

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
POSGRADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**TTDA Y ORF2 EN *Drosophila melanogaster* Y SU POSIBLE
INTERACCIÓN CON TFIID.**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS
PRESENTA
BIOL. MARIANA HERRERA CRUZ**

**TUTOR
DR. MARIO ENRIQUE ZURITA ORTEGA**

**Cuernavaca, Morelos.
Septiembre, 2007.**



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

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Biotecnología la preparación académica y las instalaciones prestadas para la realización de este proyecto. En especial, doy gracias al Dr. Mario Zurita Ortega por darme la oportunidad de formar parte de este proyecto, y a cada uno de los miembros del laboratorio por compartirme sus conocimientos y su tiempo, valiosas herramientas que me ayudaron a llevar a cabo este trabajo.

También agradezco a los miembros de mi comité tutorial, las doctoras Alejandra Covarrubias Robles y Catarina Sacristán Rock por sus comentarios y consejos durante estos dos años.

Finalmente quiero dar gracias a la Dra. Leonor Pérez Martínez, y los doctores Ramón González García-Conde, Lorenzo Segovia Forcella y Baltazar Becerril Luján por la revisión de este manuscrito.

ÍNDICE

RESUMEN	- 5 -
INTRODUCCIÓN	- 6 -
JUSTIFICACIÓN.....	- 14 -
HIPÓTESIS.....	- 15 -
OBJETIVOS.....	- 15 -
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	- 16 -
Generación de moscas transgénicas	- 16 -
Expresión del transgen en las líneas de moscas transgénicas.....	- 16 -
MATERIAL Y MÉTODOS	- 18 -
Amplificación por PCR de los fragmentos de DNA de las proteínas híbridas	- 18 -
Purificación de oligonucleótidos	- 19 -
Extracción de DNA de geles de agarosa.....	- 20 -
Clonación de los productos de PCR en el vector de pCR2.1.....	- 21 -
<i>A. Reacción de Ligación</i>	<i>- 21 -</i>
<i>B. Transformación de células electrocompetentes.....</i>	<i>- 22 -</i>
B1. Preparación de células electrocompetentes DH5 α	- 22 -
B2. Electroporación y selección de células transformantes.....	- 23 -
<i>C. Análisis de células transformantes</i>	<i>- 23 -</i>
Purificación de plásmidos	- 24 -
Verificación de plásmidos	- 25 -
<i>A. Análisis de restricción</i>	<i>- 25 -</i>
<i>B. Secuenciación</i>	<i>- 26 -</i>
Subclonación de los productos de PCR en vectores de expresión específicos de mosca	- 26 -
<i>A. Verificación de sitios únicos de restricción deseados en los vectores de expresión.....</i>	<i>- 28 -</i>
<i>B. Digestiones de vectores de expresión e insertos.....</i>	<i>- 28 -</i>
B1. Primera Digestión	- 28 -
B2. Segunda digestión.....	- 29 -
<i>C. Reacción de ligación</i>	<i>- 31 -</i>
<i>D. Electroporación.....</i>	<i>- 31 -</i>
<i>E. Análisis de células transformantes</i>	<i>- 31 -</i>
<i>F. Purificación y verificación de plásmidos.....</i>	<i>- 32 -</i>

Obtención de las líneas de moscas transgénicas.....	- 33 -
Análisis de la expresión del transgen en líneas homocigas	- 35 -
<i>A. Análisis de la expresión del RNA mensajero correspondiente a las proteínas híbridas.</i>	<i>- 35 -</i>
A1. Aislamiento del RNA total	- 35 -
A2. Retrotranscripción	- 36 -
A3. PCR a partir del cDNA	- 36 -
<i>B. Análisis de la expresión de las proteínas híbridas</i>	<i>- 37 -</i>
B1. Preparación de extractos proteicos de mosca.	- 37 -
B2. Cuantificación de proteína.	- 38 -
B3. Experimentos tipo Western.....	- 38 -
B3.1 Separación electroforética de proteínas por SDS-PAGE.	- 39 -
B3.2 Electrotransferencia.....	- 39 -
B3.3 Inmunodetección	- 40 -
 RESULTADOS	 - 42 -
Clonación de productos de PCR en el vector pCR2.1.....	- 42 -
Subclonación de productos de PCR en vectores de expresión para generar moscas transgénicas.....	- 44 -
Obtención de las líneas de moscas transgénicas.....	- 49 -
Análisis de la expresión del transgen en líneas homocigas	- 50 -
<i>A. Análisis de la expresión del RNA mensajero correspondiente a las proteínas híbridas</i>	<i>- 50 -</i>
<i>B. Análisis de la expresión de las proteínas híbridas</i>	<i>- 52 -</i>
 DISCUSIÓN	 - 55 -
Líneas de moscas transgénicas generadas	- 55 -
Significado de ORF2.....	- 58 -
 CONCLUSIONES	 - 60 -
 PERSPECTIVAS	 - 61 -
 ANEXO 1.	 - 63 -
Líneas de moscas transgénicas.	- 63 -
 ABREVIATURAS	 - 65 -
 REFERENCIAS.....	 - 67 -

RESUMEN

TFIIH es un factor basal de transcripción formado por 10 proteínas, que también participa en la reparación del DNA y en el control del ciclo celular. Mutaciones en algunos de sus componentes se han relacionado con la presencia de enfermedades humanas hereditarias como Xeroderma Pigmentosum, Síndrome de Cockayne y Tricotodistrofia (TTD), cuyas características heterogéneas se asocian con defectos transcripcionales y/o de reparación del DNA. Específicamente, una forma fotosensible de TTD (TTD-A) tiene como causa genética la mutación del gen que codifica para la subunidad p8 (también denominada TTDA) del complejo TFIIH. Las células de estos pacientes presentan un reducido nivel de TFIIH, por lo que se ha sugerido que p8 tiene la función de estabilizar a este complejo. Interesantemente, el homólogo de p8 en *Drosophila melanogaster* está codificado en un transcrito bicistrónico. El primer marco de lectura abierta corresponde a la proteína p8; mientras que el segundo, codifica para una proteína de 150 aminoácidos de función desconocida que denominamos ORF2. Esta última posee un dominio de dedo de zinc tipo HIT y se encuentra conservada en todos los eucariotes. Ya que existen ejemplos de proteínas codificadas en transcritos bicistrónicos que se relacionan funcionalmente entre sí, es posible que la proteína ORF2 pueda formar parte del complejo TFIIH o esté involucrada en las funciones que este factor desempeña. En este trabajo se han obtenido herramientas importantes que permiten determinar la posible interacción física entre ORF2 y p8; o bien, entre ORF2 y algún otro componente del complejo TFIIH. Se generaron moscas transgénicas que expresan independientemente las proteínas p8 y ORF2 fusionadas a una etiqueta de 6-histidinas y del epítipo de c-myc, respectivamente. Estas moscas, además de utilizarse como plataforma para establecer si existe interacción entre estas proteínas, permiten el análisis de las funciones de p8 y ORF2 durante el desarrollo de la mosca.

INTRODUCCIÓN

El DNA, material genético de todos los organismos vivos, está continuamente expuesto a agentes físicos y químicos que dañan su estructura y es particularmente sensible durante los procesos de replicación, transcripción y recombinación (Lehmann, 2001; Reynaud, 1999). El mantenimiento de la integridad del genoma es entonces fundamental para la adecuada transmisión de la información genética. Para asegurar esta integridad todos los organismos han desarrollado diversos mecanismos para reparar o tolerar los diversos tipos de daño en el DNA.

Los procesos de reparación del DNA pueden restaurar tanto la secuencia normal de nucleótidos como la estructura dañada del DNA. Estos mecanismos de reparación se han clasificado según el tipo de daño que reparan. Dentro de los mecanismos que eliminan el daño causado a las bases del DNA está la Reparación por Escisión de Bases (BER, *Base Excision Repair*), que corrige las alteraciones de las bases que no ocasionan distorsiones en la hélice del DNA. Por otro lado, existe la Reparación por Escisión de Nucleótidos (NER, *Nucleotide Excision Repair*), la cual elimina pequeños segmentos de nucleótidos que llevan bases dañadas y que distorsionan la hélice del DNA (Fuss, 2006). NER es el mecanismo responsable de reparar bases con daños voluminosos, como aquellos causados por agentes químicos carcinogénicos (por ejemplo el benzo [a]pireno presente en los cigarrillos), y también detecta y repara la unión covalente entre dímeros de pirimidina causada por radiación ultravioleta (UV). Por ello, NER es una vía de reparación altamente conservada en los eucariotas, que requiere de la participación concertada de más de 30 proteínas para que el daño sea reconocido y reparado (Lindahl, 1997).

Cuando el mecanismo de NER ocurre en el DNA que no se está transcribiendo, es decir, en la mayor parte del genoma, se habla de la vía de Reparación Global del Genoma (GGR, *Global Genome Repair*). Sin embargo, ya que el bloqueo de la transcripción es una de las más graves consecuencias de las lesiones que distorsionan las hebras de DNA, durante la evolución fue seleccionada otra vía específica de NER denominada Reparación Acoplada a Transcripción (TCR, *Transcription Coupled Repair*) que permite detectar y reparar el daño presente en la hebra transcrita de genes activos para así poder continuar con la elongación de la transcripción (Vermeulen, 2000).

Uno de los componentes principales de NER es TFIIH, un complejo multiproteico que funciona como factor basal en la transcripción por la RNA polimerasa II y que participa en el control del ciclo celular (Egly, 2001; Fisher, 2005; Zurita, 2003). TFIIH está formado por 10 proteínas organizadas en dos subcomplejos (Figura 1.1). El subcomplejo central (“core”) contiene siete proteínas (XPD, XPB, p62, p52, p44, p34 y p8) mientras que el subcomplejo CAK (Cycling-Activating Kinase) incluye a la Cinasa 7 dependiente de ciclina (Cdk7), la Ciclina H (CycH) y la proteína MAT1 (Egly, 2001). Se sabe que algunas de las proteínas que conforman TFIIH presentan actividades enzimáticas; por ejemplo, XPD y XPB son dos helicasas dependientes de ATP con polaridades opuestas y son esenciales para la reparación y la transcripción del DNA, además XPD es la subunidad que une a los dos subcomplejos de TFIIH y su actividad de helicasa se estimula por p44 (Coin, 1998), la cual posee actividad de ligasa de ubiquitina (Takagi, 2005).

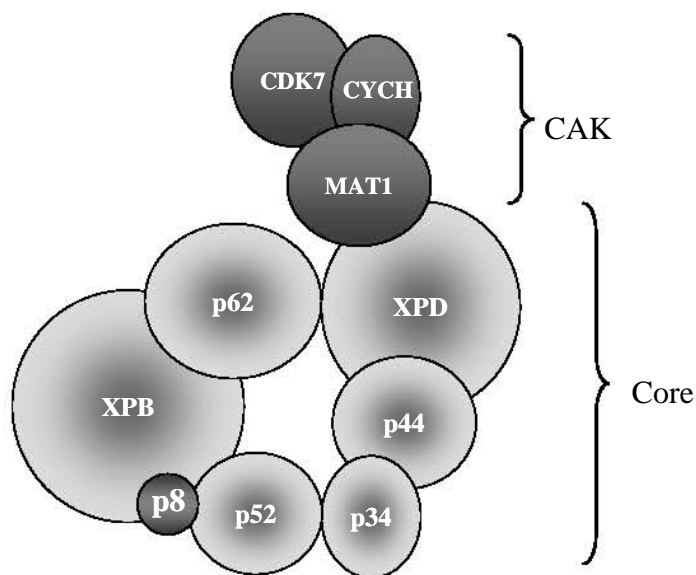


Figura 1.1. Representación gráfica del complejo TFIIH que muestra la composición proteica de los subcomplejos Core y CAK que lo conforman.

El complejo TFIIH tiene un papel importante en la iniciación de la transcripción, ya que las actividades de sus dos helicasas son esenciales para abrir el DNA en el sitio promotor, facilitando la síntesis del primer enlace fosfodiéster por la RNA polimerasa II y la liberación del complejo de la polimerasa del promotor (Lehmann, 2001). TFIIH participa también en la

elongación de la transcripción, donde Cdk7 fosforila el dominio carboxilo terminal (CTD) de la subunidad grande de la RNA polimerasa II, lo cual estimula que los factores basales de transcripción se liberen y comience la elongación del RNA mensajero. Asimismo, se sugiere que TFIIH posee un papel regulador, pues durante la transcripción interactúa con diversos factores como: receptores nucleares, factores de transcripción tejido-específicos y complejos de remodelación de la cromatina (Zurita, 2003). En resumen, TFIIH mantiene una intercomunicación con diferentes factores proteicos que participan en la iniciación, elongación y modulación de la transcripción mediada por la RNA polimerasa II.

Por otro lado, se ha propuesto que TFIIH interactúa directamente con algunos RNAs (como U1 RNA), lo cual puede facilitar la tasa de iniciación de la transcripción y establecer una posible conexión entre TFIIH y la maquinaria de procesamiento del RNA (Kwek, 2002). Además, aunque TFIIH se localiza normalmente en el nucleoplasma, también está presente en el nucleolo (donde ocurre la transcripción de rDNA) y existen evidencias de su asociación con la RNA polimerasa I (Hoogstraten, 2002; Iben, 2002).

Como ya se mencionó, otro proceso en el que TFIIH participa es en la reparación del DNA a través del mecanismo de NER, tanto en la vía GGR como en la TCR (Riedl, 2003); específicamente, este complejo se involucra cuando el daño en el DNA es ocasionado por la radiación UV. El mecanismo de NER puede dividirse en cinco etapas: reconocimiento del daño para iniciar la reparación, apertura y desenrollamiento de la hélice, incisión en ambos lados de la lesión, escisión del oligonucleótido que contiene el daño y, síntesis y ligación del DNA usando como secuencia iniciadora el extremo 3' de la cadena escindida y como templado la hebra no dañada de DNA (Figura 1.2; Fuss, 2006).

En la vía GGR, el reconocimiento de la distorsión de la hélice de DNA lo realizan los complejos XPE-DDB y XPC-hHR23B. El primero de éstos ubiquitina las histonas H3 y H4, lo que provoca el desalojo de éstas del nucleosoma; esto relaja la cromatina de los sitios aledaños a la región de daño y agiliza el acceso de otras proteínas de la maquinaria de reparación (Wang, 2006; Kapetanaki, 2006). Posteriormente, se reclutan TFIIH y la endonucleasa XPG y, las actividades de las helicasas del complejo TFIIH son quienes desenrollan la región dañada. En seguida, TFIIH, XPG, XPA y RPA forman un complejo que recluta a la segunda endonucleasa XPF y su acompañante ERCC1. XPG y XPF hacen las incisiones 5' y 3', respectivamente, en el sitio de la lesión. El espacio que deja la escisión del oligonucleótido

(25-32 nucleótidos) se restaura por las acciones de las proteínas PCNA, RFC, DNA polimerasa δ ó ϵ y una DNA ligasa (Lindahl, 1997; Fuss, 2006). Por otra parte, las lesiones al DNA ocasionadas por radiación UV pueden bloquear la elongación de la RNA polimerasa II en las regiones que están siendo transcritas. En este caso, el reconocimiento del daño al DNA a través del mecanismo TCR se realiza por la propia maquinaria de transcripción (la RNA polimerasa II estancada en la lesión), reclutando a TFIIH y XPG y, siguiendo una ruta similar a la vía GGR (Figura 1.2; Fuss, 2006).

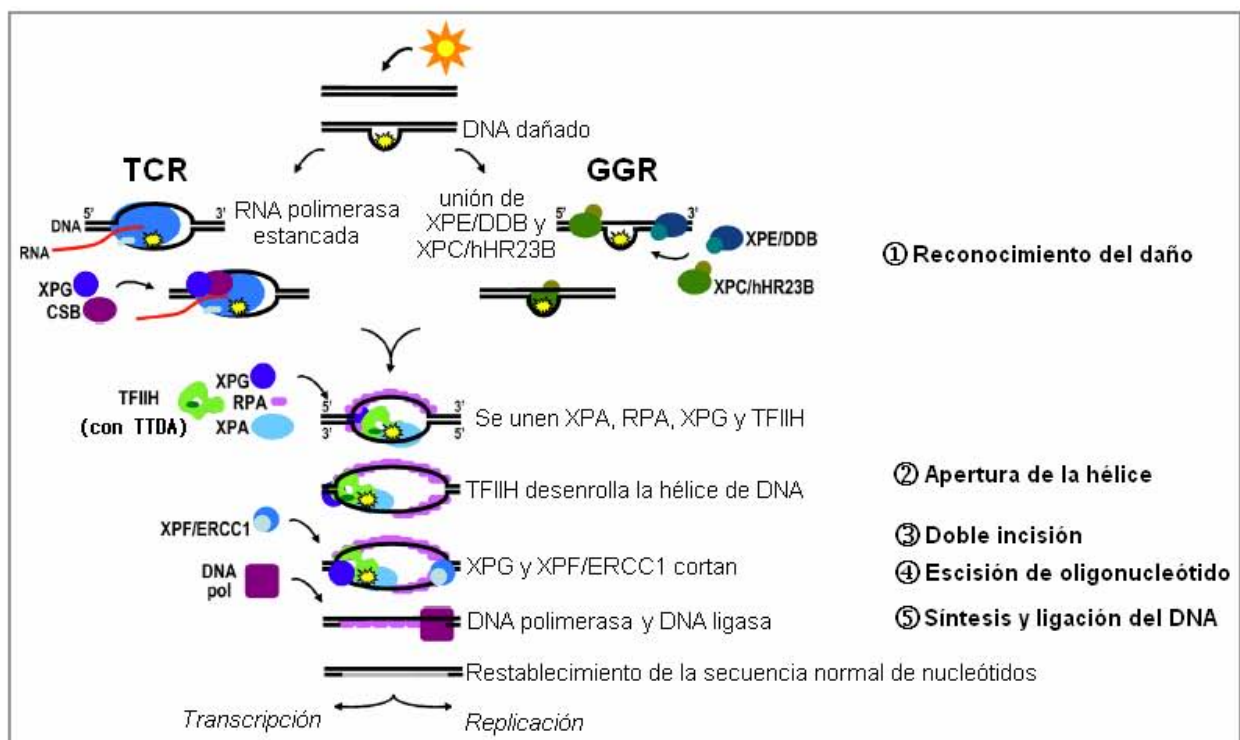


Figura 1.2. Esquema representativo del mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos (NER) donde se muestra la secuencia de las principales proteínas involucradas tanto en la vía de reparación acoplada a la transcripción (TCR) como en la vía de reparación global del genoma (GGR; Fuss, 2006).

Una de las razones por las cuales el estudio de TFIIH ha adquirido mayor relevancia es la relación encontrada entre mutaciones en alguno de sus componentes (XPB, XPD y p8) y la presencia de enfermedades humanas hereditarias como Xeroderma Pigmentosum (XP), Síndrome de Cockayne (CS) y Tricotiodistrofia (TTD), cuyas características heterogéneas se

asocian con defectos transcripcionales y/o de reparación del DNA (Lehmann, 2001; Zurita, 2003). Algunas de estas características se mencionan a continuación.

- (1) Xeroderma Pigmentosum: los individuos que padecen esta enfermedad presentan hiperpigmentación cutánea, sensibilidad al sol y alta incidencia de cáncer de piel, por lo que XP se ha relacionado con problemas en la reparación del DNA, específicamente en la vía de NER (Lehmann, 2001). En afecciones severas hay anomalías neurológicas causadas por muerte prematura de neuronas y retraso mental progresivo, lo cual puede atribuirse a deficiencias transcripcionales (Egly, 2001). En algunos casos, XP presenta características clínicas de CS.
- (2) Síndrome de Cockayne: provoca varios defectos durante el desarrollo como retraso en el crecimiento (enanismo caquéctico), inmadurez sexual, anomalías esqueléticas y degeneración mental progresiva debida a neurodesmielinización. Los individuos presentan moderada sensibilidad al sol sin predisposición a cáncer y sus células son sensibles a muerte por radiación UV como aquéllas de pacientes con XP. Este síndrome se correlaciona con defectos en el mecanismo de TCR (Egly, 2001; Lehmann, 2001).
- (3) Tricotiodistrofia: los pacientes con TTD presentan uñas y cabello quebradizos e ictiosis, defectos causados por una deficiencia de proteínas ricas en aminoácidos que contienen azufre (cisteína y metionina), y que son las encargadas de entrecruzar las fibras de queratina durante la diferenciación terminal de estos tejidos. Alrededor del 50% de pacientes con TTD presentan fotosensibilidad pero sin reportes de cáncer, lo cual se atribuye a deficiencias en el mecanismo de NER. Además del defecto en la reparación del DNA que muestra ser heterogéneo en los pacientes, se sugiere la alteración de la transcripción basal de algunos genes específicos que provocan otras características clínicas como son el retraso en el crecimiento y anomalías neurológicas (Egly, 2001; Itin, 2001; Lehmann, 2001).

Aunque la tricotiodistrofia normalmente es resultado de mutaciones en los genes *XPD* ó *XPB* que forman parte del complejo TFIIH, el defecto en NER del grupo de complementación A (TTD-A) tiene como causa genética la mutación de la subunidad p8 de TFIIH, recientemente encontrada en levadura y humano (Ranish, 2004; Giglia-Mari, 2004). Tal defecto en el mecanismo de NER se ha relacionado con el nivel reducido de TFIIH en

pacientes con TTD-A (Botta, 2002). A pesar de esta disminución en la concentración celular de TFIIH, sus actividades enzimáticas no están alteradas. Ésto indica que la estabilidad de TFIIH, y no su función, es la que está comprometida en éstas células y sugiere que la proteína p8 (también denominada TTDA) puede estabilizar el complejo TFIIH (Giglia-Mari, 2004).

En pacientes con TTD que presentan mutaciones en el gen *XPD* también existe una reducción sustancial en el nivel celular de TFIIH (Botta, 2002). Esta disminución en la concentración de TFIIH, tanto en células con mutaciones en *p8* como en aquéllas con mutaciones en *XPD*, puede restaurarse cuando se sobreexpresa la proteína p8, por lo que se propone que *p8* y *XPD* interactúan genéticamente (Coin, 2006).

Reportes recientes indican que la proteína p8 humana es la primera subunidad de TFIIH con un papel dedicado principalmente a la reparación del DNA por el mecanismo de NER. Coin *et al.* (2006) sugieren que p8 desencadena la apertura del DNA estimulando la actividad de ATPasa de XPB. Proponen un modelo en el que p8 podría requerirse para reclutar factores de NER después de que el “core” de TFIIH se localiza sobre la lesión del DNA; o bien, donde la unión de p8 a TFIIH desencadenaría un cambio conformacional que permite el reclutamiento de otros factores de NER. Por otro lado, se ha demostrado que p8 no es esencial para la transcripción *in vitro*, aunque la estabilidad de TFIIH se vea comprometida cuando existen mutaciones en *p8* que afectan, de manera indirecta, el nivel de transcripción en células altamente especializadas o terminalmente diferenciadas (Coin, 2006; Giglia-Mari, 2006).

p8 es una proteína de 72 aminoácidos que está conservada en todos los eucariotas (Ranish, 2004) incluyendo a *Drosophila melanogaster* (Figura 1.3), la mosca de la fruta, que es el organismo de estudio de nuestro grupo de trabajo. *Drosophila* ha demostrado ser un excelente modelo para realizar ensayos con genes que intervienen en funciones del desarrollo. Por ello, puede utilizarse como una herramienta que permite el estudio de las bases moleculares de las enfermedades humanas relacionadas con TFIIH.

En nuestro grupo, se buscó el homólogo de p8 en *D. melanogaster* a través del alineamiento de secuencias de aminoácidos (mediante un BLASTP), encontrándose que está codificado en un transcrito bicistrónico cuya región intergénica está muy conservada en todos los miembros del subgrupo *melanogaster* (Figura 1.4). El primer marco de lectura abierto del transcrito bicistrónico corresponde a la proteína p8 y el segundo codifica para una proteína de 150 aminoácidos de función desconocida. Esta última, que hemos denominado ORF2, posee

un dominio de dedo de zinc tipo HIT (contiene siete cisteínas conservadas y una histidina que potencialmente pueden coordinar dos átomos de zinc) y se encuentra igualmente conservada en los eucariotas. Aunque la función del dominio HIT no se conoce aún, este dominio se ha encontrado en proteínas nucleares involucradas en la regulación génica y la remodelación de la cromatina (Su, 2006).

En la mosca de la fruta, así como en otros organismos eucariotas, existen ejemplos de transcritos bicistrónicos. Normalmente las proteínas codificadas en transcritos bicistrónicos se relacionan entre sí funcionalmente. Tal es el caso de dos proteínas no colagenosas (sialoproteína y fosforina de dentina) que tienen una función reguladora en el proceso de mineralización asociado a la conversión de predentina en dentina; estas dos proteínas relacionadas funcionalmente se traducen a partir de una sola unidad transcripcional en mamíferos (Ritchie, 1997).

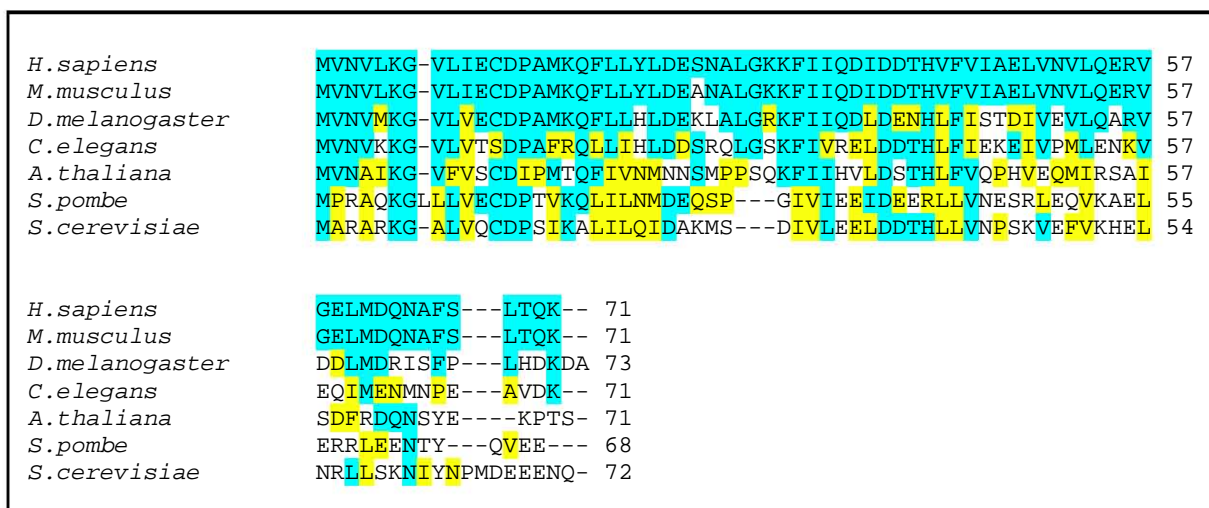


Figura 1.3. p8 se encuentra conservado en los eucariotas. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de los ortólogos de p8 en *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Arabidopsis thaliana*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Saccharomyces cerevisiae*. Los aminoácidos idénticos se marcan con recuadros turquesa, mientras que los residuos con propiedades físico-químicas relacionadas se resaltan en amarillo. El alineamiento se realizó con el programa CLUSTAL W versión 1.83 (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>).

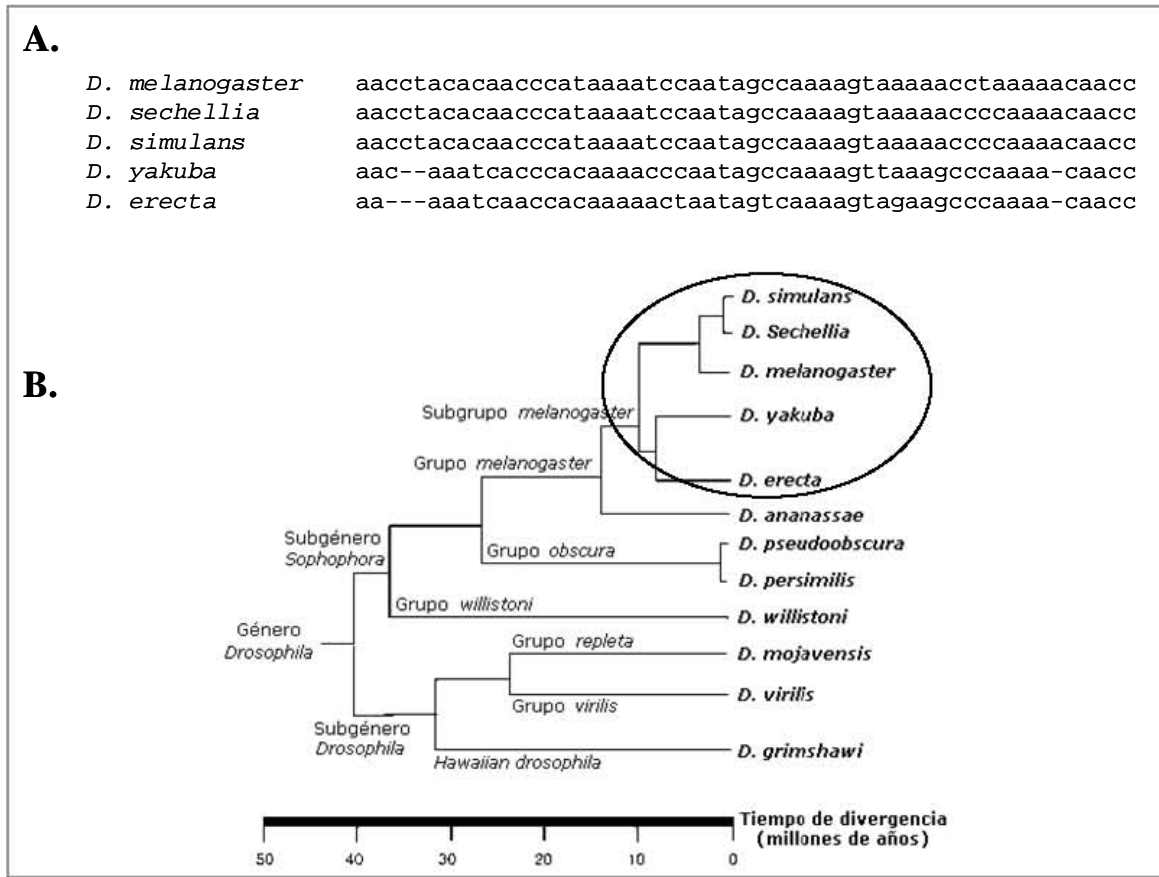


Figura 1.4. (A) Alineamiento de la secuencia intergénica del bicistrón de p8 y ORF2 en las especies del subgrupo *melanogaster*. (B) Árbol filogenético de especies del género *Drosophila* cuyo genoma está secuenciado. Las especies en las que se conserva la región intergénica del bicistrón de p8 y ORF2 se señalan dentro del óvalo.

Por consiguiente, habiéndose encontrado que el homólogo de TTDA (p8) en *Drosophila* se encuentra codificado en un transcrito bicistrónico y sabiendo que las proteínas codificadas por este tipo de transcritos pueden estar relacionadas funcionalmente, se propone que la proteína ORF2 interactúa con la proteína p8, o bien, con otros componentes de TFIID. En este trabajo se describe la generación de moscas transgénicas que expresan independientemente proteínas de fusión de p8 y ORF2, como una herramienta importante para el estudio de las funciones de éstas proteínas en la mosca de la fruta.

JUSTIFICACIÓN

La mosca de la fruta es un organismo utilizado como modelo para estudios genéticos y de desarrollo. Dentro de las ventajas que *D. melanogaster* ofrece se encuentran las siguientes: es un organismo pequeño y fácil de crecer en el laboratorio; su tiempo de generación es corto (alrededor de dos semanas) y su progenie abundante; su genoma incluye solo cuatro pares de cromosomas, que pueden visualizarse directamente en los cromosomas politénicos de las glándulas salivales de las larvas del tercer instar; los machos no presentan recombinación meiótica; su genoma está secuenciado; el exoesqueleto de las moscas posee abundantes características (quetas, venas de las alas, ojos compuestos, etc.) que pueden verse afectadas por mutaciones (Rubin, 2000).

Además, un sorprendente número de procesos involucrados en el desarrollo parecen estar conservados entre moscas y vertebrados, a pesar de haber divergido hace más de 700 millones de años. El ser humano es, genéticamente, 44% similar a la mosca de la fruta; el 50% de las secuencias proteicas de la mosca tienen homólogos en mamíferos y alrededor del 60% de los genes conocidos que participan en enfermedades humanas tienen homólogos en *Drosophila* (Reiter, 2001; Johnston, 2002). Un ejemplo de esto último es la relación encontrada entre mutaciones en algunos componentes del complejo TFIIH y la presencia, en la mosca, de características fenotípicas comparables a las enfermedades humanas XP, CS y TTD (Merino, 2002). Por ello, con el afán de aportar información sobre las bases moleculares de las enfermedades humanas relacionadas con este complejo, en este trabajo se utiliza a la mosca de la fruta como herramienta de estudio para determinar si existe una posible interacción física entre ORF2 y p8, o con algún otro componente de TFIIH.

HIPÓTESIS

La proteína ORF2, codificada en el segundo marco de lectura del transcrito bicistrónico del homólogo de TTDA (p8) en *Drosophila*, puede formar parte del complejo TFIIH, o bien, asociarse directamente con alguna subunidad de TFIIH fuera del complejo.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Generar las herramientas para analizar si la proteína ORF2 interactúa físicamente con TTDA (p8) o con otro componente del complejo TFIIH usando a *Drosophila melanogaster* como organismo modelo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Generar moscas transgénicas que expresen independientemente las proteínas TTDA (p8) y ORF2 fusionadas a etiquetas de 6-Histidinas (6His) y epítotope de c-myc (Myc), respectivamente.
- Determinar que la expresión de las proteínas híbridas en las moscas transgénicas sea la esperada.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Generación de moscas transgénicas

Con la finalidad de obtener una herramienta que permita el estudio detallado de las proteínas TTDA (p8) y ORF2, se planteó generar moscas transgénicas que expresaran independientemente dichas proteínas fusionadas a una etiqueta de 6-Histidinas (6His) y del epítopo de c-myc (Myc), respectivamente.

Una estrategia ampliamente utilizada para generar moscas transgénicas es la inserción de elementos P, que son secuencias transponibles de DNA naturalmente encontradas en *Drosophila*. El gen de interés se clona en medio de los extremos del elemento P, el cual se integrará en diferentes sitios del cromosoma de manera aleatoria (Gilbert, 2003). La transformación en *Drosophila* se realiza por la inyección del DNA dentro de los embriones, antes del tiempo de formación de las células polares. Aunque las secuencias plasmídicas se expresan en los individuos inyectados aún sin la integración, la transformación estable ocurre cuando el DNA inyectado se integra al DNA de la línea germinal del hospedero. De este modo, pueden ocurrir una o más integraciones independientes del DNA inyectado dentro de los embriones, en diferentes células de la línea germinal de un solo individuo (Ashburner, 2004).

Los vectores de expresión específicos para mosca que se usaron en la generación de las moscas transgénicas, permiten que las proteínas híbridas se expresen de manera constitutiva (utilizando el vector pCaSpeR^{HSP83}, que posee el promotor HSP83) y de forma dirigida en determinados tejidos (empleando el vector pUAST, cuyo promotor es HSP70). Cabe mencionar que se seguirá un esquema de cruza para obtener líneas independientes y homocigas de moscas transgénicas que expresen cada proteína de interés.

Expresión del transgen en las líneas de moscas transgénicas

Se ha reportado que, en *Drosophila*, los transposones pueden rearrreglarse después de la integración, lo cual puede modificar o eliminar su expresión (Ashburner, 2004). Por ello, es importante verificar la expresión del transgen a nivel molecular, una vez obtenidas las líneas independientes de moscas transgénicas. Con este fin, se planteó analizar la presencia del transcrito correspondiente a las proteínas híbridas mediante la técnica de RT-PCR, en las

distintas líneas de moscas transgénicas establecidas. Por otro lado, se propuso identificar las líneas que expresen las proteínas de interés a través de ensayos tipo “Western”, utilizando extractos proteicos obtenidos a partir de moscas adultas y los anticuerpos disponibles contra las etiquetas de 6His y Myc.

MATERIAL Y MÉTODOS

Amplificación por PCR de los fragmentos de DNA de las proteínas híbridas

La amplificación de los fragmentos de DNA de las proteínas híbridas se hizo a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Cada reacción de PCR se efectuó en un volumen final de 50 µl con la siguiente composición: 5 µl de buffer de PCR 10X, 3 µl de MgCl₂ 25 mM, 2.5 µl de una mezcla de los 4 desoxinucleótidos (5 mM de cada uno), 500 ng de cada oligo 5' y 3', 1 µg de DNA molde (vectores pBluescript-SK o pGEX) y 1 U de enzima *Taq* polimerasa (Roche). La combinación de oligos empleada para las reacciones de PCR fue como sigue:

- Para amplificar TTDA con etiqueta de 6-Histidinas (6His) en su extremo amino:
Hisp8-5' (5'-ATGCATCACCATCATCACCACATGGTAAATGTTATGAAAGGA- 3')
p8-3' (5'-CTAAGCGTCCTTGTCGTGCAGCGGAAA- 3')
- Para amplificar TTDA con etiqueta de 6His en su extremo carboxilo:
p8-5' (5'-GGCAACATGGTAAATGTTATGAAAGGA- 3')
p8His-3' (5'-CTAGTGGTGATGATGGTGATGAGCGTCCTTGTCGTGCAGCGG- 3')
- Para amplificar ORF2 con etiqueta del epítoto de c-myc (Myc) en su extremo amino:
MycORF-5' (5'-ATGGAGCAGAAGCTCATCTCTGAAGAGGACCTAATGACGGGT
CGCGAATCC- 3')
ORF-3' (5'-TCAGGCCGTCCACTTGAGGCAGCGCGT- 3')
- Para amplificar ORF2 con etiqueta de Myc en su extremo carboxilo:
ORF-5' (5'-ACAACCATGACGGGTCGCGAATCCAAC- 3')
ORFMyc-3' (5'-CTATAGGTCCTCTTCAGAGATGAGCTTCTGCTCGGCCGTCCAC
TTGAGGCA- 3')

Las condiciones de PCR utilizadas fueron: un ciclo de 5 minutos a 94°C, 30 ciclos de: 50 segundos a 92°C, 45 segundos a 53°C y 50 segundos a 60°C y, por último, 7 minutos a 72°C y mantenimiento de la reacción a 4°C. Finalmente, cada producto de PCR fue separado en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio y fueron recuperados extrayendo el DNA de estos geles como se describe más adelante. En la figura 7.1 se esquematiza la manera en que se generaron las secuencias de DNA de las proteínas híbridas de p8 y ORF2 utilizando la técnica de PCR.

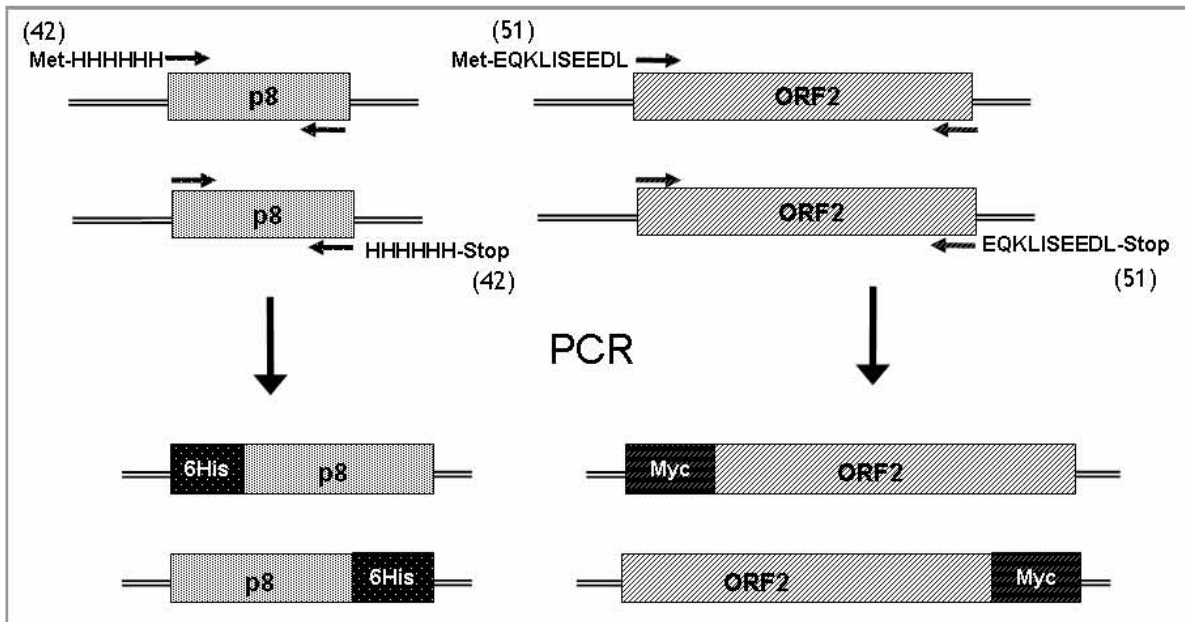


Figura 7.1. Esquema que indica la estrategia utilizada para amplificar la secuencia de DNA de las proteínas híbridas de p8 con una etiqueta de 6His y de ORF2 con una etiqueta de Myc (EQKLISEEDL).

Purificación de oligonucleótidos

Para la purificación de los oligos Hisp8-5', p8His-3', MycORF-5' y ORFMyc-3' se siguió el protocolo establecido en el laboratorio. Se empleó una solución de acrilamida/bisacrilamida al 20% y urea 8M para preparar el gel en el que se separaron las muestras de cada oligo. Se utilizó una cámara de electroforesis Tall-Mighty (cámara vertical) y como solución amortiguadora TBE 1X. Cada muestra de 150 μ l de oligo se mezcló con 30 μ l de buffer de Muestra tipo III (Sambrook, 1989) y se calentaron a 65°C por 5 minutos antes de colocarlas en el gel. Las condiciones de electroforesis fueron 400 V por dos horas. Se observó un barrido de bandas cuya zona superior correspondía a las secuencias de mayor longitud y, por lo tanto, a las más completas respecto a la secuencia del oligo de interés; por ello, al finalizar la corrida, se cortó este fragmento superior del gel con ayuda de un bisturí, empleando una placa de albúmina y una lámpara de luz UV de onda corta para visualizarlo. Cada fragmento de agarosa se introdujo en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se dejó eluyendo en agua bidestilada estéril toda la noche a una temperatura de 37°C. Al día siguiente, la elución se concentró en un evaporador hasta que el volumen final fue de aproximadamente 100 μ l.

Finalmente se hizo una precipitación del DNA con 1-butanol, la pastilla obtenida se lavó con etanol absoluto y una vez seca se resuspendió en 50 µl de agua bidestilada estéril.

La cuantificación del oligo purificado se hizo midiendo su absorción de UV a 260 nm con ayuda de un espectrofotómetro de UV. La cantidad de oligonucleótido expresada en µg/µl se calculó con la siguiente ecuación:

[Sabido que 1 unidad de D.O. de ssDNA = 33 µg/ml]

$$\left[\frac{\text{Lectura D.O.}_{260}}{\text{dilución de la muestra}} \right] \left[33 \mu\text{g/ml} \right]$$

$$(\text{Lectura D.O.}_{260} / 16.66) (33 \mu\text{g/ml})$$

La relación A_{260} / A_{280} del ssDNA indicó la pureza de la muestra. La pureza de dicho DNA fue óptima, con valores de 1.6 – 1.9 de A_{260}/A_{280} .

Extracción de DNA de geles de agarosa

Cada uno de los productos de PCR obtenidos se separaron en un gel preparativo de agarosa al 1.5%. Para la recuperación de cada una de las bandas de interés se empleó el kit de extracción en gel “Qiaex II” (Qiagen), siguiendo el protocolo descrito por el proveedor. Según dicho protocolo, la banda de DNA se corta del gel con ayuda de una navaja limpia y se deposita en un tubo Eppendorf. Se adicionan 300 µl de buffer QX1 por cada 100 mg de gel y 30 µl de perlas Qiaex II por cada 10 µg de DNA, luego se mezcla por inversión. Después de incubar 10 minutos a 50°C manteniendo la suspensión, la mezcla se centrifuga por 30 segundos a máxima velocidad en una microcentrífuga y se remueve el sobrenadante. La pastilla de perlas, que lleva unido el DNA de interés, se lava con 500 µl de buffer QX1 y se mezcla por inversión, esto permite remover los residuos contaminantes de agarosa. La mezcla se centrifuga por 30 segundos a máxima velocidad y se remueve el sobrenadante. La pastilla de perlas se lava con 500 µl de buffer PE y se mezcla por inversión antes de centrifugar por otros 30 segundos a máxima velocidad; este último paso se repite y con ello se eliminan los residuos de sales contaminantes. La pastilla se deja secar 10 minutos a temperatura ambiente y se realizan dos eluciones para recuperar el DNA que se unió a las perlas. La primera elución, que consistió en resuspender la pastilla en 40 µl de agua bidestilada estéril e incubar por 5 minutos a temperatura ambiente, se recuperó en un tubo Eppendorf nuevo. La segunda elución

se realizó con 20 µl de agua bidestilada estéril en las mismas condiciones que la primera. Finalmente, la cantidad de DNA recuperado en cada elución se cuantificó en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.

Clonación de los productos de PCR en el vector de pCR2.1

A. Reacción de Ligación

Una vez amplificadas las secuencias que codifican para las proteínas híbridas de interés y después de haber purificado el DNA mediante su extracción de geles de agarosa, se realizó la reacción de ligación de los productos de PCR con el vector de clonación pCR2.1 (Invitrogen; Figura 7.2).

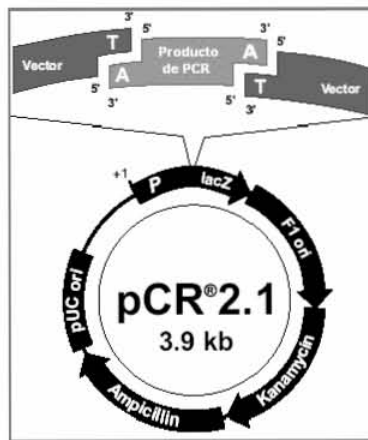


Figura 7.2. Plásmido pCR2.1.

Fuente: http://www.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcr2_1_map.pdf

Para las reacciones de ligación se consideró una relación final de 3 : 1 (inserto : vector). Cada reacción de ligación se realizó en un volumen final de 10 µl que incluían: 25 ng de vector pCR2.1, la cantidad adecuada de DNA de producto de PCR para guardar la proporción deseada 3:1, 1 µl de buffer de ligación 10X y 5U de la enzima T4 DNA ligasa (Invitrogen). Las reacciones se incubaron en un termociclador Perkin Elmer, GeneAmp 2400, a una temperatura de 14°C durante toda la noche.

Se eliminaron las sales presentes en las reacciones de ligación empleando 1 ml de 1-butanol para precipitar el DNA; la mezcla se centrifugó por 15 minutos a máxima velocidad en una microcentrífuga. La pastilla obtenida se sometió a 4 lavados con etanol al 70%, seguido

cada uno de ellos por una centrifugación de 5 minutos a máxima velocidad; luego se dejó secar a temperatura ambiente por 10 minutos. Después se resuspendió en 10 µl de agua bidestilada estéril.

B. Transformación de células electrocompetentes

B1. Preparación de células electrocompetentes DH5α

Para la preparación de células electrocompetentes DH5α de *E. coli* se siguió el siguiente protocolo. Se inoculan 500 ml de medio Luria-Bertani (LB) fresco con 5 ml de un cultivo crecido toda la noche (ON) en agitación a 37°C y se dejó incubar hasta que alcanzó 0.4-0.6 de A₆₀₀. Después de reposar en hielo 15 minutos, las bacterias se centrifugaron a 5,000 rpm por 10 minutos y la pastilla se resuspendió en 2.5 ml de agua helada. Luego se añadió el mismo volumen de agua respecto al de LB del que se partió y se realizó una segunda centrifugación en las mismas condiciones que la anterior. La nueva pastilla se resuspendió en 2.5 ml de agua helada y se añadió la mitad del volumen de agua respecto al inicial de LB. Se repitió la centrifugación y la pastilla se resuspendió ahora en 10 ml de glicerol frío al 10%. La mezcla se transfirió a tubos Falcon de 50 ml y se centrifugó 10 minutos a 5,000 rpm. La pastilla obtenida se resuspendió en 2-3 ml de glicerol al 10% para finalmente dividirla en alícuotas de 40 µl que se preservaron a -70°C.

Para calcular la eficiencia de las células preparadas, se realizó la electroporación (protocolo descrito más adelante) de 40 µl de células DH5α con 1 ng de un vector control de alto número de copias (vector PKS). Diez µl de la reacción de transformación se mezclaron con 990 µl de medio SOC (dilución 1:1000) y se espatularon 100 µl de esta mezcla en cajas de LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml). Se incubaron las cajas a 37°C durante toda la noche y, al día siguiente se hizo el conteo de las colonias generadas. El cálculo de la eficiencia se hizo empleando la siguiente fórmula:

$$\left[\frac{\# \text{ de cfu en caja control}}{\text{ng de vector superenrollado espatulado}} \right] \left[\frac{10^3 \text{ ng}}{1 \mu\text{g}} \right] \left[\text{dilución final} \right]$$

Finalmente, se eliminaron las sales presentes en las reacciones de ligación de la manera previamente descrita, y el DNA precipitado se resuspendió en 10 µl de agua bidestilada estéril.

B2. Electroporación y selección de células transformantes

Las células electrocompetentes DH5 α se transformaron utilizando 5 μ l de la reacción de ligación libre de sales. Cada reacción de transformación se realizó de la siguiente manera: una vez mezclados los 5 μ l de reacción de ligación con una alícuota de 40 μ l de células competentes, éstos se incubaron 30 minutos en hielo. Luego, la mezcla se pasó a una celda de electroporación fría y se sometió a un choque eléctrico instantáneo de 1.8 mV en un electroporador (Micropulser, BioRad), colocándose enseguida en hielo. Luego se adicionó 1 ml de medio SOC (medio SOB suplementado con MgCl₂ 2 mM y Glucosa 2 mM) a temperatura ambiente y la nueva mezcla se dejó crecer a 37°C por una hora con agitación constante. Transcurrido ese tiempo, se espatularon 100 μ l de estas bacterias y 100 μ l de una dilución 1:10 sobre cajas de LB suplementadas con kanamicina (50 μ g/ml), en donde además se había adicionado IPTG 4 mM como inductor y X-Gal 1.6 mg/ml. Se dejaron crecer las células toda la noche a 37°C y al día siguiente se hizo la selección de colonias blancas (positivas). Como control negativo se electroporaron 5 μ l de una reacción de auto-ligación del vector pCR2.1, es decir, donde no se adicionó producto de PCR alguno.

C. Análisis de células transformantes

Luego de haber seleccionado las colonias blancas que presumiblemente llevaban el inserto de interés, éstas se analizaron mediante PCRs de colonia. Este método consistió en tomar 15 colonias blancas de manera independiente con ayuda de una punta para micropipeta, inocularla en una caja de LB-kanamicina con IPTG 4 mM y X-Gal 1.6 mg/ml, y el resto disolverlo en una mezcla de reacción de PCR. Cada reacción de PCR se realizó en un volumen final de 10 μ l. Inicialmente se preparó un “cocktail” general de mezcla de reacción de PCR que contenía las proporciones antes descritas para cada componente, empleándose como oligos para la amplificación M13-Reverse y M13-Forward, cuyas secuencias se muestran más adelante. Las condiciones de PCR utilizadas fueron: un ciclo de 5 minutos a 94°C, 30 ciclos de: 45 segundos a 92°C, 45 segundos a 55°C y 45 segundos a 72°C; finalmente 7 minutos a 72°C y mantenimiento de la reacción a 4°C. Por último, las reacciones de PCR se resolvieron en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio. Mientras las cajas inoculadas se incubaron a 37°C durante toda la noche y se almacenaron a 4°C para su uso posterior.

Secuencias de oligos M13: M13-Reverse (5' - CAGGAAACAGCTATGAC- 3')
M13-Forward (5' -GTTTTCCCAGTCACGAC- 3')

Purificación de plásmidos

Los plásmidos se aislaron a partir de 3 ml de cultivo de bacterias inoculado con una de las colonias positivas previamente seleccionada a través de reacciones de PCR para comprobar la presencia del plásmido con el inserto de interés; cada cultivo se creció con agitación por toda una noche a 37°C. Se escogieron dos clonas distintas para cada una de las cuatro construcciones que codifican para las proteínas híbridas de TTDA y ORF2 con sus etiquetas respectivas, tanto en su extremo amino como en el carboxilo. Se prepararon cultivos bacterianos en 5ml de medio líquido LB suplementado con kanamicina (50 µg/ml), 3 ml se emplearon para el análisis de los plásmidos recombinantes y los 2 ml restantes para preparar concentrados de glicerol de cada clona bacteriana para almacenamiento prolongado a -70°C. Dichos concentrados contenían 180 µl de glicerol y 850 µl de cultivo bacteriano de toda la noche.

Todos los plásmidos se obtuvieron siguiendo el protocolo del manual de purificación para plásmidos de “Qiagen Plasmid Mini kit” (Qiagen). Las bacterias de cada cultivo se precipitaron mediante centrifugación por 5 minutos a velocidad máxima en una microcentrífuga, a temperatura ambiente. La pastilla obtenida se resuspendió por completo en 300 µl de buffer P1 suplementado con RNasa A, luego se adicionaron 300 µl de buffer P2 (solución de lisis), se mezcló por inversión y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. El SDS presente en el buffer P2 disuelve los fosfolípidos y proteínas componentes de membrana permitiendo la lisis y la liberación del contenido celular; además, esta solución contiene NaOH que desnaturaliza el DNA de los cromosomas y plásmidos presentes, así como a las proteínas, por ello, el tiempo óptimo de reacción es el que permite que se libere el DNA plasmídico y no el cromosomal, y minimiza la exposición de DNA plasmídico a las condiciones desnaturizantes; por otro lado, el mezclar suavemente (no utilizando vórtex) la reacción de lisis previene la contaminación de DNA plasmídico con DNA cromosomal (Manual Qiagen).

El lisado viscoso obtenido se neutralizó con 300 µl de buffer P3 frío, se mezcló nuevamente por inversión y, la mezcla se incubó 5 minutos en hielo. Con ésto se asegura la precipitación completa del detergente SDS para evitar que inhiba la unión del DNA a la resina; además, los complejos de detergente y sal que se forman atrapan las proteínas desnaturizadas, el DNA cromosomal y los restos celulares (Manual Qiagen). Como el DNA

plasmídico es más pequeño y covalentemente cerrado, se renaturaliza correctamente y se mantiene en solución.

Una vez realizada la reacción de neutralización, la muestra se centrifugó 10 minutos a máxima velocidad en una microcentrífuga. Mientras tanto, las columnas Qiagen-tip 20 se equilibraron con 1 ml de buffer QBT. Luego, el sobrenadante producto de la centrifugación, se retiró del tubo con ayuda de una micropipeta, se colocó en la columna y se permitió su entrada a la resina. Después se hicieron 4 lavados de cada columna con 1 ml de buffer QC (solución de lavado), el cual contiene NaCl 1 M que elimina cualquier contaminante pero no afecta la unión del DNA con la resina, a su vez rompe interacciones inespecíficas y elimina las proteínas que pueden unir ácidos nucleicos; la baja concentración de alcohol en el buffer de lavado también elimina interacciones hidrofóbicas inespecíficas.

Finalmente se realizó la elución del DNA plasmídico que se había unido a la resina de la columna. Se utilizaron 800 μ l de buffer QF, que contiene NaCl 1.25 M a pH 8.5. El DNA eluído se desaló y se concentró por precipitación con 560 μ l de isopropanol a temperatura ambiente. Luego se centrifugó 30 minutos a máxima velocidad en una microcentrífuga y el sobrenadante se decantó cuidadosamente. La pastilla de DNA obtenida se lavó, dos veces, con 100 μ l de etanol al 70% a temperatura ambiente y una centrifugación a máxima velocidad por 5 minutos; esto remueve sales residuales y reemplaza el isopropanol con etanol, que es más volátil y fácil de eliminar. La pastilla se dejó secar por 5 minutos y se resuspendió en 50 μ l de agua bidestilada estéril. La calidad de DNA plasmídico recuperado se cuantificó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y se cuantificó por lectura de A_{260} en un espectrofotómetro (Eppendorf BioPhotometer).

Verificación de plásmidos

A. Análisis de restricción

Una vez aislados los plásmidos se verificó que fueran los correctos mediante un análisis de restricción y mediante reacciones de secuenciación. Para el análisis de restricción se realizó una reacción de digestión con la enzima *EcoR I* (Roche), de forma que se liberara del plásmido pCR2.1 un fragmento de DNA cuya longitud coincidiera con el número de pares de bases (pb) de las secuencias que codifican para las proteínas híbridas, más 16 pb

adicionales hasta el sitio de corte para *EcoR I*. La reacción de digestión contenía: 2.5 µl de buffer H 10X, 1 µg de DNA plasmídico y 1 U de enzima *EcoR I*, todo en un volumen final de 25 µl. Cada reacción se dejó incubar por 3-4 horas a 37°C. Después de ese tiempo, cada reacción se separó en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.

B. Secuenciación

Una vez corroborada la presencia de los insertos obtenidos por PCR en el plásmido fue necesaria la secuenciación de éstos para: (1) confirmar que no existiera ninguna mutación puntual en su secuencia de nucleótidos que ocasionara modificaciones en la secuencia de aminoácidos de las proteínas híbridas, y (2) conocer la orientación del inserto.

Las muestras para secuenciación se prepararon como lo indica la Unidad de Secuencia del Instituto de Biotecnología, UNAM: a 500-750 ng de DNA plasmídico se añadieron 5 pmol del oligo específico (complementarios a los extremos 5' o 3' de la secuencia de DNA que codifica para la proteína híbrida en cuestión) y la mezcla se llevó a un volumen final de 16 µl.

Subclonación de los productos de PCR en vectores de expresión específicos de mosca

Para la construcción de los vectores de expresión específicos para *Drosophila melanogaster*, los DNAs sintetizados y clonados en el vector de pCR2.1 que codifican para las proteínas híbridas TTDA con etiqueta de 6His y ORF2 con etiqueta de Myc, fueron tratados con la combinación adecuada de endonucleasas de restricción que permitieran su inserción en los vectores de expresión pUAST (DGRC) y pCaSpeR^{HSP83} (DGRC*). Los fragmentos producidos por la digestión enzimática (producto de PCR con secuencias específicas de restricción en sus extremos) fueron separados en un gel de agarosa al 1.5% y purificados con el kit “Qiaex II” (Qiagen) siguiendo el protocolo previamente descrito. Una vez purificados los insertos digeridos se combinaron con el vector de expresión deseado, previamente digerido con la misma combinación de enzimas que el inserto específico, y se trataron con T4 DNA ligasa. Los productos de la mezcla de ligación y de las mezclas control (vectores auto-ligados en ausencia de inserto) se introdujeron en células competentes de *E. coli DH5α* con el protocolo de electroporación ya descrito. Las células transformantes se caracterizaron para corroborar la presencia del inserto de interés y, finalmente se secuenciaron. A continuación se

describen detalladamente cada uno de los pasos utilizados para la subclonación de los productos de PCR en los vectores de expresión de mosca.

Es importante mencionar que los vectores de expresión utilizados para la generación de estas moscas transgénicas son capaces de inducir dos tipos de expresión del transgen: (1) expresión constitutiva, debida al promotor HSP83 presente en el vector pCaSpeR^{HSP83}, ó (2) expresión dirigida en determinados tejidos, debida al promotor HSP70 bajo el control del sistema UAS/GAL4 presente en el vector pUAST (Figura 7.3).

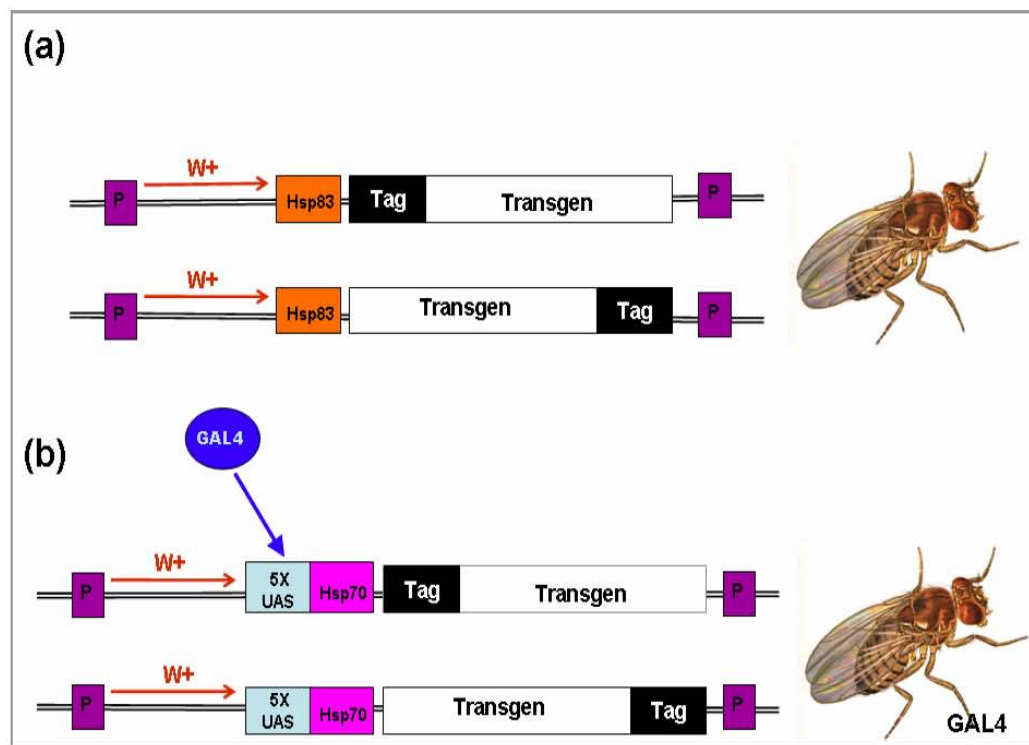


Figura 7.3. Expresión del transgen según el tipo de vector de expresión utilizado para la generación de las moscas transgénicas. (a) Expresión basal continua del transgen en las moscas generadas con el vector pCaSpeR^{HSP83}, debido a la presencia del promotor constitutivo HSP83. (b) Expresión dirigida del transgen en los tejidos donde está presente la proteína GAL4, que funciona como activador de la transcripción cuando reconoce la secuencia UAS (upstream activating sequence). El vector pUAST posee el promotor HSP70 y cinco copias de la secuencia UAS.

A. Verificación de sitios únicos de restricción deseados en los vectores de expresión

Una vez seleccionada la combinación de las dos endonucleasas de restricción que permitan la clonación dirigida de los insertos de interés en los vectores pUAST y pCaSpeR^{HSP83}, se analizó que éstas tuvieran sitios únicos de corte en los vectores y que no existiera sitio de corte dentro de la secuencia de los insertos; este análisis se hizo con la ayuda del programa NEBcutter (disponible en la dirección electrónica <http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>). Posteriormente se verificó la información obtenida, a través de reacciones de digestión independientes con cada una de las enzimas de restricción seleccionadas para 1 µg de cada vector. Las enzimas utilizadas para cada vector fueron:

- ~ Para pUAST: *Not I* (Biolabs) y *Kpn I* (Roche)
- ~ Para pCaSpeR^{HSP83}: *Xho I*, *BamH I* y *EcoR I* (todas de Roche)

Cada reacción de digestión se realizó en un volumen final de 25 µl, se emplearon 2.5 µl del buffer 10X adecuado [NE buffer 3 para *Not I* (Biolabs), buffer L para *Kpn I* (Roche), buffer B para *BamH I* (Roche), buffer H para *Xho I* y *EcoR I* (Roche)], 2.5 µl de BSA 10X para digestiones con *Not I* y *Kpn I*, y 2 U de enzima. Se incubaron toda la noche a temperatura ambiente y al día siguiente se separaron en un gel de agarosa al 1.5%.

B. Digestiones de vectores de expresión e insertos

B1. Primera Digestión

Cada uno de los plásmidos pCR2.1 (portadores de una de las cuatro construcciones que codifican para las proteínas híbridas de interés), así como ambos vectores de expresión, fueron digeridos con la primera enzima de restricción como se indica en la Tabla 1. Para el caso de los vectores de expresión, cada reacción de digestión se preparó con 4 µg de vector pUAST o pCaSpeR^{HSP83}, 10 µl de buffer 10X adecuado para cada enzima y 5 U de endonucleasa de restricción; el volumen final fue de 100 µl. Para los vectores pCR2.1 las reacciones se prepararon con 3 µg de DNA del vector, 5 µl de buffer de digestión 10X y 4 U de enzima, en un volumen final de 50 µl. Todas las reacciones de digestión se incubaron a 37°C por 3 horas. Después de este tiempo, la digestión se corroboró separando 2 µl de reacción en un minigel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio.

Posteriormente, el DNA presente en la reacción de digestión restante (excepto para los vectores pCR2.1 digeridos con *EcoR I*) se recuperó mediante una extracción fenol-cloroformo-

isoamílico (FCI) que consistió en agregar 1 volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico, con respecto al volumen original. Se mezcló por inversión y después se centrifugó a 14,000 rpm por 10 minutos a 4°C en una microcentrífuga; con ésto se separa la fase acuosa (que contiene el DNA) de la orgánica (que contiene las proteínas). En un nuevo tubo Eppendorf se recuperó la fase acuosa y se precipitó por la adición de 2 volúmenes de etanol absoluto respecto al volumen recuperado; luego de mezclar por inversión, se agregó 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M a pH 5.3 y se dejó la mezcla a -20°C toda la noche. Al día siguiente se centrifugó la mezcla (a 14,000 rpm, 1 hora a 4°C) para obtener la pastilla de DNA, la cual fue lavada dos veces con 100 µl de etanol al 70% para eliminar las sales presentes, centrifugándose a 14,000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente, cada vez. Se decantó el etanol y la pastilla se secó por 5-10 minutos y se resuspendió en 100 µl de agua bidestilada estéril para los vectores pUAST y pCaSpeR^{HSP83} digeridos, y en 20 µl para los vectores pCR2.1. La calidad del DNA digerido purificado se verificó en un minigel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

B2. Segunda digestión

El DNA digerido y purificado de los vectores de expresión pUAST y pCaSpeR^{HSP83}, así como el de los vectores pCR2.1 se sometió a una segunda digestión con endonucleasas, como se indica en la Tabla 1. Cabe mencionar que sólo aquellos vectores digeridos con la enzima *EcoR I* no fueron sometidos a esta segunda digestión, pues el inserto fue liberado en un solo paso de digestión debido a que en el vector pCR2.1 el producto de PCR insertado queda flanqueado por sitios de restricción *EcoR I*. Las reacciones de digestión de los vectores de expresión se realizaron en un volumen final de 100 µl y la mezcla de reacción contuvo 70 µl del DNA de la primera digestión, 10 µl de buffer 10X adecuado para cada enzima (*BamH I* o *Kpn I*) y 5 U de endonucleasa. Las reacciones de digestión de los vectores pCR2.1 se realizaron en un volumen final de 50 µl llevando todo el DNA recuperado de las primeras digestiones, 5 µl de buffer de digestión 10X adecuado y 4 U de enzima. Todas las reacciones de la segunda digestión se incubaron bajo la misma condición que las de la primera digestión. El resultado de esta digestión se corroboró separando 3 µl de reacción en un minigel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio.

Tabla 1. Dinámica de digestión para la subclonación de productos de PCR en vectores de expresión de mosca.

Vector	Primera Digestión	Segunda Digestión	Vector de expresión ‘destino’
pUAST	<i>Not I</i>	<i>Kpn I</i>	---
pCaSpeR ^{HSP83}	<i>EcoR I</i>	---	---
pCaSpeR ^{HSP83}	<i>BamH I</i>	<i>Xho I</i>	---
pCR2.1 con p8-6His	<i>Not I</i>	<i>Kpn I</i>	pUAST
pCR2.1 con p8-6His	<i>BamH I</i>	<i>Xho I</i>	pCaSpeR ^{HSP83}
pCR2.1 con 6His-p8	<i>Not I</i>	<i>Kpn I</i>	pUAST
pCR2.1 con 6His-p8	<i>BamH I</i>	<i>Xho I</i>	pCaSpeR ^{HSP83}
pCR2.1 con ORF-Myc	<i>Not I</i>	<i>Kpn I</i>	pUAST
pCR2.1 con ORF-Myc	<i>EcoR I</i>	---	pCaSpeR ^{HSP83}
pCR2.1 con Myc-ORF	<i>Not I</i>	<i>Kpn I</i>	pUAST
pCR2.1 con Myc-ORF	<i>EcoR I</i>	---	pCaSpeR ^{HSP83}

El DNA doblemente digerido de los vectores pUAST y pCaSpeR^{HSP83} se defosforiló empleando la fosfatasa alcalina de camarón (SAP, shrimp alkaline phosphatase; Roche), que cataliza la eliminación de los fosfatos 5' del DNA. En el mismo tubo donde se llevó a cabo la reacción de digestión se adicionaron 10 µl de buffer de defosforilación 10X y 10 µl de enzima SAP. La reacción se incubó 30 minutos a 37°C y después se llevó 20 minutos a 65°C con lo que se consigue la inactivación completa e irreversible de SAP. Posteriormente se recuperó el DNA digerido mediante una extracción FCI de la manera ya descrita.

Por su parte, el DNA del resto de reacciones de digestión de los vectores pCR2.1, incluyendo el de la digestión con *EcoR I* (de la primera y única digestión), se purificó siguiendo el protocolo de extracción en gel “Qiaex II” (Qiagen), detallado anteriormente. Este DNA corresponde a los fragmentos que incluyen las secuencias de las proteínas híbridas. Para la extracción del DNA, fue necesario que toda la reacción de digestión se cargara en un gel de agarosa al 1.5% y se aislaran las bandas correspondientes. Se utilizaron 25-30 µl de perlas y se realizaron dos eluciones de cada pastilla de perlas, la primera con 25-40 µl de agua bidestilada

estéril y la segunda con 13-20 µl según el caso. La cantidad del DNA digerido obtenido se verificó en un minigel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.

C. Reacción de ligación

Para las reacciones de ligación se consideró una relación final de 3 : 1 (inserto : vector). Cada reacción de ligación se realizó en un volumen final de 20 µl llevando 5U de la enzima T4 DNA ligasa (Invitrogen). Las reacciones se incubaron en un termociclador a una temperatura de 14°C durante toda la noche. Al día siguiente se eliminaron las sales de las reacciones de ligación de la manera ya descrita. La pastilla de DNA obtenida se resuspendió en 10 µl de agua bidestilada estéril.

D. Electroporación

Empleando la misma técnica detallada para la clonación en pCR2.1, se electroporaron alícuotas de 40 µl de células DH5α con 5 µl de ligación limpia. Como controles negativos se electroporaron 5 µl de reacciones de auto-ligación de los vectores defosforilados. Luego de la recuperación de las células electroporadas en medio SOC, se espatularon 100 y 150 µl de la mezcla de recuperación, así como 100 µl de una dilución 1:10 de dicha mezcla, en cajas de LB suplementadas con ampicilina (100 µg/ml). Se dejaron crecer las células toda la noche a 37°C.

E. Análisis de células transformantes

Se seleccionaron 20-25 colonias candidato para analizarse por la técnica de PCRs en colonia, ya descrita. El volumen de cada reacción de PCR fue de 10 µl. Para las clonas de pUAST se emplearon oligos específicos, complementarios a los extremos 5' y 3' de los insertos. Para aquellas clonas en pCaSpeR^{HSP83} se utilizó como oligo 5' el hsp83-5' que es complementario a una secuencia del vector que está río arriba el sitio de inserción, y como oligo 3', se empleó el específico según la secuencia del inserto presente.

~ La secuencia del Oligo hsp83-5' es: (5'-CGATACCGTCGACCTCGAG- 3')

Las condiciones de PCR utilizadas fueron las mismas para las PCR de colonia para el vector pCR2.1: un ciclo de 5 minutos a 94°C, 30 ciclos de: 45 segundos a 92°C, 45 segundos a 55°C y 45 segundos a 72°C; 7 minutos a 72°C y mantenimiento de la reacción a 4°C. Las reacciones de PCR se resolvieron en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio.

F. Purificación y verificación de plásmidos

Se prepararon cultivos bacterianos en 5ml de medio líquido LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml), 3 ml fueron utilizados para purificar el DNA plasmídico siguiendo el protocolo de “Qiagen Plasmid Mini kit” (Qiagen); se escogieron dos clonas distintas para cada construcción. Los restantes 2 fueron empleados para hacer concentrados de glicerol de cada clona bacteriana para su almacenamiento prolongado a -70°C.

La pastilla de DNA obtenida se resuspendió en 50 µl de agua bidestilada estéril. La calidad y cantidad de DNA plasmídico recuperado se observó mediante un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. También se hizo una cuantificación del DNA a través de la determinación de la A_{260} en un espectrofotómetro.

Para asegurarse que los plásmidos purificados fueran los correctos, se hizo un análisis de restricción mediante la digestión con la endonucleasa *EcoR I* (Roche) que ocasionara la liberación del inserto codificante para la proteína híbrida específica. Las reacciones de digestión se hicieron en un volumen final de 25 µl, con la composición descrita previamente para el caso de plásmidos pCR2.1, y se incubaron toda la noche a temperatura ambiente. Finalmente, cada reacción se resolvió en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.

Confirmada la presencia del inserto de interés en los plásmidos purificados se prepararon reacciones de secuenciación para cada uno. Se emplearon, según el caso específico del inserto presente, los oligos p8-5', p8-3', ORF-5' u ORF-3' para secuenciar los vectores pUAST; mientras que para la secuenciación de los vectores pCaSpeR^{HSP83} se empleó el oligo hsp83-5'. La secuenciación de las muestras se llevó a cabo en la Unidad de Secuencia del Instituto de Biotecnología, UNAM.

Una vez obtenida la secuencia de cada clona, se analizó detalladamente: (1) que no existiera mutación alguna en la secuencia de la proteína híbrida, (2) que estuvieran presentes los sitios de restricción del *poly-linker* del vector de expresión, y (3) que el codón de inicio de la secuencia de interés quedara en fase con el promotor del vector de expresión.

Obtención de las líneas de moscas transgénicas

Las moscas transgénicas utilizadas en este trabajo se produjeron a través de la compañía Genetic Services, Inc., siguiendo el protocolo estándar de microinyección (Spradling y Rubin, 1982). Para establecer las líneas independientes que expresaran las proteínas híbridas, una vez recibidos los embriones inyectados con el DNA plasmídico correspondiente, se siguió el esquema de cruzas de la Figura 7.4. Para determinar el sitio de inserción de cada transgen en los cromosomas de las moscas se siguió un esquema de cruzas alternativo, señalado en la Figura 7.5.

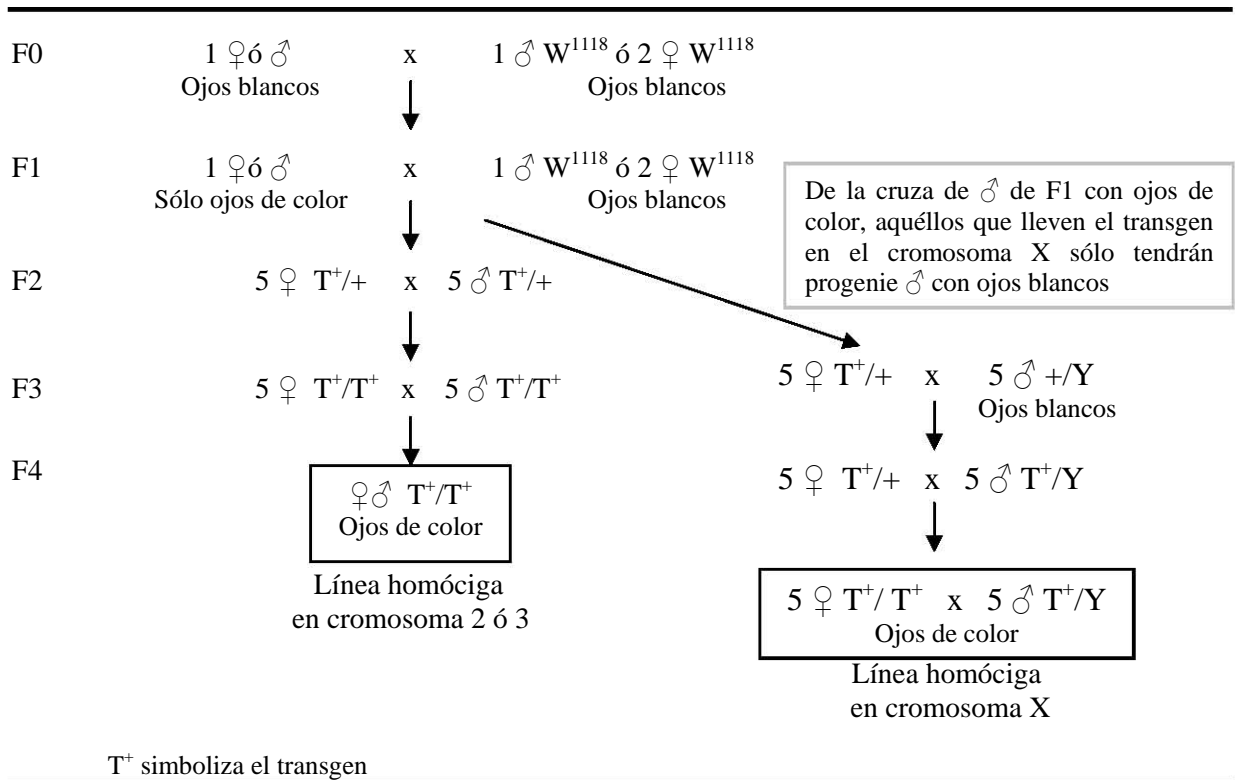


Figura 7.4. Esquema de cruzas para establecer las líneas transgénicas independientes que expresen las proteínas híbridas p8 y ORF2 fusionadas a una etiqueta de 6His y Myc, respectivamente.

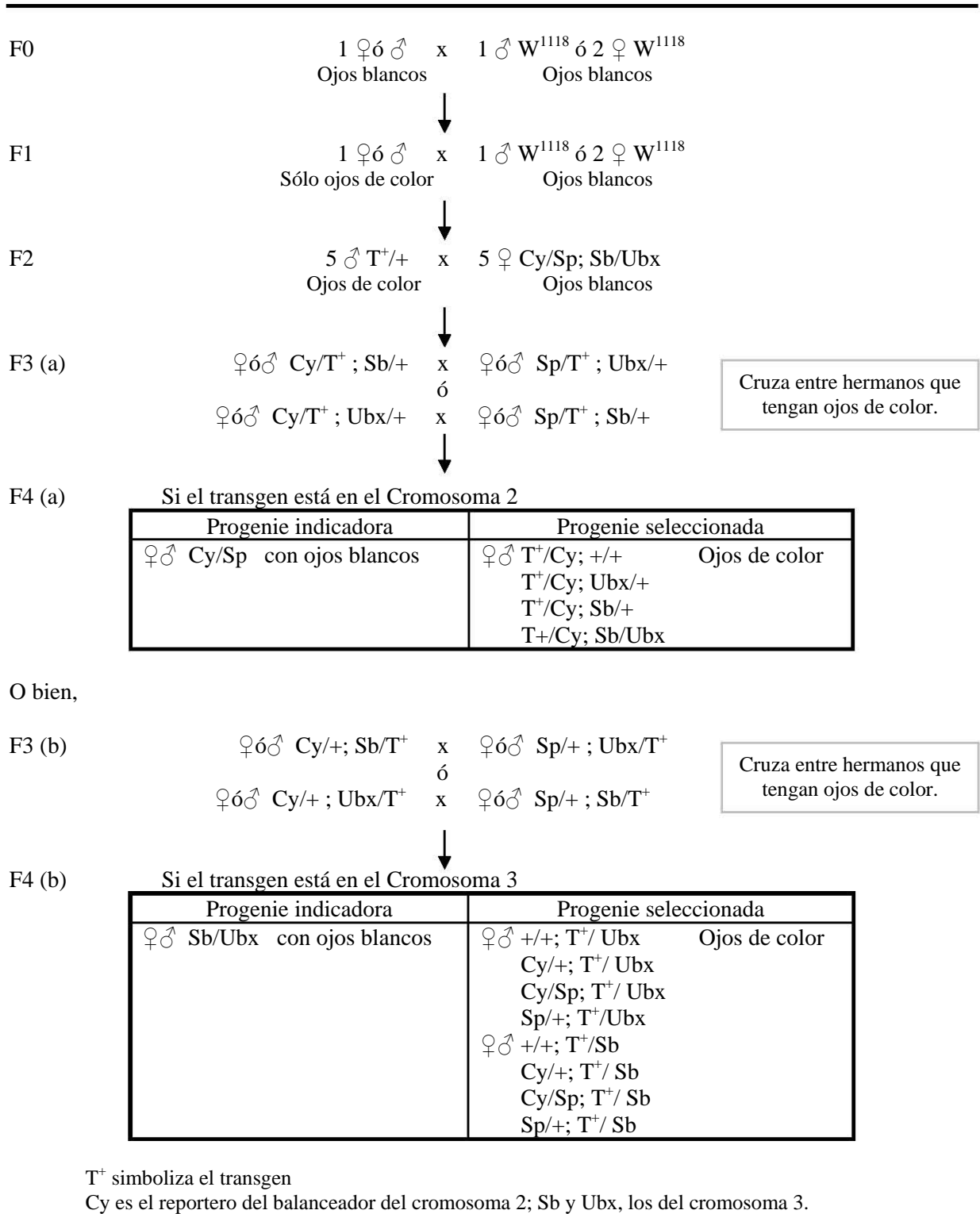


Figura 7.5. Esquema de cruzas para determinar el sitio de inserción del transgen que codifica para las proteínas híbridas p8 y ORF2, en las líneas transgénicas obtenidas.

Análisis de la expresión del transgen en líneas homocigas

El criterio de selección de las líneas de moscas a evaluar fue el color de ojos. Una intensa coloración roja en los ojos de las moscas sugiere que la zona de inserción del gen reportero *white* y, probablemente del transgen, pudiera favorecer una mejor expresión de ambos. Inicialmente, se escogieron líneas homocigas independientes de cada construcción hecha con el vector pCaSpeR^{HSP83} que cumplieran con este criterio. Luego, en estas líneas se analizó la presencia del RNA mensajero que codifica para cada proteína híbrida utilizando la técnica de transcripción reversa y PCR (RT-PCR) y se verificó la expresión de la proteína mediante ensayos de Western blot.

A. Análisis de la expresión del RNA mensajero correspondiente a las proteínas híbridas.

A1. Aislamiento del RNA total

Debido a que un factor crítico en el aislamiento de RNA es la inactivación de las ribonucleasas endógenas presentes en el tejido del que se obtiene dicho RNA, se utilizó TRIZOL (Invitrogen) para lisar las células del tejido de la mosca. Este reactivo, que es una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina, mantiene la integridad del RNA eliminando cualquier actividad residual de RNasa, mientras lisa las células y disuelve los demás componentes celulares (Chomczynski, 1987).

Se recolectaron 50 moscas adultas, se depositaron en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se adicionó 1 ml de TRIZOL, incubando durante 5 minutos a temperatura ambiente (T.A.). Después, se homogenizó la mezcla con ayuda de un teflón de vidrio (dounce) y el homogenado se centrifugó por 10 minutos a 12,000 x g a 4°C. El sobrenadante se pasó a un tubo nuevo y se adicionaron 0.2 ml de cloroformo; se agitó a mano vigorosamente por 15 segundos y se incubó 3 minutos a T.A. Luego, se centrifugó por 15 minutos a no más de 12,000 x g a 4°C. La fase acuosa superior se transfirió a un tubo nuevo y el RNA presente se precipitó adicionando 0.5 ml de alcohol isopropílico, incubando 10 minutos a T.A. y centrifugando por 10 minutos a 12,000 x g a 4°C. La pastilla de RNA obtenida se lavó con 1 ml de 75% etanol en agua DEPC (dietil pirocarbonato 0.1%), se mezcló por vórtex y se centrifugó 5 minutos a no más de 7,500 x g a 4°C. Finalmente, se dejó secar brevemente la pastilla y se disolvió incubándola 10 minutos a 55-60°C en 30-50 µl de agua DEPC.

Posteriormente, con la finalidad de analizar la calidad del RNA obtenido, se preparó un gel desnaturalizante para RNA. Brevemente, se disolvieron 0.4 g de agarosa en 42.5 ml de buffer MOPS 1X (20 mM MOPS, 5 mM Acetato de sodio, 1 mM EDTA, pH 7.0). Una vez fundida la agarosa, se añadieron 2.5 ml de 37% formaldehído. Las muestras de RNA se prepararon de la siguiente manera antes de cargarlas en el gel: a cada una se añadieron 2 µl de buffer de carga (750 µl formamida, 150 µl MOPS 10X, 240 µl formaldehído, 100 µl agua DEPC, 100 µl glicerol, 80 µl 10% azul de bromofenol), se calentaron durante 10 minutos a 65°C y por último, se adicionó 1 µl de 0.1M de Bromuro de etidio.

A2. Retrotranscripción

Además de que el RNA utilizado para generar cDNA no debe estar degradado, es importante que esté libre de DNA. Para asegurar esto último, cada muestra de RNA obtenida pasó por un tratamiento con DNasa, indicado a continuación. A 5-10 µg del RNA total se adicionaron 5 µl de buffer para DNasa 10X (400 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM MgSO₄, 10 mM CaCl₂), 1 µl DNasa libre de RNasa (Roche), 0.2 µl DTT 0.1 M y 1 µl de Inhibidor de RNasa (Invitrogen). La mezcla se incubó por 30 minutos a 37°C. Luego, se añadió 1 µl de EGTA 20 mM pH 8.0 y se incubó por 10 minutos a 65°C.

Posteriormente, para llevar a cabo la síntesis del cDNA se tomaron 10 µl del RNA total libre de DNA, se agregó 1 µl de oligo-dT (Invitrogen) y 1 µl de la mezcla de los 4 desoxinucleótidos (10 mM de cada uno) y, se incubó por 5 minutos a 65°C en un termociclador. Inmediatamente se pasó a hielo y se añadieron: 4 µl de buffer de incubación de la enzima (First strand buffer, Invitrogen), 2 µl DTT 0.1 M y 1 µl de Inhibidor de RNasa. Esta nueva mezcla se incubó por 2 minutos a 37°C. Finalmente se añadió 1 µl de la enzima transcriptasa reversa (M-MLV, Invitrogen) y se incubó 1 hora a 37°C. Para detener la reacción se incubó por 15 minutos a 65°C.

A3. PCR a partir del cDNA

La finalidad de haber aislado el RNA total de las moscas transgénicas es verificar la expresión de los genes que codifican las proteínas híbridas de interés. Haciendo uso de la técnica de PCR, se analizó cualitativamente la presencia de los transcritos de dichos genes.

Para corroborar que en la preparación del RNA (y por lo tanto del cDNA) no existiera contaminación alguna con DNA, se realizaron reacciones de PCR utilizando un par de

oligonucleótidos (diseñados por la Dra. Viviana Valadez Graham) complementarios a secuencias de dos exones que flanquean un intrón del gen Rp49. Esto permite detectar, según el tamaño de la secuencia amplificada, si existe contaminación con DNA. Cada una de estas reacciones de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl, utilizando 2 µl del cDNA obtenido como DNA molde. Las condiciones de PCR fueron: un ciclo de 5 minutos a 94°C, 27 ciclos de: 50 segundos a 92°C, 45 segundos a 55°C y 50 segundos a 72°C y, por último, 7 minutos a 72°C y mantenimiento de la reacción a 4°C. Cada producto de PCR fue separado en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.

Una vez garantizada la ausencia de DNA, se llevaron a cabo las reacciones de PCR con el par de oligonucleótidos que permitiera la amplificación específica del cDNA de interés. De este modo se empleó el oligo hsp83-5' (complementario a una secuencia del vector que está río arriba del sitio de inserción del transgen) y como oligo 3' el complementario a la secuencia del gen de cada proteína híbrida. El volumen final de las reacciones de PCR fue de 50 µl, usando 2 µl de cDNA. Las condiciones de PCR fueron: un ciclo de 5 minutos a 94°C, 30 ciclos de: 45 segundos a 92°C, 45 segundos a 55°C y 45 segundos a 72°C y, por último, 7 minutos a 72°C y mantenimiento de la reacción a 4°C. Cada producto de PCR fue separado en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. La ausencia o presencia del fragmento esperado indicó la presencia o ausencia de expresión del transcrito de interés.

B. Análisis de la expresión de las proteínas híbridas

B1. Preparación de extractos proteicos de mosca.

Para analizar si las proteínas híbridas diseñadas se expresaban suficientemente en las moscas transgénicas construidas con el vector de expresión pCaSpeR^{HSP83}, se obtuvieron extractos de proteína de organismos adultos de varias líneas homocigas como se describe a continuación. Se seleccionaron 50 individuos adultos (25 hembras y 25 machos) de distintas líneas transgénicas independientes, correspondientes a cada una de las cuatro construcciones hechas en dicho vector de expresión (6His-p8, p8-6His, Myc-ORF y ORF-Myc). Estas moscas se introdujeron en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se lavaron con agua estéril; luego, el tubo con las moscas se depositó en nitrógeno líquido. Posteriormente, las moscas se homogenizaron con ayuda de un teflón de vidrio (dounce) en buffer de homogenado (250 mM Sacarosa, 50 mM Tris pH 7.5, 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 25 mM EDTA) por un minuto aproximadamente.

Para eliminar los restos de cutícula, el homogenado se pasó por fibra de nylon previamente esterilizada y al filtrado se adicionó SDS para obtener una concentración final aproximada de 1%. Después, la mezcla se centrifugó por 10 minutos a 10,000 x g a 4°C, eliminando los detritos aún presentes. Con ayuda de una pipeta se eliminó el sobrenadante, el cual se guardó en un tubo Eppendorf limpio a -20°C; una pequeña alícuota se separó para la cuantificación de las proteínas contenidas en el extracto.

B2. Cuantificación de proteína.

Para determinar la cantidad de proteínas solubles contenidas en cada extracto obtenido de las moscas transgénicas se empleó el kit “Protein Assay” (Bio-Rad), el cual, se basa en el método Bradford. Para esta cuantificación se preparan cuatro diluciones de una proteína estándar (Albúmina de suero bovino, BSA) y dos diluciones de cada extracto de mosca. Luego, a 800 µl de cada dilución se adicionan 200 µl del reactivo, se mezclan vigorosamente y se incuban a temperatura ambiente por 5 minutos. Finalmente, se mide la absorbancia a 595 nm con ayuda de un espectrofotómetro. Finalmente, con los valores de absorbancia obtenidos se realiza una curva estándar de concentración, graficando la D.O.₅₉₅ contra la concentración conocida de BSA (µg/ml); luego se obtiene la regresión lineal de la curva. Para calcular la cantidad de proteína de las muestras, se sustituyen, en la ecuación de la recta, los valores de absorbancia obtenidos.

B3. Experimentos tipo Western

Los experimentos tipo Western incluyen la solubilización y la separación electroforética de proteínas, así como la transferencia cuantitativa y la unión irreversible de éstas a una membrana. Esta técnica permite identificar la presencia de proteínas blanco utilizando anticuerpos específicos que reconocen antígenos en ellas.

Cabe mencionar que antes de realizar estos ensayos con los extractos proteicos de las moscas, se verificó que los anticuerpos primarios detectaran adecuadamente las etiquetas de 6His y Myc presentes en las proteínas de interés. Para ello se utilizó una muestra de una proteína de fusión que posee ambas etiquetas (proteína H-NS/Myc/6His donada por Miguel Ángel de la Cruz Villegas, Laboratorio del Dr. Calva, IBT), y cuya detección había sido probada previamente con otros anticuerpos. El protocolo utilizado fue el mismo que se empleó con los extractos proteicos de las moscas transgénicas.

B3.1 Separación electroforética de proteínas por SDS-PAGE.

Para separar electroforéticamente las proteínas presentes en cada extracto de moscas se utilizó un protocolo modificado basado en el método de Laemmli (Current Protocols in Molecular Biology, 1999, 10.2A). Se realizó la electroforesis en una dimensión bajo condiciones desnaturizantes (en presencia de 1% de SDS) para separar las proteínas según su tamaño. Se empleó una solución de acrilamida/ bisacrilamida al 15% para preparar los geles en que se separaron las muestras de cada extracto proteico. Se utilizó una cámara de electroforesis de Bio-Rad diseñada para geles verticales de 0.75 mm de grosor y como solución amortiguadora se empleó buffer de Tris-glicina con SDS al 10%. 25-100 µg de proteína correspondiente a cada muestra de extracto se mezcló con buffer de Laemmli 2X ó 4X y se calentaron a ebullición por 5 minutos. Por su parte, en algunos ensayos se utilizó la pastilla obtenida durante la preparación de los extractos proteicos, la cual se mezcló con 50 µl del buffer de Laemmli 2X y se calentó a ebullición por 5 minutos. Una vez calentadas las muestras se mantuvieron en hielo mientras se iban colocando en el gel. Las condiciones de electroforesis fueron 80 V por aproximadamente dos horas hasta que el colorante azul de bromofenol alcanzara el borde inferior del gel separador. Como marcador preteñido de peso molecular se utilizó el Broad Range (Bio-Rad).

B3.2 Electrotransferencia

Una vez completada la electroforesis, se desensambló el gel y se eliminó el gel concentrador, mientras que el gel separador se equilibró en buffer de transferencia (25 mM Tris-HCl, 192 mM glicina, 20% metanol, pH 8.3) por 30 minutos. Se utilizó una membrana de nitrocelulosa con poro de 1 µm de diámetro, la cual debe sumergirse en agua destilada antes de equilibrarse en el buffer de transferencia por 10-15 minutos. Después de equilibrar el gel y la membrana, se preparó el sandwich de transferencia en un recipiente lleno con el mismo buffer de transferencia siguiendo el orden indicado a continuación, de acuerdo a la dirección que tiene la transferencia de proteínas cargadas negativamente (de cátodo a ánodo): esponja, dos hojas de papel filtro, gel, membrana, dos hojas de papel filtro y esponja. Debe evitarse la formación de burbujas entre el papel filtro, el gel y la membrana. Las condiciones de la transferencia electroforética de las proteínas, que se lleva a cabo desde el gel hasta la membrana, fueron 80 mA durante toda la noche a 4°C y dos horas adicionales a 120-160 mA.

Después de concluir con la transferencia se desensambló el sándwich en un recipiente lleno con agua destilada y, para verificar la eficiencia del proceso, el gel se tiñó con azul de Coomassie. Por otro lado, para determinar la transferencia de la muestra hacia la membrana, una vez seca esta última se realizó una tinción reversible con solución de Ponceau S por 2-5 minutos. Luego se lavó la membrana con buffer PBS 1X.

B3.3 Inmunodetección

Para identificar las proteínas inmovilizadas en la membrana de nitrocelulosa se siguió un protocolo de inmunodetección que permitiera la visualización por quimioluminiscencia de las proteínas de interés. Primero, la membrana se bloqueó por una hora con una solución de 10% de leche en polvo (Svelty acti-fibras 0% grasa) disuelta en buffer TBS con 0.1% Tween-20 (TBST 0.1%). Posteriormente, se realizaron 5-6 lavados con TBST 0.1% a intervalos de 5 minutos. Luego, se incubó la membrana con el anticuerpo primario en buffer de bloqueo (5% leche en polvo en TBST 0.1%) por una hora. Se realizaron 5-6 lavados con TBST 0.1 % a intervalos de 5 minutos y se incubó la membrana con el anticuerpo secundario en buffer de bloqueo por una hora; dicho anticuerpo está acoplado a la peroxidasa de rábano (HRP, horse radish peroxidase). Finalmente se realizaron 5-6 lavados con TBST 0.1 % a intervalos de 5 minutos.

La concentración empleada para los anticuerpos primarios fue la sugerida por los fabricantes: 0.5 µg/ml para anti-His₆ (Roche, anticuerpo monoclonal de ratón) y 1 µg/ml para anti-c-myc (Roche 9E10, anticuerpo monoclonal de ratón). La concentración del anticuerpo secundario HRP-antiIgG (Zymed, HRP Goat anti Mouse IgG+A+M) fue 0.05 µg/ml.

Para la detección quimioluminiscente de los antígenos específicos inmovilizados, que fueron capaces de conjugarse a la HRP del anticuerpo secundario, se utilizó el reactivo ECL Plus (Amersham Biosciences) siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. Una vez que se equilibraron a temperatura ambiente los reactivos de detección, se preparó una mezcla de las soluciones A y B en una proporción 40:1. Esta mezcla se vertió sobre la membrana y se deja incubando por 5 minutos a temperatura ambiente, protegiéndose de la luz. Luego, se eliminó el exceso de reactivo de la membrana y se envolvió con plástico adherente (*kleen-pack*) dejando la cara que lleva las proteínas hacia arriba, evitando la formación de burbujas. La membrana envuelta se colocó sobre una placa de revelado dejando la cara que lleva las proteínas hacia arriba. Antes de cerrar la placa y, en ausencia de luz (puede utilizarse luz roja),

se colocó una hoja de película autorradiográfica sobre la membrana. Para cada membrana se realizaron 2-3 autorradiografías con tiempos de exposición desde 2.5 hasta 15 minutos. Después de transcurrido el tiempo de exposición, se quitó la película y se reveló sumergiéndola 1-3 minutos en solución fijadora (Sigma-Aldrich), lavando en el chorro de agua unos segundos y finalmente dejándola dentro de la solución reveladora (Sigma-Aldrich) hasta que la película quedara transparente.

RESULTADOS

Clonación de productos de PCR en el vector pCR2.1

Con la finalidad de generar las proteínas híbridas de TTDA (p8) con etiqueta de 6-Histidinas (6His) y de ORF2 con etiqueta del epítotope de c-myc (Myc), se diseñaron dos clases de oligonucleótidos que permitieron amplificar (mediante PCR) las secuencias silvestres de las proteínas de la mosca y añadirles la etiqueta correspondiente en un de sus extremos. Para obtener la secuencia de las proteínas p8 y ORF2 silvestres se utilizaron plásmidos previamente construídos en el laboratorio; se empleó pGEX-4T-3/p8 como fuente de la secuencia silvestre de p8 y pBluescript-SK/ORF2 para amplificar la secuencia de ORF2. Por otro lado, en cada reacción de PCR se utilizó un oligo correspondiente a un extremo de la secuencia de la proteína silvestre y, un segundo oligo complementario al otro extremo que además incluía la secuencia de la etiqueta escogida. De esta manera se generaron dos secuencias para las proteínas híbridas de p8, una con la etiqueta de 6His en el extremo amino y la otra con la misma etiqueta en el extremo carboxilo. De la misma forma se obtuvieron dos secuencias para la proteína ORF2 pero llevando la etiqueta de Myc.

Debido al elevado tamaño de los oligos que incluían la secuencia de las etiquetas, fue necesaria su purificación mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida. La cantidad de DNA obtenida de la purificación de estos oligos (Hisp8-5', p8His-3', MycORF-5' y ORFMyc-3') fue de $\leq 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, según el cálculo realizado a partir de la medición de su absorción 260 nm en el espectrofotómetro de UV.

Como resultado de las reacciones de PCR se obtuvieron fragmentos de DNA de alrededor de 240 pares de base para p8 con etiqueta 6His y de 490 pb para ORF2 con etiqueta de Myc. A pesar de no haberse generado bandas inespecíficas en ninguna reacción de PCR, se decidió purificar la banda particular de cada producto de PCR a partir de un gel de agarosa al 1.5% para evitar contaminaciones al clonar los productos de PCR en el vector pCR2.1 (Invitrogen). Este vector linearizado se escogió porque ofrece la ventaja de poder clonar directamente un producto de PCR generado con la enzima *Taq* polimerasa. Una vez purificada del gel de agarosa la banda correspondiente al producto de PCR y habiéndose calculado una concentración aproximada de 15-20 ng/ μl para este DNA, las reacciones de ligación se

prepararon considerando una relación 3:1 (inserto:vector) para aumentar la eficiencia de ligación.

Una vez que se eliminaron las sales presentes en las reacciones de ligación, se transfirió la mitad de cada reacción a las células electrocompetentes de *E. coli* DH5 α preparadas en el laboratorio y cuya eficiencia de transformación fue óptima (3.6×10^{10} cfu/ μ g). La finalidad de esto fue que la clonación generara los sitios de restricción necesarios para la subclonación de los productos de PCR en los vectores de expresión específicos de mosca.

La selección de colonias resultantes de la electroporación fue directa, debido a que sólo las colonias blancas contenían el inserto. Esto se debe a que el plásmido pCR2.1 lleva el fragmento *lacZ* α que codifica para los primeros 146 aminoácidos de la enzima β -galactosidasa y, cuando se da una complementación en *trans* con el fragmento *lacZ* Ω presente en el genoma de la bacteria se origina una β -galactosidasa activa que degrada al X-Gal presente en el medio. Esto permite examinar minuciosamente y contar las colonias blancas (positivas) y las azules (negativas) generadas. Aproximadamente 50% de las colonias presentes fueron blancas.

Luego de haber seleccionado las colonias blancas que presumiblemente llevaban el inserto de interés, éstas se analizaron mediante la técnica de PCR de colonia en la que se utilizaron los oligos M13-Reverse y M13-Forward; cuyas secuencias están presentes en el vector pCR2.1. De las reacciones de PCR realizadas a las colonias que contenían el plásmido con el inserto de interés, se obtuvieron fragmentos de aproximadamente 465 pb para p8 con etiqueta 6His y 710 pb para ORF2 con etiqueta Myc, debido a la suma de los sitios de clonación.

Se escogieron dos de las colonias que hubieran amplificado el fragmento de longitud adecuada para obtener los plásmidos empleados para un análisis de restricción y para la reacción de secuenciación. El análisis de restricción se realizó con la enzima *EcoR* I cuyas secuencias de corte flanquean el sitio de clonación del vector pCR2.1; la longitud de los fragmentos liberados fue casi la misma que la de la secuencia correspondiente a las proteínas híbridas: 260 pb para p8 con etiqueta 6His y 500 pb para ORF2 con etiqueta Myc.

Estos mismos plásmidos se emplearon para la reacción de secuenciación, donde se utilizó el oligo M13-Reverse. Se obtuvo una lectura completa y sin mutaciones para todas las construcciones. La dirección de todos los insertos quedó invertida respecto a la secuencia del promotor de *lacZ* (Figura 8.1).

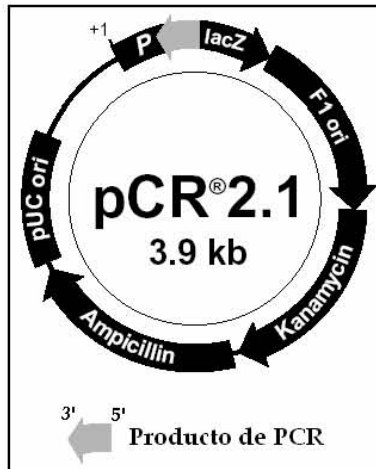


Figura 8.1. Orientación de los cuatro diferentes productos de PCR clonados en el vector pCR2.1 (Invitrogen)

Subclonación de productos de PCR en vectores de expresión para generar moscas transgénicas

Una vez amplificadas por PCR y clonadas en el vector pCR2.1, las secuencias de las proteínas híbridas (6His-p8, p8-6His, Myc-ORF2 y ORF2-Myc) se subclonaron en dos vectores de expresión específicos de *Drosophila*: pUAST y pCaSpeR^{HSP83}. La finalidad de obtener estas construcciones fue generar moscas transgénicas que expresaran las proteínas híbridas en tejidos específicos en un momento determinado y moscas transgénicas que las expresaran de forma continua en todos los tejidos. El vector pUAST posee el promotor HSP70 y cinco copias de la secuencia activadora UAS; este vector permite dirigir la expresión del gen insertado delante del promotor sólo cuando se encuentra presente la proteína GAL4, que funciona como activador transcripcional al unirse a las secuencias UAS (Johnston, 2002). El vector pCaSpeR^{HSP83} lleva la secuencia del promotor HSP83 que funciona como promotor constitutivo, y permite la expresión basal continua del gen insertado delante de él (Fregoso, 2007).

Debido a la orientación invertida de todos los productos de PCR en el vector pCR2.1 (Figura 8.1) y, con la intención de subclonar de manera dirigida estos fragmentos en los dos distintos vectores de expresión de mosca, la estrategia de subclonación utilizada involucró el uso de una combinación de dos enzimas de restricción distintas. Éstas, además de tener sitios

únicos de corte tanto el vector pCR2.1 como en el vector de expresión (destino), debían tener sitios de corte en dirección 5'→3' delante del promotor del vector de clonación, misma dirección en la que debía quedar el inserto de PCR (Figura 8.2).

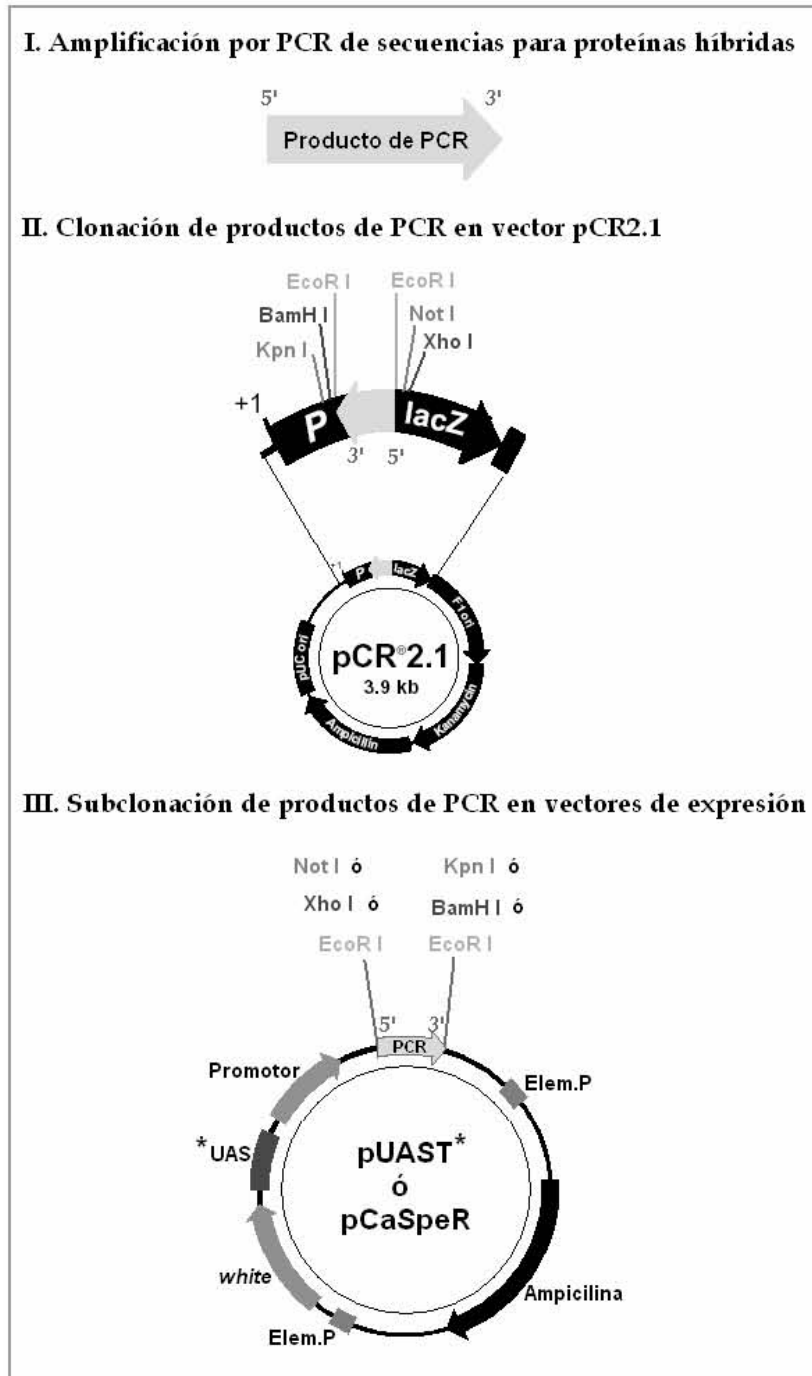


Figura 8.2. Estrategia empleada para la clonación y subclonación de los productos de PCR que amplificaron las secuencias que codificaron para las proteínas híbridas TTDA y ORF2 con sus respectivas etiquetas de 6His y Myc.

Siguiendo la estrategia planteada, para el vector pUAST se escogió la combinación de enzimas *Not I* – *Kpn I*, mientras que para pCaSpeR^{HSP83} la combinación fue *Xho I* – *BamH I*. Sin embargo, la subclonación dirigida para generar las construcciones pCaSpeR^{HSP83}/ORF2 no pudo realizarse utilizando la combinación *Xho I* – *BamH I* debido a que existe un sitio de corte para la enzima *Xho I* dentro de la secuencia de ORF2. Por tal razón, la subclonación de las construcciones Myc-ORF y ORF-Myc en el vector pCaSpeR^{HSP83} no fue dirigida y se llevó a cabo en el sitio *EcoR I* de dicho vector. La dinámica de digestión de las subclonaciones se resume en la Tabla 1 de la sección Material y Métodos.

Antes de iniciar con las digestiones de los vectores pCR2.1/inserto y de los vectores de expresión, se verificó que en estos últimos los sitios de restricción para las cinco enzimas escogidas fueran sitios únicos de corte. Se realizaron las reacciones de digestión adecuadas y se corroboró que todas las enzimas utilizadas presentan sitios únicos de corte en ambos vectores de expresión.

Con la certeza de que los vectores de expresión pUAST y pCaSpeR^{HSP83} poseen sitios únicos de corte para las endonucleasas de restricción seleccionadas se prosiguió con la primera digestión de éstos y de los vectores pCR2.1/inserto. Como producto de esta primera digestión se obtuvieron las bandas correspondientes a los vectores linearizados. Debe recordarse que debido a que en el vector pCR2.1 los sitios de corte para *EcoR I* flanquean el sitio de inserción del producto de PCR, el producto de su digestión con esta enzima produjo dos fragmentos, uno cuya longitud correspondió a la del producto de PCR y el otro correspondiente al tamaño del vector pCR2.1 original.

Una vez verificada la linearización de los vectores como resultado de la primera digestión y luego de haber purificado este DNA digerido mediante una extracción FCI, se llevó a cabo la segunda digestión sobre los plásmidos linearizados (excepto con los vectores pCR2.1 digeridos con *EcoR I*) con la finalidad de producir los sitios de clonación compatibles entre los vectores pUAST o pCaSpeR^{HSP83} y los insertos proteína/etiqueta que permitieran su futura ligación. En general, aquellos plásmidos digeridos inicialmente con *Not I* fueron después digeridos con *Kpn I*, y los plásmidos previamente digeridos con *BamH I* se digirieron luego con *Xho I*. Como producto de esta segunda reacción de digestión se obtuvieron los dos distintos vectores de expresión linearizados pero ya con los deseados sitios de clonación

específicos en cada extremo, mientras que de los vectores pCR2.1/inserto linearizados se liberó un fragmento correspondiente a la secuencia de las cuatro proteínas híbridas diseñadas.

Luego de obtenerse los fragmentos de longitud esperada, sólo aquéllos correspondientes al DNA de los vectores pUAST y pCaSpeR^{HSP83} doblemente digeridos fueron tratados con fosfatasa alcalina para que sus extremos 5' libres fueran defosforilados con el fin de evitar su auto-ligación en las futuros ensayos y, este DNA se purificó por medio de una extracción FCI. Por otro lado, el DNA de los productos de PCR liberados del vector pCR2.1 no se sometió a la defosforilación 5' y fue purificado mediante una extracción del gel de agarosa.

Una vez que contábamos con estos DNAs puros, se calculó la concentración aproximada de cada uno de ellos a través de un gel de agarosa de tal forma que las reacciones de ligación subsecuentes se hicieran guardando la proporción 3:1 (inserto: vector). Como resultado de estas reacciones de ligación se obtuvieron ocho construcciones distintas enlistadas a continuación, que luego se utilizaron para transformar células electrocompetentes *E. coli* DH5 α . Las ocho construcciones obtenidas hasta este momento fueron:

1. pUAST / 6His-p8
2. pUAST / p8-6His
3. pUAST / Myc-ORF
4. pUAST / ORF-Myc
5. pCaSpeR^{HSP83} / 6His-p8
6. pCaSpeR^{HSP83} / p8-6His
7. pCaSpeR^{HSP83} / Myc-ORF
8. pCaSpeR^{HSP83} / ORF-Myc

Debe recordarse que la inserción de los productos de PCR en cada uno de los dos vectores de expresión de mosca se realizó de manera dirigida (río abajo del promotor y en dirección 5'→3') para las primeras seis construcciones enlistadas anteriormente, mientras que las dos últimas de la lista no pudieron clonarse de manera dirigida. Un esquema que ilustra este hecho se muestra en la Figura 8.3.

Como ya se mencionó, el producto de las reacciones de ligación se utilizó para transformar a células competentes *E. coli* DH5 α mediante la técnica de electroporación. Como resultado de esta reacción se obtuvieron colonias que crecieron en cajas de LB-ampicilina

(100 µg/ml). De las colonias obtenidas, 20-25 fueron seleccionadas para el análisis de PCR de colonia. En estas reacciones de PCR se emplearon oligos complementarios a los extremos 5' y 3' de la secuencia de la proteína híbrida clonada en pUAST, mientras que para los insertos clonados en pCaSpeR^{HSP83} se utilizaron el oligo hsp83-5' y el oligo complementario al extremo 3' de la secuencia del inserto.

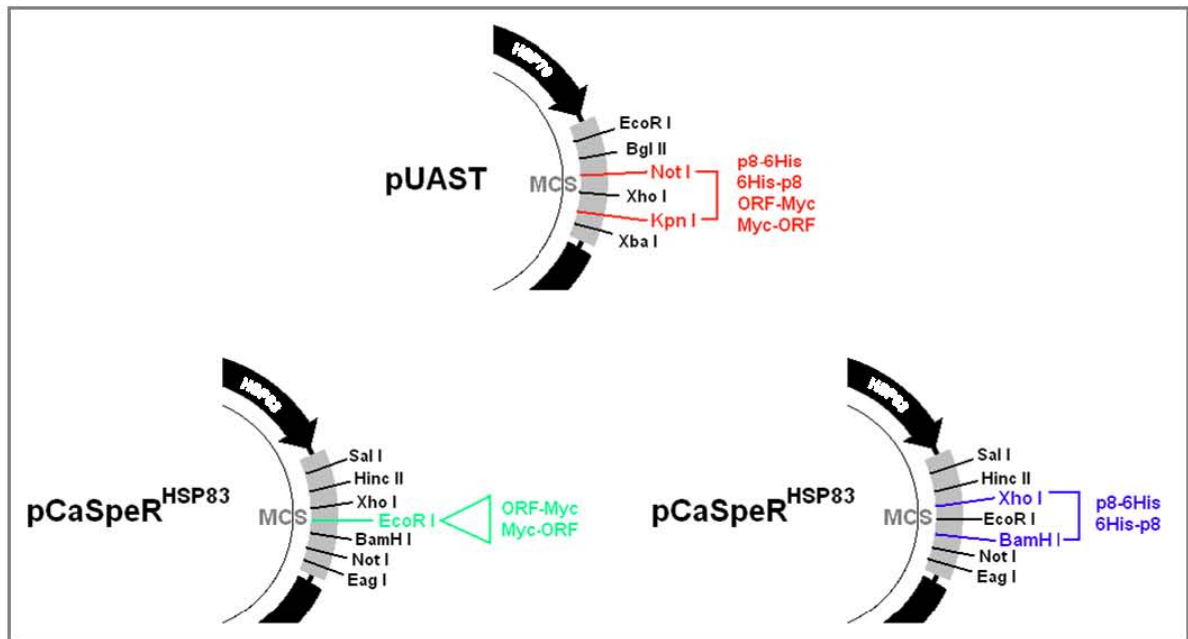


Figura 8.3. Esquema representativo que ilustra los sitios de clonación empleados para generar los vectores de expresión de mosca (pUAST y pCaSpeR^{HSP83}) que llevan individualmente la secuencia que codifica para las proteínas híbridas TTDA (p8) y ORF2 fusionadas a su etiqueta de 6His y Myc correspondientes.

De las 20-25 colonias seleccionadas para realizar el análisis por PCR de colonia, se escogieron dos de aquellas que habían amplificado correctamente la secuencia del inserto y, a partir de ellas se purificaron los plásmidos. Con éstos se corroboró la presencia del inserto mediante un análisis de restricción con la enzima *EcoR I*. Recuérdese que los sitios de corte de esta enzima flanquean al inserto. Todos los plásmidos liberaron el fragmento de longitud esperada.

Finalmente, para cada construcción se escogió uno de los dos plásmidos purificados para su secuenciación. Las secuencias de los ocho plásmidos distintos mostraron que el fragmento que codificaba para las proteínas híbridas no había sufrido cambios y, se corroboró que los insertos estaban río abajo del promotor en la orientación adecuada, manteniendo el

marco de lectura abierto. Cabe mencionar que en los vectores pUAST, debido a la estrategia de clonación empleada, se originó un codón de inicio río arriba al que marca el comienzo del marco de lectura de las proteínas híbridas, que queda en fase con este último. Debido a ello, es posible que pudieran producirse proteínas híbridas con 8 a 10 aminoácidos adicionales en su extremo amino. Sin embargo, en las moscas transgénicas con el vector pCaSpeR^{HSP83} la expresión de las proteínas fue suficiente para cumplir con los objetivos de este trabajo y no se hará el análisis de las líneas transgénicas pUAST.

Obtención de las líneas de moscas transgénicas

La herramienta principal para el estudio de p8 y ORF2 en *Drosophila* que se obtuvo durante este trabajo fue la generación de moscas transgénicas que expresan independientemente las proteínas p8 y ORF2 fusionadas a una etiqueta de 6His y Myc, respectivamente. Estas moscas podrán utilizarse para determinar si existe una interacción física entre la proteína ORF2 y TTDA (p8) u otro componente del complejo TFIIH, así como para estudios más detallados sobre la función de estas dos proteínas.

Una vez construidos los vectores que permitieran la expresión de las proteínas híbridas de p8 y ORF2 en la mosca y, luego de su introducción en embriones tempranos de mosca, se calculó la eficiencia de transgénesis obtenida. Esta eficiencia se refiere al porcentaje de progenie transformante producida por las moscas fértiles inyectadas. Estos organismos transgénicos pueden detectarse a partir de la generación F1 por la presencia de un marcador visible; en este caso, se identificaron por tener ojos de color (desde amarillo claro hasta rojo intenso) debido a la presencia del gen reportero *white* en los dos vectores de expresión utilizados. Aunque se ha reportado que generalmente se espera entre un 10 y un 20 % de eficiencia (Ashburner 2004), se observó amplia variación de la misma en las ocho distintas construcciones: desde un 8.3% para las moscas pUAST/6His-p8, hasta un 37.5% para las moscas pUAST/p8-6His.

Por otra parte, después de llevar a cabo el primer esquema de cruza planteado en la sección de Material y Métodos (Figura 7.4), se obtuvieron más de diez líneas homocigas independientes para cada una de las ocho proteínas híbridas, donde se consideró la presencia de inserciones únicas del transgen en alguno de los cromosomas X, II o III de las moscas. La

inserción de transgenes en el cromosoma IV es muy rara, ya que este cromosoma es muy pequeño y esencialmente heterocromático (Ashburner, 2004).

Además, se lograron mantener algunas de esas líneas independientes con un cromosoma balanceador (cromosoma incapaz de llevar a cabo apareamiento o recombinación durante la profase meiótica). La importancia de estas líneas balanceadas de moscas es que el cromosoma homólogo al que contiene el transgen sea un cromosoma balanceador para evitar la pérdida del transgen por recombinación homóloga. En el Anexo 1 se señalan todas las líneas de moscas transgénicas independientes obtenidas, tanto las homocigas como las balanceadas.

Análisis de la expresión del transgen en líneas homocigas

A. Análisis de la expresión del RNA mensajero correspondiente a las proteínas híbridas

Como ya se mencionó, después de la transformación estable de la línea germinal de *Drosophila*, los transposones pueden rearrreglarse, con lo que su expresión puede verse modificada o eliminada. Por otro lado, aunque no hay evidencia de una preferencia por un sitio de inserción, son pocas las inserciones en heterocromatina centromérica o en el cromosoma Y. Sin embargo, existe abundante evidencia de que la expresión del DNA integrado depende de su posición cromosomal. Por ejemplo, se ha mostrado que algunos genes integrados adyacentemente a heterocromatina centromérica o telomérica se ven sujetos a inactivación por efecto de posición (Ashburner, 2004).

Por ello, el segundo criterio para seleccionar las líneas de moscas transgénicas que expresan las proteínas híbridas de p8 y ORF2, las cuales se utilizarán en el análisis de la posible interacción física entre ORF2 y otro componente de TFIIH, fue que estas moscas transcribieran adecuadamente el transgen específico que codifica cada una de estas proteínas híbridas. Cabe recordar que el primer criterio de selección fue la coloración intensa de los ojos de las moscas homocigas, el cual da un primer indicio de que el transgen pudiera estar transcribiendo ya que la actividad del gen reportero que lo acompaña se puede detectar en los ojos de las moscas.

Para el análisis de expresión del transgen a nivel de RNA mensajero (Figura 8.4), se escogieron 4-5 líneas de moscas homocigas que expresaran cada una de las cuatro distintas proteínas híbridas (6His-p8, p8-6His, Myc-ORF y ORF-Myc). Es importante recalcar que sólo se analizaron líneas de moscas transgénicas construídas con el vector pCaSpeR^{HSP83}, ya que la

expresión de las proteínas en estas líneas no necesita ser inducida como en el caso de aquéllas que llevan el vector pUAST. Además, se sabe que la expresión de los genes que llevan como promotor a HSP83 es constitutiva, por lo que se esperaba una expresión moderada del transgen pero en todos los tipos celulares a lo largo de todo el desarrollo de la mosca.

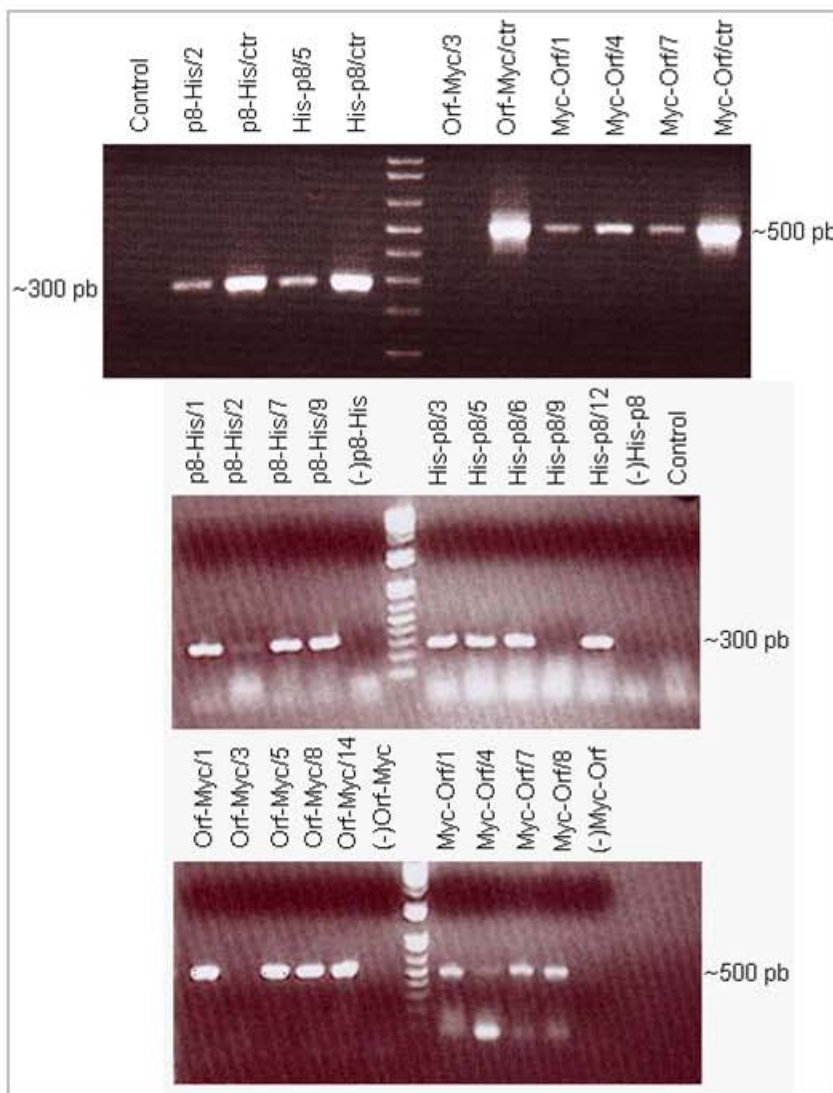


Figura 8.4. Análisis de expresión del transgen en las líneas de moscas seleccionadas. Fotografías de los geles de agarosa en los que se separaron los productos de PCR donde se amplificó la secuencia específica del cDNA transgénico; cada gel representa un experimento independiente. Las líneas analizadas se indican con el nombre de la proteína híbrida (p8-His, His-p8, Orf-Myc y Myc-Orf) y el número asignado a la línea independiente. Control: Línea de mosca sin transgen; (-): control de PCR sin DNA; ctr: DNA plasmídico que incluye la secuencia específica del transgen; marcador de peso molecular: 1 Kb-plus Ladder (Invitrogen).

De acuerdo al análisis de expresión del transgen por medio de la técnica de RT-PCR (Figura 8.4), en la tabla 2 se indican aquellas líneas de moscas que revelaron la presencia del transcrito de interés. En estas reacciones de PCR se utilizó un oligo 5' (hsp83-5') que hibrida con una secuencia específica del vector y un oligo 3' complementario a la secuencia del cDNA de cada proteína híbrida, de tal forma que sólo el cDNA transgénico fuera amplificado. Es importante mencionar que este análisis fue solo cualitativo.

Tabla 2. Expresión del transgen en líneas de moscas transgénicas creadas con el vector de pCaSpeR^{HSP83}.

Tipo de línea transgénica pCaSpeR ^{HSP83}							
6His-p8		p8-6His		Myc-ORF		ORF-Myc	
3	✓	1	✓	1	✓	1	✓
5	✓	2	✓	4	✓	3	×
6	✓	7	✓	7	✓	5	✓
9	×	9	✓	8	✓	8	✓
12	✓					14	✓

Cada número indica la asignación del nombre de la línea transgénica. (✓) Indica la presencia del transcrito esperado, (×) indica su ausencia.

B. Análisis de la expresión de las proteínas híbridas

El último criterio de selección de las líneas de moscas transgénicas que podrán utilizarse en el análisis de la posible interacción física entre ORF2 y algún componente de TFIID, fue verificar la expresión de las proteínas híbridas en las moscas adultas. Con este objetivo se prepararon extractos de proteína total de las moscas homocigas, que de acuerdo al resultado del análisis por RT-PCR (Figura 8.4) mostraron la expresión del transgen. Luego, se realizaron ensayos de Western blot con la finalidad de inmunodetectar la presencia de las proteínas híbridas mediante los anticuerpos anti-His y anti-Myc. En la tabla 3 se enlistan las líneas de moscas transgénicas probadas en este ensayo y se señala aquellas que mostraron una clara expresión de la proteína híbrida esperada. En la Figura 8.5 se observan las autorradiografías que muestran el resultado de dos experimentos representativos tipo Western.

Tabla 3. Expresión de las proteínas híbridas de p8 o de ORF2 en líneas de moscas transgénicas creadas con el vector de pCaSpeR.

Tipo de línea transgénica pCaSpeR ^{HSP83}							
6His-p8		p8-6His		Myc-ORF		ORF-Myc	
3	×	1	✓	1	✓	1	×
5	✓	2	✓	4	✓	5	×
6	✓	7	×	7	✓	8	×
12	✓	9	✓	8	✓	14	×

Cada número indica la asignación de la línea transgénica. (✓) Indica la detección adecuada de la proteína, (×) indica que la proteína no fue detectada.

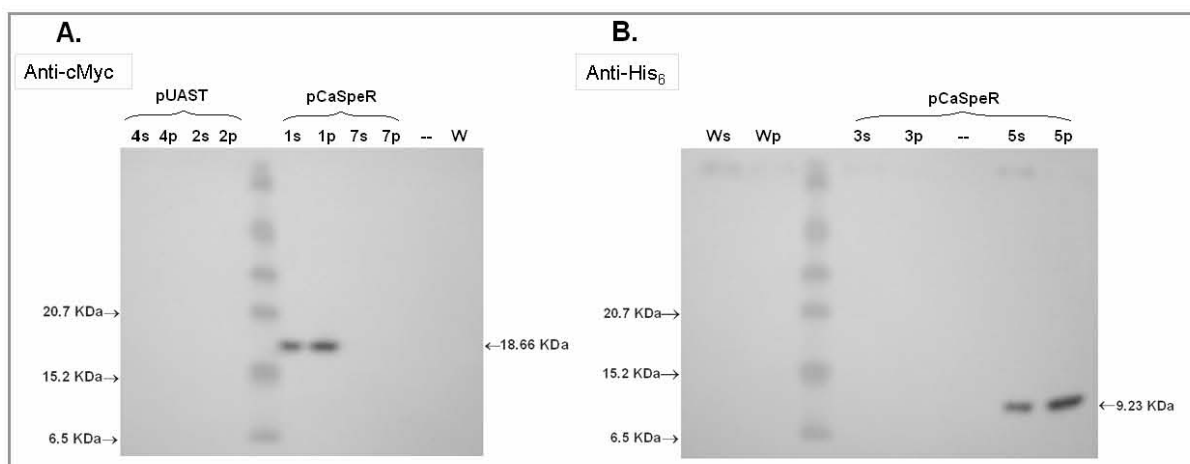


Figura 8.5. Inmunodetección de las proteínas híbridas a partir de extracto de proteínas de moscas transgénicas adultas. (A) Inmunodetección de la proteína Myc-ORF. (4 y 2), Líneas de moscas transgénicas generadas con vector pUAST sin inducir. (1) Línea transgénica generada con vector pCaSpeR que expresa la proteína híbrida Myc-ORF. (7) Línea transgénica generada con vector pCaSpeR que no muestra expresión de la proteína Myc-ORF. (W) Control sin transgen, sobrenadante. (B) Inmunodetección de la proteína 6His-p8. (W) Control sin transgen. (3) Línea transgénica generada con vector pCaSpeR que no muestra expresión de la proteína híbrida 6His-p8. (5) Línea transgénica generada con vector pCaSpeR que sí expresa la proteína 6His-p8. (--, vacío; s, sobrenadante; p, pastilla.)

Durante los análisis iniciales de los experimentos tipo Western con las distintas líneas de moscas transgénicas no se tuvo la precaución de examinar líneas de moscas silvestres. Cuando se incluyeron extractos de moscas Oregon R (OreR) y W^{1118} y se utilizó el anticuerpo anti-6His, se observó la detección específica de una proteína de peso molecular muy similar al de p8 (Figura 8.6). Este resultado elimina la confiabilidad de la detección de las proteínas híbridas de p8 mediante el uso del anticuerpo monoclonal (Roche) contra la etiqueta de 6His; por lo tanto, el resultado de los Western blots con las líneas 6His-p8 y p8-6His resumidos en la tabla 3 no es concluyente. Sin embargo, se confía en los resultados arrojados por el análisis de expresión del transgen (mediante RT-PCR) señalados en la tabla 2.

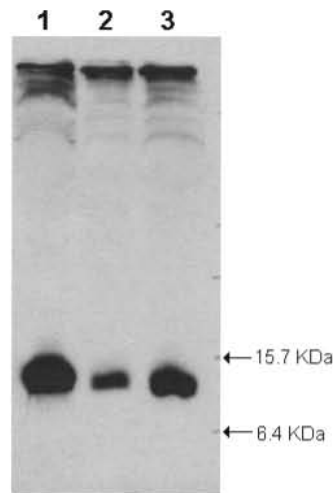


Figura 8.6. Autorradiografía que muestra la detección específica de una proteína de peso similar a p8 con etiqueta de 6His (9 KDa) en líneas de moscas silvestres. (1 y 3, extracto de moscas OreR; 2, extracto de moscas W^{1118})

En el caso de los experimentos tipo Western donde se utilizó el anticuerpo anti-Myc, no se detectó ninguna banda específica en los extractos de moscas silvestres. Por lo que los resultados observados para la expresión de las proteínas híbridas de ORF fueron confiables. Además, éstos se corroboraron con los ensayos de RT-PCR

DISCUSIÓN

Líneas de moscas transgénicas generadas

La transformación en *Drosophila* se realiza por la inyección del DNA plasmídico dentro de los embriones antes del tiempo de formación de las células polares, con la finalidad de que se integre en las células de la línea germinal para que el transgen de interés pueda heredarse a las próximas generaciones. Aunque las secuencias plasmídicas pueden expresarse en los individuos inyectados aun sin la integración, la transformación estable ocurre cuando el DNA inyectado se integra al DNA de la línea germinal. Pueden ocurrir una o más integraciones en el DNA de una misma célula germinal, o bien, pueden ocurrir diferentes integraciones en distintas células de la línea germinal de un mismo individuo. Así, las células de la línea germinal de los embriones inyectados poseen células transformadas y no transformadas. Por ello, es muy importante recuperar los organismos transformantes como progenie F1 individual, ya que distintos individuos F1 de la misma mosca F0 pueden llevar integraciones en diferentes regiones del genoma (Ashburner, 2004). Tomando en cuenta estas observaciones, se aseguró que las líneas transformadas fueran en realidad diferentes escogiendo individuos independientes de la progenie F1 para generar cada una de estas líneas de moscas.

Por otro lado, se ha reportado que la frecuencia de transformación puede verse influida por el tamaño y por la secuencia del inserto (Ashburner, 2004). Sin embargo, después de observar la eficiencia promedio obtenida en nuestras moscas (alrededor de 20%), ninguno de estos factores parecen haberla reducido. Aunque la variabilidad observada en la eficiencia de transformación con las distintas construcciones generadas para los vectores utilizados podría deberse a rearrreglos plasmídicos producidos después de la inyección del embrión (Spradling, 1986); o bien, a las pequeñas modificaciones en la secuencia del inserto que codifica para las distintas proteínas híbridas en cada vector construido.

Una vez obtenidas las distintas líneas de moscas transgénicas a partir de los dos tipos de vectores de expresión usados, solamente se realizó el análisis de expresión (del transgen y de la proteína) con las moscas originadas a partir del vector pCaSpeR^{HSP83}. Aunque la expresión que el promotor constitutivo HSP83 induce es menor que la del promotor fuerte HSP70 (presente en los otros vectores pUAST), ésta no se encuentra sujeta a la acción de un

activador específico como GAL4 (proteína que no está presente de manera natural en la mosca). Por lo tanto, al trabajar con las moscas transgénicas de pCaSpeR^{HSP83} se evitó la necesidad de ampliar el esquema de cruzas para obtener moscas que expresaran el activador GAL4 y con ello se permitiera la expresión de la proteína híbrida. Por otro lado, de acuerdo al análisis de secuencia hecho sobre los vectores pUAST construidos, las proteínas híbridas que pueden expresarse a partir de estos vectores podrían tener aminoácidos adicionales en su extremo amino, lo cual podría interferir con la detección de estas proteínas si se modificara la etiqueta que llevan. Sin embargo, la importancia de las moscas construidas con este último vector reside en poder dirigir la expresión de las proteínas híbridas en una ventana de espacio (tejido específico) y tiempo determinados; con lo cual podría generarse un sistema de estudio más delimitado para analizar la funcionalidad de p8 y ORF2.

El análisis de expresión se realizó inicialmente con las líneas de moscas transgénicas pCaSpeR^{HSP83}, y una vez que se observó que en estas moscas había una expresión de las proteínas de fusión, se continuó trabajando únicamente con estas líneas. La selección individual que se hizo de las líneas independientes de moscas transgénicas se basó en tres criterios. Primero, que el color de los ojos de las moscas fuera preferentemente rojo o naranja; segundo, que hubiera expresión del transgen que codifica a la proteína híbrida y, tercero, que la proteína se expresara en los organismos adultos.

Una coloración intensa de los ojos de las moscas indica que el gen reportero *white* que acompaña al transgen se está expresando fuertemente en este tejido, y puede sugerir que la transcripción de dicho transgen también se está llevando a cabo. Sin embargo, se observó que algunas líneas de moscas con ojos rojos no mostraron la expresión del transgen (a través del ensayo de RT-PCR, Figura 8.4), lo que supone que éste se encuentra insertado en una zona de la cromatina que tiende a silenciar su expresión génica más allá de los ojos de la mosca, o bien, que no se encuentra transcripcionalmente activo de manera continua en todos los tejidos del organismo. Aunque no se ha demostrado que exista preferencia por un sitio de inserción dentro de las regiones eucromáticas (cromatina abierta) de los cromosomas, las inserciones que se encuentren en la heterocromatina (cromatina condensada) pueden quedar desapercibidas porque la expresión del gen reportero se inactiva. En este caso, se supone también que la expresión del transgen no se lleva a cabo en esos individuos.

Teniendo en cuenta que el color de ojos de las moscas transgénicas no asegura que el transgen se esté transcribiendo, se aisló el RNA de las moscas que inicialmente se habían seleccionado, se sintetizó cDNA a partir de él y específicamente se amplificaron por PCR las secuencias correspondientes al RNA mensajero de las proteínas híbridas de p8 y ORF2 (Figura 8.4). Adicionalmente, se comprobó también la expresión de la proteína mediante experimentos tipo Western (Figura 8.5). Con estas dos pruebas se puede garantizar que las líneas de moscas seleccionadas expresan correctamente el transgen y permiten la obtención de extractos proteicos enriquecidos con la proteína de fusión. De esta manera, estos extractos podrán utilizarse en ensayos que permitan determinar si existe interacción física entre ORF2 y p8, u otro componente de TFIIH.

Como ya se mencionó, se ha demostrado que la proteína p8 está involucrada principalmente en la reparación del DNA a través del mecanismo de NER (Coin, 2006). Por ello, en el laboratorio se realizaron algunos experimentos para analizar la posibilidad de que la sobre-expresión de p8 confiere mayor resistencia a la radiación UV. Para ello, se escogieron distintas líneas de moscas transgénicas que sobre-expresan p8 (tanto en su versión nativa como cuando llevan la etiqueta de 6His en cada uno de sus extremos) se expusieron a diferentes dosis de radiación UV. En estos experimentos se pudo observar que tanto la línea que sobre-expresa a p8 silvestre como aquella que sobre-expresa a la proteína con su etiqueta en el extremo carboxilo (p8-6His) son significativamente más resistentes a la radiación UV en comparación con la línea silvestre (Oregon R). También se mostró que la línea que expresa la proteína p8 con la etiqueta de 6His en su extremo amino (6His-p8) es incluso menos resistente que la línea silvestre (Mario Zurita, datos no publicados).

Estos resultados sugieren que la versión recombinante de la proteína p8-6His es igualmente funcional a la proteína p8 silvestre y sugieren que la sobre-expresión de esta subunidad incrementa la eficiencia de TFIIH en el mecanismo de NER de la mosca. Por otro lado, la deficiente resistencia a la radiación UV en la línea que sobre-expresa 6His-p8 podría sugerir que, de la misma manera que sucede en levadura y en humano (Zhou, 2007; Coin, 2006), el extremo amino de p8 de *Drosophila* podría ser importante en su interacción con TFIIH y en su papel dentro de la reparación por NER.

Coin y colaboradores (2006) han demostrado que p8 es necesaria para mantener los niveles celulares de TFIIH y que esta proteína interactúa directamente con la subunidad p52

dentro de este complejo. Con esto en mente, en nuestro laboratorio se realizaron estudios para determinar si la sobre-expresión de p8 silvestre en moscas mutantes en la subunidad p52 de *Drosophila* (*Dmp52*) rescataban los fenotipos de letalidad y esterilidad de estas mutantes. Se demostró que estos fenotipos son parcialmente rescatados con una sola copia del gen de p8 de *Drosophila* (Mariana Fregoso, Tesis de Doctorado, datos no publicados). Este rescate podría deberse a que la sobre-expresión de p8 podría ser capaz de compensar la estabilidad del complejo, afectada por la mutación en la subunidad p52. Resultados preliminares sugieren que la sobre-expresión de p8 no sólo restaura los niveles basales de TFIID de las mutantes de *Dmp52*, sino que restaura el fenotipo de la cutícula defectuosa y quetas quebradizas que muestran estas mutantes (Mario Zurita, comunicación personal).

Aunque, de modo general, no se ha asignado ninguna función para la proteína ORF2, un análisis similar al que se realizó con p8 utilizando las líneas de moscas que sobre-expresan ORF2 (en sus versiones nativa y recombinantes) podría arrojar información sobre una posible participación de ésta proteína en la reparación del DNA cuando existe daño por luz UV, o en relación a la estabilidad del complejo TFIID.

Significado de ORF2

Recientemente se han publicado dos trabajos (Choi, 2007; March-Díaz, 2007) sobre una proteína nuclear de *Arabidopsis thaliana* cuya secuencia de aminoácidos es 46% similar a la de la proteína ORF2 (Figura 9.1). Dicha proteína de *A. thaliana* parece ser homóloga a SWC6 de *Saccharomyces cerevisiae* (47% de similitud en sus secuencias de aminoácidos), la cual forma parte del complejo remodelador de la cromatina SWR1, encargado de catalizar el reemplazo de la histona nucleosomal H2A por la variante H2AZ (Krogan, 2003). Ambos trabajos sugieren la presencia de un complejo similar a SWR1 en *Arabidopsis* y, demuestran que la pérdida de función del gen que codifica a SWC6 (*Atswc6*) origina fenotipos relacionados con defectos en la floración y en el desarrollo de la planta. Interesantemente, la mutante de *Atswc6* no presenta un fenotipo embrionario letal, a pesar de ser el único homólogo en *Arabidopsis* (Choi, 2007).

Estos datos refuerzan nuestro proyecto, ya que confirman la existencia de una proteína similar (casi 50% de similitud en la secuencia de aminoácidos) a ORF2 en otros organismos

aparte de la mosca de la fruta y, permiten suponer un posible vínculo entre el complejo remodelador de la cromatina SWR1 y el complejo de transcripción/repación TFIIH.

El complejo SWR1 de levadura contiene 13 subunidades, algunas de las cuales presentan ciertos dominios estructurales que sugieren su participación en procesos relacionados con la modificación de la estructura de la cromatina (Krogan, 2003). También existen reportes donde se indican la participación del este complejo SWR1 tanto en la regulación de la transcripción como en la reparación del daño al DNA (Kobor, 2004; Papamichos-Cromakis, 2006).

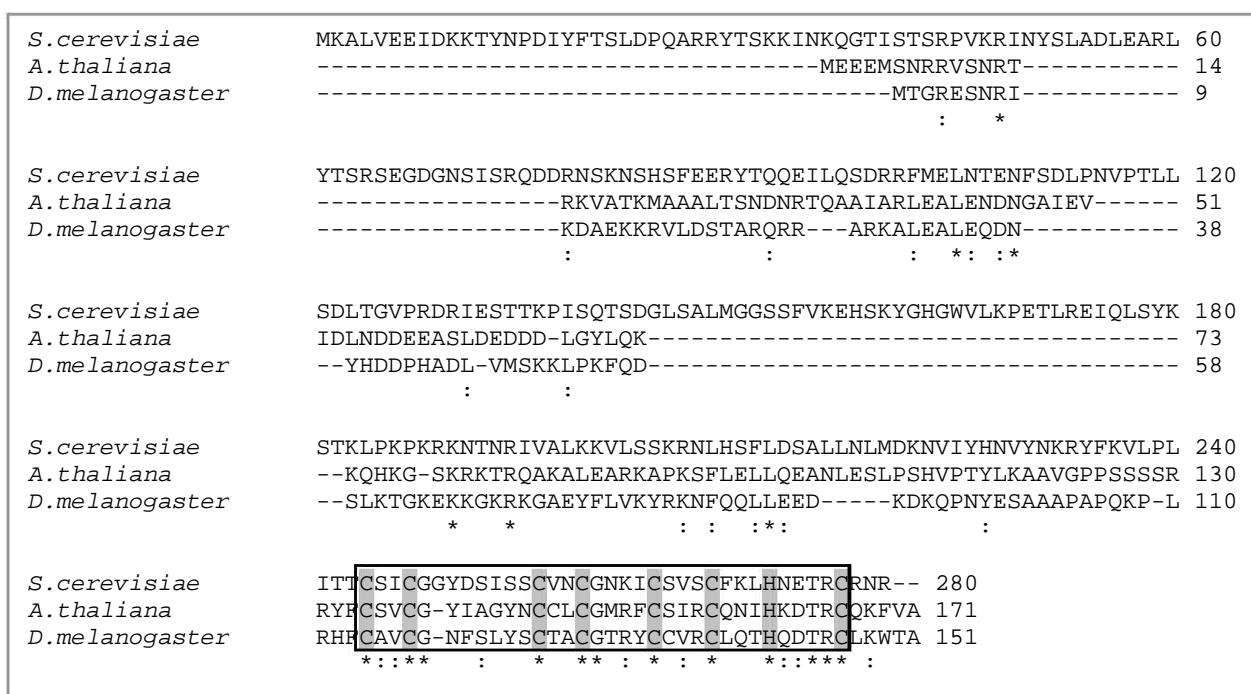


Figura 9.1. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de las proteínas relacionadas con ORF2 de *Drosophila melanogaster*, en *Arabidopsis thaliana* y *Saccharomyces cerevisiae*. (*) aminoácidos idénticos; (:) aminoácidos similares. El dominio de dedo de zinc tipo HIT se señala con el recuadro; los residuos relacionados en la posible coordinación de los átomos de zinc se resaltan en gris. El alineamiento se realizó con el programa CLUSTAL W versión 1.83 (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>).

CONCLUSIONES.

I. Utilizando dos vectores de expresión específicos de mosca, se generaron distintas construcciones que permitieron la creación de moscas transgénicas, capaces de sobreexpresar las proteínas TTDA (p8) y ORF2 fusionadas a una etiqueta de 6His y Myc, respectivamente, tanto en su extremo amino como en el carboxilo. Las ocho construcciones son:

1. pCaSpeR^{HSP83} / 6His-p8
2. pCaSpeR^{HSP83} / p8-6His
3. pCaSpeR^{HSP83} / Myc-ORF
4. pCaSpeR^{HSP83} / ORF-Myc
5. pUAST / 6His-p8
6. pUAST / p8-6His
7. pUAST / Myc-ORF
8. pUAST / ORF-Myc

Cabe mencionar que el vector de expresión pCaSpeR^{HSP83} permite la expresión constitutiva del transgen, mientras que el vector pUAST lo hace de manera tejido-dirigida.

II. Se obtuvieron más de 10 líneas de moscas transgénicas (enlistadas en el Anexo 1) que pueden expresar las proteínas híbridas de manera independiente; algunas de estas líneas llevan un cromosoma balanceador (que impide la recombinación) como cromosoma homólogo al que contiene el transgen. Estas moscas son una herramienta fundamental para el estudio de la posible interacción física entre las ORF2 y p8, o bien, ORF2 y algún otro componente de TFIIH.

III. Mediante un análisis de transcripción reversa (RT)-PCR se corroboró, para cada versión de las proteínas híbridas, la expresión del transgen en cuatro distintas líneas de moscas creadas a partir del vector pCaSpeR^{HSP83} (ver Tabla 2 en la sección de Resultados).

IV. Se observó la expresión de las proteínas híbridas en las moscas transgénicas creadas a partir del vector pCaSpeR^{HSP83}. La Tabla 3 de la sección de Resultados resume el resultado de los ensayos tipo Western con las líneas analizadas.

PERSPECTIVAS

El novedoso hallazgo de que, en *Drosophila*, el homólogo de p8 se encuentre codificado en un transcrito bicistrónico, nos permite suponer que la proteína ORF2 (codificada en el segundo marco de lectura abierta de este transcrito) pueda relacionarse funcionalmente con TFIIH, o de manera independiente con p8. Un modo de abordar esta suposición sería identificar posibles interacciones físicas entre ORF2 y algún componente de TFIIH. Para esto, se propone llevar a cabo experimentos de co-inmunoprecipitación (co-IP), empleando extractos proteicos de las líneas de moscas transgénicas generadas en este trabajo, las cuales sobre-expresan proteínas híbridas de p8 y ORF2. Se propone esta técnica por ser simple y eficaz, y porque provee suficiente sensibilidad para detectar asociaciones proteicas dentro del medio celular a pesar de la sustancial dilución que se hace de éste.

Por otro lado, a partir del análisis del interactoma de las proteínas de *Drosophila*, basado en un ensayo de doble-híbrido (Giot, 2003), se ha indicado la interacción de la proteína ORF2 con la subunidad p52 del complejo TFIIH. En este sentido, las co-IPs pueden complementar los ensayos de doble-híbrido, verificando como verdaderas aquellas interacciones positivas reflejadas en la levadura; o bien, anulando aquellas interacciones falsas-positivas que ocurren cuando los dominios de las proteínas probadas en el doble-híbrido se exponen de manera inadecuada. Inclusive, ya que no todas las proteínas pueden analizarse por un ensayo de doble-híbrido, a través de las co-IPs puede descubrirse una asociación verdadera enmascarada en un resultado negativo en este tipo de ensayo.

Si el resultado de los ensayos co-IP indicara una interacción física entre ORF2 y p8, o algún otro componente de TFIIH, también se podrá determinar si existe una co-localización de dichas proteínas dentro de la célula. Adicionalmente, el análisis de la interacción a nivel molecular entre ORF2 y TFIIH se puede complementar con la co-tinción de cromosomas politénicos mediante el uso de anticuerpos específicos que reconozcan las proteínas de interés, pues se sabe que el uso de éstos ha permitido identificar regiones específicas de la cromatina donde interaccionan algunas de las proteínas involucradas en diferentes procesos celulares básicos (transcripción, replicación, reparación del DNA, remodelaje de la estructura de la propia cromatina, etc.).

Así mismo, tomando en cuenta que la proteína ORF2 parece ser el homólogo de la subunidad SWC6 del complejo remodelador de la cromatina SWR1 (SWR1-C), se podría analizar la presencia de componentes del complejo homólogo a SWR1-C en la mosca (llamado TIP60) en los mismos ensayos de co-IP e inmunocitoquímica.

Para completar el estudio de las funciones que p8 y ORF2 pueden desempeñar en *Drosophila*, sería importante analizar su posible interacción genética con componentes de los complejos TFIIH y TIP60. Con esta finalidad, podrían realizarse un tamizado genético utilizando mutantes en componentes de dichos complejos y otros factores relacionados con la regulación transcripcional y con la reparación del DNA. Adicionalmente, podrían generarse moscas con mutaciones en los genes que codifican a p8 y ORF2 para analizar sus fenotipos, y para observar si se generan o acentúan defectos transcripcionales o de reparación del DNA cuando se combinan con las moscas mutantes en otros componentes de estos mecanismos.

Cabe recordar que se cuenta con otro conjunto de líneas de moscas transgénicas generadas con el vector pUAST, en las que puede inducirse la expresión de las proteínas híbridas de p8 y ORF2 de manera tejido-específica. Estas líneas podrían funcionar como un sistema modelo para la caracterización funcional de estas proteínas, si se dirige la expresión de las mismas en un tejido que sea más susceptible a defectos transcripcionales y/o de reparación del DNA. Por ejemplo, se ha encontrado que moscas que tienen mutaciones en la subunidad de p52 de TFIIH tienen defectos drásticos en la ovogénesis (Fregoso, 2007), por lo que el ovario podría ser un tejido sensible a deficiencias transcripcionales y/o de reparación del DNA.

Finalmente, ya que existe la posibilidad de que ORF2 no interactúe con algún componente de TFIIH ni TIP60 en condiciones normales e incluso bajo el estímulo de radiación con luz UV, habría que determinar los blancos de interacción de ORF2. Esto puede llevarse a cabo mediante la identificación de las proteínas que co-precipitan con ORF2, mediante espectroscopia de masas; o bien, realizando un nuevo ensayo de doble híbrido con una biblioteca de cDNA de mosca clonada en levadura.

ANEXO 1.

Líneas de moscas transgénicas.

Tabla A. Líneas independientes de moscas transgénicas generadas mediante el vector pCaSpeR^{HSP83}, para expresar las proteínas p8 y ORF2 fusionadas a etiquetas de 6His y Myc, respectivamente.

p8-6His			6His-p8			ORF-Myc			Myc-ORF		
Línea	Crom		Línea	Crom		Línea	Crom		Línea	Crom	
1	X/Y	homóciga	1	X/Y	homóciga	1	X/Y	homóciga	1	X/Y	homóciga
2	X/Y	homóciga	2	X/Y	homóciga	2	X/Y	homóciga	2	2	homóciga
3	2	homóciga	3	X/Y	homóciga	3	X/Y	homóciga	2	2	Cy
4	2	homóciga	4	X/Y	homóciga	4	X/Y	homóciga	3	2	homóciga
4	2	Cy	5	2	homóciga	5	2	homóciga	3	2	Cy
5	2	homóciga	5	2	Cy	5	2	Cy	4	2	homóciga
5	2	Cy	6	2	homóciga	6	2	homóciga	4	2	Cy
6	3	homóciga	6	2	Cy	6	2	Cy	5	3	homóciga
6	3	Sb	8	3	homóciga	8	2	homóciga	5	3	Sb
6	3	Ubx	8	3	Sb	8	2	Cy	5	3	Ubx
7	3	homóciga	8	3	Ubx	9	3	Sb	6	3	homóciga
7	3	Sb	9	3	homóciga	10	3	homóciga	6	3	Sb
8	3	Sb	9	3	Sb	10	3	Sb	7	3	homóciga
8	3	Ubx	9	3	Ubx	11	3	Ubx	7	3	Sb
9	3	homóciga	10	3	homóciga	12	3	homóciga	7	3	Ubx
9	3	Ubx	10	3	Sb	12	3	Ubx	8	3	homóciga
10	3	homóciga	11	3	homóciga	12	3	Sb	8	3	Sb
10	3	Sb	11	3	Sb	14	3	homóciga	8	3	Ubx
11	3	homóciga	11	3	Ubx	15	3	homóciga	9	3	Sb
11	3	Sb	12	2	homóciga	16	3	homóciga	9	3	Ubx
12	3	homóciga	12	2	Cy	17		homóciga	10	3	homóciga
12	3	Sb	13	3	homóciga	18		homóciga	10	3	Sb
13	2	homóciga	13	3	Sb	19		homóciga	10	3	Ubx
14	3	homóciga	14	3	Sb	20		homóciga	11	3	homóciga
15	3	homóciga	A		homóciga	21		homóciga	11	3	Sb
16		homóciga	B		homóciga	22		homóciga	11	3	Ubx
17		homóciga	C		homóciga	23		homóciga	12	2	homóciga
									13	3	homóciga
									13	3	Ubx
									A		homóciga

Tabla B. Líneas independientes de moscas transgénicas generadas mediante el vector pUAST, para expresar las proteínas p8 y ORF2 fusionadas a etiquetas de 6His y Myc, respectivamente.

ORF-Myc			Myc-ORF			6His-p8			p8-6His		
Línea	Crom		Línea	Crom		Línea	Crom		Línea	Crom	
1	X/Y	homóciga	1	2	homóciga	1	X/Y	homóciga	1	X/Y	homóciga
2	X/Y	homóciga	1	2	Cy	2	X/Y	homóciga	2	2	homóciga
3	2	Cy	2	2	homóciga	3	X/Y	homóciga	2	2	Cy
4	2	homóciga	2	2	Cy	4	X/Y	homóciga	3	2	Cy
5	2	homóciga	3	2	homóciga	5	X/Y	homóciga	3	2	homóciga
6	3	homóciga	3	2	Cy	6	2	homóciga	4	3	Sb
6	3	Sb	4	2	homóciga	6	2	Cy	4	3	Ubx
6	3	Ubx	4	2	Cy	7	2	homóciga	4	3	homóciga
7	3	homóciga	7	3	homóciga	7	2	Cy	5	3	Sb
7	3	Sb	7	3	Sb	8	2	homóciga	5	3	Ubx
7	3	Ubx	8	3	homóciga	8	2	Cy	5	3	homóciga
8	3	Sb	8	3	Sb	9	2	homóciga	6	3	homóciga
8	3	Ubx	8	3	Ubx	9	2	Cy	6	3	Sb
10	3	homóciga	9	3	homóciga	10	2	homóciga	6	3	Ubx
10	3	Sb	9	3	Sb	10	2	Cy	7	2	Cy
10	3	Ubx	9	3	Ubx	11	2	homóciga	7	2	homóciga
11	3	homóciga	10	3	homóciga	11	2	Cy	8	3	Sb
11	3	Sb	10	3	Sb	12	3	homóciga	8	3	Ubx
12	3	homóciga	11	3	homóciga	12	3	Sb	8	3	homóciga
12	3	Ubx	11	3	Sb	12	3	Ubx	9		homóciga
13	3	Ubx	11	3	Ubx	13	3	homóciga	10		homóciga
14	3	Sb	12	3	homóciga	13	3	Sb	11		homóciga
15	2	homóciga	12	3	Sb	13	3	Ubx			
16	3	homóciga	12	3	Ubx	14	3	homóciga			
17		homóciga	13	3	homóciga	14	3	Sb			
18		homóciga	13	3	Sb	14	3	Ubx			
19		homóciga	13	3	Ubx	15	3	homóciga			
20		homóciga	14	3	homóciga	15	3	Sb			
21		homóciga	14	3	Sb	15	3	Ubx			
22		homóciga	14	3	Ubx	16	3	homóciga			
			15	3	homóciga	16	3	Sb			
			15	3	Sb	17	3	homóciga			
			15	3	Ubx	17	3	Sb			
			16	3	homóciga	17	3	Ubx			
			16	3	Sb	18	3	homóciga			
			16	3	Ubx	18	3	Sb			
			17	3	homóciga	18	3	Ubx			
			17	3	Ubx	19	3	homóciga			
			17	3	Sb	19	3	Sb			
			18	3	Ubx	19	3	Ubx			
			18	3	Sb	20	3	homóciga			
			19	2	homóciga	20	3	Ubx			
			20	3	homóciga	20	3	Sb			

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

CAK	Cinasa activadora de ciclina, subcomplejo de TFIIH
Cdk7	Cinasa 7 dependiente de ciclina, subunidad del subcomplejo CAK de TFIIH
cDNA	DNA de cadena sencilla cuya secuencia es complementaria a un RNA
co-IP	Experimento de co-inmunoprecipitación
CS	Síndrome de Cockayne
CSB	Proteína Síndrome de Cockayne B, participa en la vía TCR de NER durante el reconocimiento del DNA dañado
CycH	Ciclina H, subunidad del subcomplejo CAK de TFIIH
D.O.	Densidad óptica
DDB	Proteína de unión al DNA dañado (“Damaged DNA-binding protein”), participa en la vía GGR de NER durante el reconocimiento del DNA dañado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERCC1	Proteína acompañante de la nucleasa XPF, participa en NER
GAL4	Activador transcripcional cuya secuencia blanco es UAS
GGR	Reparación global del genoma (“Global Genome Repair”)
H2A	Histona canónica que forma parte central del nucleosoma
H2Av	Única variante de la histona H2A en <i>Drosophila melanogaster</i>
H2AZ	Variante de la histona H2A cuya función se ha relacionado con la regulación transcripcional
hHR23B	Proteína humana homóloga a Rad23B (“human homologue of Rad23B”) acompañante de XPC en GGR
MAT1	Factor ensamblador del subcomplejo CAK de TFIIH
Myc	Péptido correspondiente al epítipo de c-myc utilizado como etiqueta para identificar la proteína ORF2
Myc-ORF	Proteína híbrida de ORF2 con una etiqueta de Myc en su extremo amino
NER	Reparación por escisión de nucleótidos (“Nucleotide Excision Repair”)
ORF2	Proteína codificada en el segundo marco de lectura abierta del transcrito bicistrónico de p8 en <i>Drosophila melanogaster</i>
ORF-Myc	Proteína híbrida de ORF2 con una etiqueta de Myc en su extremo carboxilo
p8 o TTDA	Proteína de 8 KDa que forma parte del subcomplejo central de TFIIH
p8-6His	Proteína híbrida de p8 (TTDA) con una etiqueta de 6His en su extremo carboxilo
p34	Proteína de 34 KDa que forma parte del subcomplejo central de TFIIH
p44	Proteína de 44 KDa que forma parte del subcomplejo central de TFIIH; posee actividad de ligasa de ubiquitina
p52	Proteína de 52 KDa que forma parte del subcomplejo central de TFIIH
p62	Proteína de 62 KDa que forma parte del subcomplejo central de TFIIH
pCaSpeR ^{HSP83}	Vector de expresión para generar moscas transgénicas que permite la expresión constitutiva del transgen gracias a la presencia del promotor HSP83
PCNA	Cofactor de DNA polimerasas (“Proliferation Cell Nuclear Antigen”)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (“Polimerase Chain Reaction”)
pCR2.1	Vector de clonación que permite la inserción directa de un producto de PCR
pUAST	Vector de expresión para generar moscas transgénicas que permite dirigir la expresión del transgen gracias al uso del sistema UAS/GAL4 de levadura

rDNA	DNA que codifica para los genes ribosomales
RFC	Cofactor de DNA polimerasas (“Replication Factor C”)
RNA	Ácido ribonucleico
RPA	Proteína de replicación A (“Replication protein A”), participa en NER estabilizando la hebra sencilla de DNA y posicionando las nucleasas
RT-PCR	Técnica que permite la amplificación de DNA obtenido a partir de una reacción de transcripción reversa
SDS-PAGE	Electroforesis en una dimensión bajo condiciones desnaturalizantes
ssDNA	DNA de cadena sencilla
SWR1-C	Complejo remodelador de la cromatina SWR1 que permite el intercambio de la histona variante H2AZ
TCR	Reparación acoplada a la transcripción (“Transcription Coupled Repair”)
TFIIH	Factor de transcripción H asociado a la RNA polimerasa II
TTD	Tricotiodistrofia
TTD-A	Tipo de complementación A de TTD
UAS	Secuencia de DNA activadora de la transcripción (“Upstream Activating Sequence”)
UV	Ultravioleta
XP	Xeroderma Pigmentosum
XPA	Proteína Xeroderma Pigmentosum A, participa en NER verificando el daño ocasionado en la hebra de DNA
XPB	Proteína Xeroderma Pigmentosum B con actividad de helicasa dependiente de ATP con polaridad 3’-5’, subunidad de TFIIH
XPC	Proteína Xeroderma Pigmentosum C, participa en la vía GGR de NER durante el reconociendo del DNA dañado
XPD	Proteína Xeroderma Pigmentosum D con actividad de helicasa dependiente de ATP con polaridad 5’-3’, subunidad de TFIIH
XPE	Proteína Xeroderma Pigmentosum E, acompañante de la proteína DDB en GGR
XPF	Proteína Xeroderma Pigmentosum F con actividad de nucleasa 5’, participa en NER durante la incisión del oligonucleótido que lleva el daño
XPG	Proteína Xeroderma Pigmentosum G con actividad de nucleasa 3’, participa en NER durante la incisión del oligonucleótido que lleva el daño
6His	Péptido de 6 histidinas utilizado como etiqueta para identificar la proteína TTDA/p8
6His-p8	Proteína híbrida de p8 (TTDA) con una etiqueta de 6His en su extremo amino

REFERENCIAS

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K y Walter P. (2002) *Molecular Biology of the Cell*. 4a Edición. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group.
- Ashburner M. (2004) *Drosophila: a laboratory manual*. 2a Edición. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Botta E, Nardo T, Lehmann AR, Egly JM, Pedrini AM y Stefanini M. (2002) Reduced level of the repair/transcription factor TFIIH in trichothiodystrophy. *Hum Mol Genet* 22: 2919-2928.
- Choi K, Park C, Lee J, Oh M, Noh B y Lee I. (2007) *Arabidopsis* homologs of components of the SWR1 complex regulate flowering and plant development. *Development* 134: 1931-1941.
- Coin F, Marinoni JC, Rodolfo C, Fribourg S, Pedrini AM y Egly JM. (1998) Mutations in the XPD helicase gene result in XP and TTD phenotypes, preventing interaction between XPD and the p44 subunit of TFIIH. *Nat Genet* 20, 184–188
- Coin F, De Santis LP, Nardo T, Zlobinskaya O, Stefanini M y Egly JM. (2006) p8/TTD-A as a Repair-Specific TFIIH Subunit. *Mol Cell* 21: 1-12.
- Egly JM. (2001) TFIIH: from transcription to clinic. *FEBS letters* 24884: 124-128.
- Fisher RP. (2005) Secrets of a double agent: CDK7 in cell cycle control and transcription. *J Cell Sci* 118: 5171-5180.
- Fregoso M, Laine JP, Aguilar-Fuentes J, Mocquet V, Reynaud E, Coin F, Egly JM y Zurita M. (2007) DNA repair and transcriptional deficiencies caused by mutations in the *Drosophila* p52 subunit of TFIIH generate developmental defects and chromosome fragility. *Mol Cell Biol* 27: 3640-3650.
- Fuss JO y Cooper PK. (2006) DNA Repair: dynamic defenders against cancer and aging. *PLOS Biol* 4: 899-903.
- Giglia-Mari G, Coin F, Ranish JA, Hoogstraten D, Theil A, Wijgers N, Jaspers NGJ, Raams A, Argentini M, van der Spek PJ, Botta E, Sefanini M, Egly JM, Aebersold R, Hoeijmakers JHJ y Vermeulen W. (2004) A new, tenth subunit of TFIIH is responsible for the DNA repair syndrome trichothiodystrophy group A. *Nat Genet* 36: 714-719.

- Giglia-Mari G, Miquel C, Theil AF, Mari PO, Hoogstraten D, Ng JMY, Dinant C, Hoeijmakers JHJ y Vermeulen W. (2006) Dynamic interaction of TTDA with TFIID is stabilized by Nucleotide Excision Repair in living cells. *PLOS Biol* 4 (DOI: 10.1371/journal.pbio.0040156)
- Giot L, Bader JS, Brouwer C, Chaudhuri A, Kuang B, Li Y, Hao YL, Ooi CE, Godwin B, Vitols E, Vijayadamodar G, Pochart P, Machineni H, Welsh M, Kong Y, Zerhusen B, Malcolm R, Varrone Z, Collis A, Minto M, Burgess S, McDaniel L, Stimpson E, Spriggs F, Williams J, Neurath K, Loime N, Agee M, Voss E, Furtak K, Renzulli R, Aanensen N, Carrola S, Vickelhaupt E, Lazovatsky Y, DaSilva A, Zhong J, Stanyon CA, Finley Jr RL, White P, Braverman M, Jarvie T, Gold S, Leach M, Knight J, Shimkets RA, McKenna MP, Chant J y Rothberg JM. (2003) A Protein Interaction Map of *Drosophila melanogaster*. *Science* 302: 1727-1736.
- Hoogstraten D, Nigg AL, Heath H, Mullenders LH, van Driel R, Hoeijmakers JH, Vermeulen W y Houtsmuller AB. (2002) Rapid switching of TFIID between RNA Polymerase I and II transcription and DNA repair *in vivo*. *Mol Cell* 10: 1163-1174.
- Iben S, Tschochner H, Bier M, Hoogstraten D, Hozak P, Egly JM y Grummt I. (2002) TFIID plays an essential role in RNA polymerase I transcription. *Cell* 109: 297-306.
- Itin PH, Sarasin A y Pittelkow MR. (2001) Trichothiodystrophy: Update on the sulfur-deficient brittle hair syndromes. *J Am Acad Dermatol* 44: 891-924.
- Johnston DS. (2002) The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*. *Nat Rev Genet* 3: 176-188.
- Kapetanaki MG, Guerrero-Santoro J, Bisi DC, Hsieh CL, Raptic'-Otrin V y Levine AS. (2006) The DDB1-CUL4A^{DDB2} ubiquitin ligase is deficient in xeroderma pigmentosum group E and targets histone H2A at UV-damage DNA sites. *PNAS* 103: 2588-2593.
- Kobor MS, Venkatasubrahmanyam S, Meneghini MD, Gin JW, Jennings JL, Link AJ, Madhani HD y Rine J. (2004) A protein complex containing the conserved Swi2/Snf2-related ATPase Swr1p deposits histone variant H2A.Z into euchromatin. *PLOS Biol* 2: 587-599.
- Krogan N, Keogh MC, Datta N, Sawa C, Ryan OW, Ding H, Haw RA, Pootoolal J, Tong A, Canadien V, Richards DP, Wu X, Emili A, Hughes TR, Buratowski S y Greenblatt JF.

- (2003) A Snf2 family ATPase complex required for recruitment of the histone H2A variant Htz1. *Mol Cell* 12: 1565-1576.
- Kwek KY, Murphy S, Furger A, Thomas B, O’Gorman W, Kimura H, Proudfoot NJ y Akoulitchev A. (2002) U1 snRNA associates with TFIIF and regulates transcriptional initiation. *Nat Struct Biol* 9: 800-805.
- Kwek KY, Murphy S, Furger A, Thomas B, O’Gorman W, Kimura H, Proudfoot NJ y Akoulitchev A. (2002) U1 snRNA associates with TFIIF and regulates transcriptional initiation. *Nat Struct Biol* 19: 800-805.
- Lehmann AR. (2001) The xeroderma pigmentosum group D (*XPD*) gene: one gene, two functions, three diseases. *Genes Dev* 15: 15-23.
- Lindahl T, Karran P y Wood RD. (1997) DNA excision repair pathways. *Curr Opin Genet Dev* 7: 158-169.
- March-Díaz R, García-Domínguez M, Florencio FJ y Reyes JC. (2007) SEF, a new protein required for flowering repression in Arabidopsis, interacts with PIE1 and ARP6. *Plan Physiol* 143: 893-901.
- Merino C, Reynaud R, Vázquez M y Zurita M. (2002) DNA repair and transcription effects of mutations in TFIIF in *Drosophila* development. *Mol Biol Cell* 13: 3246-3256.
- Papamichos-Cromakis M, Krebs JE y Peterson CL. (2006) Interplay between Ino80 and Swr1 chromatin remodeling enzymes regulates cell cycle checkpoint adaptation in response to DNA damage. *Genes Dev* 20: 2437-2449.
- Ranish JA, Hahn S, Lu Y, Yi EC, Li XJ, Eng J y Aebersold R. (2004) Identification of TFB5, a new component of general transcription and DNA repair factor IIF. *Nat Genet* 36: 707-713.
- Reiter LT, Potocki L, Chien S, Gribskov M y Bier E. (2001) A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res*: 11: 1114-1125.
- Reynaud E, Lomelí H, Vázquez M y Zurita M. (1999) The *Drosophila melanogaster* homologue of the Xeroderma Pigmentosum D gene product is located in euchromatin regions and has a dynamic response to UV Light-induced lesions in polytene chromosomes. *Mol Biol Cell* 10: 1191-1203.

- Riedl T, Hanaoka F y Egly JM. (2003) The comings and goings of nucleotide excision repair factors on damage DNA. *EMBO J* 22: 5293-5303.
- Ritchie H y Wang L-H. (1997) A mammalian bicistronic transcript encoding two dentin-specific proteins. *Biochem Biophys Res Com* 231: 425-428.
- Rubin GM y Lewis EB. (2000) A brief history of *Drosophila's* contributions to genome research. *Science* 287: 2216-2218.
- Ruhf ML, Braun A, Papoulas O, Tamkun JW, Randsholt N y Meister M. (2001) The *domino* gene of *Drosophila* encodes novel members of the SWI2/SNF2 family of DNA-dependent ATPases, which contribute to the silencing of homeotic genes. *Development* 128: 1429-1441.
- Su D, Lou Z, Sun F, Zhai Y, Yang H, Zhang R, Joachimiak A, Zhang XC, Bartlam M y Rao Z. (2006) Dodecamer structure of severe acute respiratory syndrome coronavirous nonstructural protein nsp10. *Journal of Virology* 80: 7902-7908.
- Sullivan W, Ashburner M y Hawley RS. (2000) *Drosophila* Protocols. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Takagi Y, Masuda CA, Chang W-H, Komori H, Wang D, Hunter T, Joazeiro CAP y Kornberg RD. (2005) Ubiquitin ligase activity of TFIID and the transcriptional response to DNA damage. *Mol Cell* 18: 237-243.
- Vermeulen W, Bergmann E, Auriol J, Rademakers S, Frit P, Appeldoorn E, Hoeijmakers JHJ y Egly JM. (2000) Sublimiting concentration of TFIID transcription/DNA repair factor causes TTD-A trichothiodystrophy disorder. *Nat Genet* 26: 307-313.
- Wang H, Zhai L, Xu J, Joo H-Y, Jackson S, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Xiong Y y Zhang Y. (2006) Histone H3 and H4 Ubiquitylation by the CUL4-DDB-ROC1 ubiquitin ligase facilitates cellular response to DNA damage. *Mol Cell* 22: 383-394.
- Zurita M y Merino C. (2003) The transcriptional complexity of the TFIID complex. *Trends in Genetics* 19: 578-584.