependiente del ciclo celular y del desarrollo embrionario.

Es interesante que en el presente trabajo aportamos evidencia de que TnaA, posible E3 ligasa de SUMO, presente un patrón de localización dinámico durante diferentes estadios embrionarios (Figs. 22, 23 y 24) similar al observado para otras proteínas involucradas en la vía de sumoilación.

En *Drosophila* sólo existen dos proteínas con posible actividad de E3 ligasa con el dedo de zinc tipo SP-RING. Una de ellas es TnaA y la otra es la codificada en el *locus Su(var)2-10*. *Su(var)2-10* pertenece a la familia de proteínas PIAS de mamíferos y su función en *Drosophila* está relacionada a múltiples aspectos de la función y estructura de los cromosomas. Hari *et al.* (2001) observaron que, en embriones tempranos, la localización subcelular de SU(VAR)2-10 varía de acuerdo a la fase del ciclo celular. Durante la interfase de diversos tipos celulares, las proteínas de SU(VAR)2-10 son citoplásmicas y nucleares (Hari *et al.*, 2001) por lo que es posible que la localización de TnaA, como la de SU(VAR)2-10, cambie dependiendo de la fase del ciclo celular.

### TnaA y su señal de localización nuclear (NLS)

TnaA posee una NLS canónica, por lo que es factible que pueda localizarse en núcleo. El hecho de observarla en estadios tempranos en citoplasma podría sugerir que se transporte a núcleo después de una modificación postraduccional (i.e. fosforilación o sumoilación) necesaria para su translocación (Jans y Hubner, 1996) o la asociación con otra proteína como se ha observado en los mecanismos de localización de algunas proteínas nucleares (Pasion y Forsburg, 1999; Sommer *et al.*, 1991).

Por ejemplo al estudiar la localización subcelular de algunas de las subunidades que conforman al complejo transcripcional TFIIH, se observó que la subunidad XPD fusionada a GFP se localizó mayoritariamente en citoplasma a pesar de poseer una NLS putativa (Santagati *et al.*, 2001). En este estudio se postuló que como esta

subunidad posee una NLS no clásica requiere de la asociación con otras proteínas, posiblemente subunidades del mismo complejo TFIID, para su localización nuclear.

Dado que la NLS de TnaA es canónica, favorecemos más a la idea de que TnaA al poseer una NLS que parece no ser suficiente (al menos en estadios tempranos) para una localización nuclear, requiere una modificación ya sea química o estructural que le permita activarse en el momento en que sea necesaria su función dentro del núcleo como por ejemplo en estadios tardíos de la embriogénesis. Sería interesante observar la localización de TnaA-YFP en estadios posteriores a los observados y ver si cambia su distribución en espacio y tiempo.

#### TnaA como miembro de una familia

Con el objetivo de localizar subcelularmente a TnaA, construimos una proteína de fusión TnaA-YFP. Un punto esencial para la validez de este trabajo era asegurarnos que la localización de la proteína de fusión TnaA-YFP fuera similar al patrón de localización de la proteína TnaA silvestre. Por esta razón tomamos en cuenta varias consideraciones y así esta estrategia fuera útil para nuestros fines.

En primer lugar, la fusión de YFP se realizó en el extremo C-terminal de TnaA. En estudios recientes, se evaluaron varias fusiones de la GFP (proteína casi idéntica a la YFP) con el carboxilo y el amino terminal de proteínas cuya localización subcelular ya era conocida por diferentes técnicas (Palmer y Freeman, 2004). Se observó que todas las proteínas fusionadas al extremo C-terminal se localizaron en los compartimentos celulares reportados previamente, a diferencia de las fusiones con el N-terminal, donde más de la mitad se localizaron en sitios distintos a los ya conocidos (Palmer y Freeman, 2004). Esto se debe principalmente a dos razones; la primera es que la mayoría de las proteínas poseen secuencias que contienen las señales de localización celular en o

muy cerca del N-terminal, y la segunda es que al salir la proteína recién sintetizada del ribosoma comienza a plegarse iniciando por el extremo amino, por lo que las fusiones en el extremo C-terminal no interfieren con el plegamiento nativo de la proteína de interés. Además el NLS de TnaA se encuentra a la mitad de la proteína, lejos de ambos extremos. De acuerdo a estos datos, es muy probable que no existan diferencias entre el TnaA silvestre y la fusión TnaA-YFP utilizada en lo que a localización y características funcionales se refiere.

Algunos de los factores que posiblemente podrían haber interferido en la localización de TnaA-YFP con respecto a los sitios en los que se localiza TnaA silvestre se discuten a continuación.

El cDNA de TnaA se clonó bajo un promotor que no es el propio y más importante aún es que la construcción no contiene las zonas regulatorias que dirigen la expresión natural del gen en tiempo, espacio y cantidad del mismo. Tenemos evidencia de que *tna* puede tener al menos dos promotores (L.M. Gutiérrez y M. Vázquez, datos no publicados) y recientemente se reportaron al menos tres formas de TnaA con aminos terminales diferenciales. Una de ellas es la reportada por Gutiérrez, *et al.* (2003) que preferencialmente se ha encontrado en ESTs embrionarios (inicia en la secuencia marcada en negritas en la Fig. 26). Las otras dos formas reportadas a partir de ESTs obtenidos de cDNAs de bancos de larvas (testículo) (BDGP cuarta versión y L. M. Gutiérrez y M. Vázquez (datos no publicados)) contienen las siguientes secuencias de aminoácidos antes del inicio de la secuencia reportada (negritas):

MQLIVDKIPM YSKQTTKRNS KKKNDE.....**MNQQAGS**  
 MPHCVIPVYY TQWPYYIITL WIPTNSWLYL VYELCRKNDE.....**MNQQAGS**

**Figura 26.** Secuencias de dos formas de Tna con aminos terminales diferentes a la secuencia reportada indicada en negritas (Gutiérrez *et al.*, 2003).

Aún no hemos analizado si estos aminoácidos extra pueden contener señales de localización o de procesamiento que darían un patrón diferencial de localización o de función. Para contender con estos inconvenientes hubiera sido necesario clonar el DNA genómico correspondiente al *locus*. Sin embargo la zona codificante de *tna* cubre de 30-40 kb y se desconoce el fragmento mínimo que contiene las zonas regulatorias. Es por esto que se decidió construir las líneas transgénicas bajo el promotor de Hsp83 y el cDNA de TnaA fusionado a YFP.

Por estas razones fue indispensable demostrar que esta construcción era capaz de rescatar la letalidad de moscas homocigas para *tna*<sup>1</sup>.

#### La fusión TnaA-YFP conserva las funciones de TnaA silvestre

Para demostrar que la funcionalidad de la fusión TnaA-YFP se mantenía similar a la de la proteína silvestre, realizamos ensayos de complementación. El obtener varias líneas transgénicas nos permitió analizar la localización de TnaA-YFP descartando al mismo tiempo, cualquier efecto de posición cromosomal ya que la localización dentro del genoma de las distintas inserciones en algunos casos, puede influir en la expresión del transgén (Spradling, 1987).

Es por lo anterior que para el aislamiento de las líneas transgénicas se consideraron eventos independientes de inserción hasta la F3. Lo anterior nos permitió obtener un mayor número de líneas con localización del transgén en distintos sitios dentro del genoma y al observar que varias de las líneas analizadas complementaban la letalidad de *tna*<sup>1</sup> y se comportaban de manera similar (en cuanto a localización (datos no mostrados)), descartamos cualquier efecto de posición cromosomal en determinadas líneas transgénicas (D1.2, E1.2, J1.1, E1.1, D1.3).

Las diferencias en los porcentajes de complementación obtenidas en las distintas líneas transgénicas podría ser causada por la dosis génica de TnaA para complementar la letalidad presente en moscas homocigas para el alelo *tna*<sup>1</sup>. Como se observó en el primer ensayo de complementación (Tabla 3), líneas como la D1.2 y E1.2 mostraron porcentajes más altos de complementación con respecto a otras como la J1.1 ó la E1.1. En la segunda estrategia (Tabla 4) en la que se comprobó la complementación, se pudo evaluar la presencia de una doble dosis del transgén y ésta no incrementó el porcentaje de complementación observado.

Por otro lado, la complementación muestra que al menos una parte de la proteína TnaA-YFP está llegando a los sitios donde es requerida su función. Es decir la expresión de TnaA-YFP permite la complementación de la letalidad causada por *tna*<sup>1</sup>.

La gran mayoría de los individuos que provienen de células germinales homocigas para el alelo *tna*<sup>1</sup>, mueren en el tercer instar larvario (Gutiérrez *et al.*, 2003). Por lo tanto podríamos explicar la complementación de las líneas evaluadas en distintas proporciones, como resultado de que el transgén ayudó a algunos individuos a alcanzar la etapa adulta y al resto a alcanzar etapas posteriores al estadio larvario como son las pupas o faratos donde sería necesario cuantificar toda la progenie.

Por todo lo anterior y sobre todo por la complementación creemos que el patrón de localización de TnaA coincide con el que encontramos al analizar la localización de la fusión TnaA-YFP. Independientemente de este argumento, la localización de TnaA con anticuerpos específicos contra esta isoforma corroborará los resultados obtenidos en esta investigación. Con este fin utilizando las condiciones óptimas (encontradas en este trabajo) para expresar el extremo carboxilo terminal fusionado a la GST, es que se

generarán anticuerpos contra TnaA. Esta herramienta permitirá una caracterización más fina de la proteína TnaA en cuanto a localización espacio-temporal se refiere y permitirá a su vez, un acercamiento en la identificación de proteínas asociadas a TnaA para elucidar su función dentro de *D. melanogaster*.

En el presente trabajo se identificó la localización subcelular de la proteína TnaA-YFP con el objetivo de inferir los posibles blancos de TnaA como E3 ligasa de SUMO. Después de haber demostrado por ensayos de complementación, la funcionalidad del transgén. Se observó la localización de TnaA-YFP citoplásmica en estadios tempranos de la embriogénesis mientras que en estadios posteriores se observó una distribución punteada (posiblemente nuclear). Los cambios en la distribución del transgén a lo largo del desarrollo del embrión nos podría hablar de un sistema de conjugación de SUMO nuclear y citoplásmico regulado temporal y/o espacialmente.

## Conclusiones

1. Se construyó una proteína de fusión TnaA-YFP.
2. Se complementó la funcionalidad de TnaA en varias líneas transgénicas con la proteína de fusión TnaA-YFP.
3. Se localizó a TnaA-YFP principalmente en el citoplasma de células polares durante las primeras horas de la embriogénesis.

En embriones tardíos, posteriores a la segmentación, TnaA-YFP presenta una distribución punteada que aún no sabemos si corresponde a una localización nuclear.

4. Se obtuvieron las condiciones óptimas para la expresión de la proteína de fusión con el carboxilo terminal de TnaA y GST.

## Perspectivas

Determinar si es nuclear la localización de TnaA-YFP en embriones tardíos y observar si existen cambios en la distribución en etapas posteriores a la embriogénesis.

Ver localización de TnaA-YFP en discos imagales para identificar si existe una localización tejido-específica.

Generación de anticuerpos anti-TnaA utilizando la proteína recombinante TnaA-GST

Inmunoprecipitar las distintas isoformas de TnaA (sumoiladas, acopladas a la enzima conjugante o a sus proteínas blanco) para posteriormente por inmunoblot con anticuerpos anti-SUMO, anti-Brahma o anti-skuld determinar si estas proteínas interaccionan con TnaA.

Observar la localización subcelular de TnaA en fondos en que *tnaA* afecta la expresión de genes homeóticos o en fondos genéticos donde haya sumoilación deficiente (mutantes en las enzimas de la vía de sumoilación).

## Bibliografía

- Armstrong, J. A., Papoulas, O., Daubresse, G., Sperling, A. S. y Tamkun, J. W.** (2002). The *Drosophila* BRM complex facilitates global transcription by RNA polymerase II. *EMBO J* **21**, 5245-5254.
- Beisel, C., Imhof, A., Greene, J., Kremmer, E. y Sauer, F.** (2002). Histone methylation by the *Drosophila* epigenetic transcriptional regulator Ash1. *Nature* **419**, 857-862.
- Bennett, M. D., Leitch, I. J., Price, H. J. y Johnston, J. S.** (2003). Comparisons with *Caenorhabditis* (100 Mb) and *Drosophila* (175 Mb) using flow cytometry show genome size in *Arabidopsis* to be 157 Mb and thus 25 % larger than the *Arabidopsis* genome initiative estimate of 125 Mb. *Annals of Botany* **91**, 547-557.
- Bhaskar, V., Valentine, S. A. y Courey, A. J.** (2000). A functional interaction between Dorsal and components of the Smt3 conjugation machinery. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 4033-4040.
- Boube, M., Faucher, C., Joulia, L., Cribbs, D. L. y Bourbon, H. M.** (2000). *Drosophila* homologs of transcriptional mediator complex subunits are required for adult cell and segment identity specification. *Genes and Development* **14**, 2906-2917.
- Butler, J. E. y Kadonaga, J. T.** (2001). Enhancer-promoter specificity mediated by DPE or TATA core promoter motifs. *Genes Dev* **15**, 2515-9.
- Butler, J. E. y Kadonaga, J. T.** (2002). The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev* **16**, 2583-92.
- Collins, R. T., Furukawa, T., Tanese, N. y Treisman, J. E.** (1999). Osa associates with the Brahma chromatin remodeling complex and promotes the activation of some target genes. *EMBO J* **18**, 7029-7040.
- Czermin, B., Melfi, R., McCabe, D., Seitz, V., Imhof, A. y Pirrotta, V.** (2002). *Drosophila* Enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyl transferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell* **111**, 185-196.
- Demerec, M.** (1994). *Biology of Drosophila*. New York: CSHL Press.
- Eaton, E. M. y Sealy, L.** (2003). Modification of CCAAT/enhancer-binding protein-beta by the small ubiquitin-like modifier (SUMO) family members, SUMO-2 and SUMO-3. *J Biol Chem* **278**, 33416-21.
- Featherstone, M.** (2002). Coactivators in transcription initiation: here are your orders. *Curr Opin Genet Dev* **12**, 149-55.
- Francis, N. J. y Kingston, R. E.** (2001). Mechanisms of transcriptional memory. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 409-21.
- Griffiths, A. J. F., Miller, J. H., Suzuki, D. T., Lewontin, R. C. y Gelbart, W. M.** (2000). *An introduction to genetic analysis*. New York: W. H. Freeman and Company.
- Gutiérrez, L., Zurita, M., Kennison, J. A. y Vázquez, M.** (2003). The *Drosophila* trithorax group gene *tonalli* (*tna*) interacts genetically with the Brahma remodeling complex and encodes an SP-RING finger protein. *Development* **130**, 343-354.
- Hardeland, U., Steinacher, R., Jiricny, J. y Schar, P.** (2002). Modification of the human thymine-DNA glycosylase by ubiquitin-like proteins facilitates enzymatic turnover. *EMBO J* **21**, 1456-1464.
- Hari, K. L., Cook, K. R. y Karpen, G. H.** (2001). The *Drosophila* *Su(var)2-10* locus regulates chromosome structure and function and encodes a member of the PIAS protein family. *Genes Dev* **15**, 1334-48.
- Hoegel, C., Pfander, B., Moldovan, G. L., Pyrowolakis, G. y Jentsch, S.** (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* **419**, 135-141.

- Jackson, P. K.** (2001). A new RING for SUMO: wrestling transcriptional responses into nuclear bodies with PIAS family E3 SUMO ligases. *Genes and Development* **15**, 3053-3058.
- Jans, D. A. y Hubner, S.** (1996). Regulation of protein transport to the nucleus: central role of phosphorylation. *Physiol Rev* **76**, 651-85.
- Johnson, E. S. y Gupta, A. A.** (2001). An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins. *Cell* **106**, 735-44.
- Kagey, M. H., Melhuish, T. A. y Wotton, D.** (2003). The Polycomb protein Pc2 is a SUMO E3. *Cell* **113**, 127-137.
- Kal, A. J., Mahmoudi, T., Zak, N. B. y Verrijzer, C. P.** (2000). The *Drosophila* Brahma complex is an essential coactivator for the trithorax group protein Zeste. *Genes and Development* **14**, 1058-1071.
- Kaufman, T., Seeger, M. y Olsen, G.** (1990). Molecular and genetic organization of the *Antennapedia* gene complex of *Drosophila melanogaster*. *Advances in Genetics* **27**, 289-303.
- Kennison, J. A.** (2004). Introduction to Trx-G and Pc-G Genes. *Methods in Enzymology* **377**, 61-70.
- Lalioti, V. S., Vergarajauregui, S., Pulido, D. y Sandoval, I. V.** (2002). The insulin-sensitive glucose transporter, GLUT4, interacts physically with Daxx. Two proteins with capacity to bind Ubc9 and conjugated to SUMO1. *J Biol Chem* **277**, 19783-91.
- Levine, M. y Tjian, R.** (2003). Transcription regulation and animal diversity. *Nature* **424**, 147-51.
- Li, T., Evdokimov, E., Shen, R.-F., Chao, C.-C., Tekle, E., Wang, T., Stadtman, E. R., Yang, D. C. H. y Chock, P. B.** (2004). Sumoylation of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins, zinc finger proteins, and nuclear pore complex proteins: A proteomic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 8551-8556.
- Lim, C. Y., Santoso, B., Boulay, T., Dong, E., Ohler, U. y Kadonaga, J. T.** (2004). The MTE, a new core promoter element for transcription by RNA polymerase II. *Genes Dev* **18**, 1606-17.
- Mao, Y., Sun, M., D., D. S. y F., L. L.** (2000). SUMO-1 conjugation to topoisomerase I: a possible repair response to topoisomerase-mediated DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 4046-4051.
- Matunis, M. J., Wu, J. y Blobel, G.** (1998). SUMO-1 modification and its role in targeting the Ran GTPase-activating protein, RanGAP1, to the nuclear pore complex. *J Cell Biol* **140**, 499-509.
- Melchior, F., Schergaut, M. y Pichler, A.** (2003). SUMO: ligases, isopeptidases and nuclear pores. *Trends Biochem Sci* **28**, 612-618.
- Mohrmann, L., Langenberg, K., Krijgsveld, J., Kal, A. J., Heck, A. J. y Verrijzer, C. P.** (2004). Differential targeting of two distinct SWI/SNF-related *Drosophila* chromatin-remodeling complexes. *Mol Cell Biol* **24**, 3077-88.
- Muller, S., Hoege, C., Pyrowolakis, G. y Jentsch, S.** (2001). SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 202-10.
- Muller, S., Matunis, M. J. y Dejean, A.** (1998). Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. *EMBO J* **17**, 61-70.
- Narlikar, G. J., Fan, H.-Y. y Kingston, R. E.** (2002). Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* **108**, 475-487.

- Palmer, E. y Freeman, T.** (2004). Investigation into the use of C- and N-terminal GFP fusion proteins for subcellular localization studies using reverse transfection microarrays. *Comp. Functional Genomics* **5**, 342-353.
- Papoulas, O., Beek, S. J., Moseley, S. L., McCallum, C. M., Sarte, M., Shearn, A. y Tamkun, J. W.** (1998). The *Drosophila* trithorax group proteins BRM, ASH1 and ASH2 are subunits of distinct protein complexes. *Development* **125**, 3955-3966.
- Pasion, S. G. y Forsburg, S. L.** (1999). Nuclear localization of *Schizosaccharomyces pombe* Mcm2/Cdc19p requires MCM complex assembly. *Molecular Biology of the Cell* **10**, 4043-4057.
- Petruk, S., Sedkov, Y., Smith, S., Tillib, S., Kraevski, V., Nakamura, T., Canaani, E., Croce, C. M. y Mazo, A.** (2001). Trithorax and dCBP acting in a complex to maintain expression of a homeotic gene. *Science* **294**, 1331-4.
- Pichler, A., Gast, A., Seeler, J. S., Dejean, A. y Melchior, F.** (2002). The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell* **108**, 109-120.
- Poux, S., McCabe, D. y Pirrotta, V.** (2001). Recruitment of components of Polycomb Group chromatin complexes in *Drosophila*. *Development* **128**, 75-85.
- Rachez, C. y Freedman, L. P.** (2001). Mediator complexes and transcription. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 274-80.
- Sambrook, J., Fritsch, E. T. y Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Press.
- Sánchez-Herrero, E., Vernós, I. y Morata, G.** (1985). Genetic organization of the *Drosophila* Bithorax complex. *Nature* **313**, 108-113.
- Santagati, F., Botta, E., Stefanini, M. y Pedrini, A. M.** (2001). Different dynamics in nuclear entry of subunits of the repair/transcription factor TFIIH. *Nucl. Ac. Res.* **29**, 1574-81.
- Seeler, J. S., Marchio, A., Losson, R., Desterro, J. M., Hay, R. T. y Chambon, P.** (2001). Common properties of nuclear body protein Sp100 and Tif1alpha chromatin factor: role of SUMO modification. *Mol Cell Biol* **21**, 3314-3324.
- Shao, Z., Raible, F., Mollaaghababa, R., Guyon, J., Wu, C., Bender, W. y Kingston, R. E.** (1999). Stabilization of chromatin structure by PRC1, a Polycomb Complex. *Cell* **98**, 37-46.
- Shih, H. P., Hales, K. G., Pringle, J. R. y Peifer, M.** (2002). Identification of septin-interacting proteins and characterization of the Smt3/SUMO-conjugation system in *Drosophila*. *J Cell Sci* **115**, 1259-71.
- Shio, Y. y Eisenman, R. N.** (2003). Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 13225-13230.
- Sif, S.** (2004). ATP-dependent nucleosome remodeling complexes enzymes tailored to deal with chromatin. *Journal of Cellular Biochemistry* **91**, 1087-1098.
- Simon, J. A. y Tamkun, J. W.** (2002). Programming off and on states in chromatin: mechanisms of Polycomb and trithorax group complexes. *Curr Opin Genet Dev* **12**, 210-8.
- Sims, R. J., 3rd, Mandal, S. S. y Reinberg, D.** (2004). Recent highlights of RNA-polymerase-II-mediated transcription. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 263-71.
- Smith, D. B. y Johnson, K. S.** (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**, 31-40.
- Sommer, L., Hagenbuchle, O., Wellauer, P. K. y Strubin, M.** (1991). Nuclear targeting of the transcription factor PTF1 is mediated by a protein subunit that does not bind to the PTF1 cognate sequence. *Cell* **67**, 987-994.

- Spradling, A. C.** (1987). P element-mediated transformation. In *Drosophila a practical approach*, (ed. D. B. Roberts), pp. 175-197. Oxford, Washington D.C.: IRL Press.
- Tie, F., Furuyama, T., Prasad-Sinha, J., Jane, E. y Harte, P. J.** (2001). The *Drosophila* Polycomb Group proteins ESC and E(Z) are present in a complex containing the histone-binding protein p55 and the histone deacetylase RPD3. *Development* **128**, 275-86.
- Tillib, S., Petruk, S., Sedkov, Y., Kuzin, A., Fujioka, M., Goto, T. y Mazo, A.** (1999). Trithorax- and Polycomb-group response elements within an Ultrabithorax transcription maintenance unit consist of closely situated but separable sequences. *Mol Cell Biol* **19**, 5189-202.
- Treisman, J.** (2001). *Drosophila* homologues of the transcriptional coactivation complex subunits TRAP240 and TRAP230 are required for identical processes in eye-antennal disc development. *Development* **128**, 603-15.
- Vázquez, M., Moore, L. y Kennison, J. A.** (1999). The trithorax group gene *osa* encodes an ARID-domain protein that genetically interacts with the Brahma chromatin-remodeling factor to regulate transcription. *Development* **126**, 733-742.
- Verger, A., Perdomo, J. y Crossley, M.** (2003). Modification with SUMO. *EMBO reports* **4**, 137-142.
- Watts, F. Z.** (2004). SUMO modification of proteins other than transcription factors. *Semin Cell Dev Biol* **15**, 211-20.
- Wieschaus, E. y Nüsslein-Volhard, C.** (1987). Looking at embryos. In *Drosophila a practical approach*, (ed. D. B. Roberts), pp. 199-223. Oxford, Washington D.C.: IRL Press.
- Woychik, N. A. y Hampsey, M.** (2002). The RNA polymerase II machinery: structure illuminates function. *Cell* **108**, 453-63.