



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y FISIOLÓGIA DEL DESARROLLO**

**ANÁLISIS DE LA POSIBLE INTERACCIÓN DE p18^(Hamlet) CON LAS
SUBUNIDADES p8 Y p52 DE TFIH**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A:
IBQ. GRISEL LIZANDRA CRUZ BECERRA

DIRECTOR DE TESIS:
DR. MARIO ENRIQUE ZURITA ORTEGA



CUERNAVACA, MORELOS

SEPTIEMBRE DE 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a las personas que más quiero en la vida, mi familia...gracias por el cariño y el apoyo de tantos años, gracias por estar conmigo en la distancia.

A mis padres, **Carmen Becerra y Efrén Cruz.**

A **Daniel**...gracias por ser y estar, por el amor y los detalles con que llenas mis días...gracias por hacerme sentir!

A mis tíos, mis otros papás: **José Luis, Francisco, Gerardo, Felipe y Jesús.**

A mis hermanos, **Rocío, Gaby, Uly y Fabián.**

A **Snowy** y a **Grakko.**

A mis abuelos paternos y maternos y a todas mis tías y mis primos.

AGRADECIMIENTOS

A **CONACyT** por el apoyo económico que me permitió realizar este posgrado.

Al **Dr. Mario Zurita** por brindarme la oportunidad de aprender en su laboratorio y proporcionarme todo el material y herramientas necesarias para desarrollar el presente trabajo.

A la **Dra. Viviana Valadez** y al **Dr. Javier Águilar** por haberme guiado con sus conocimientos durante estos dos años de aprendizaje.

A mis tutores, **Dr. Gustavo Pedraza** y **Dr. José Luis Reyes**, por sus comentarios y observaciones durante el desarrollo de este proyecto.

A mis sinodales, **Dra. Leonor Pérez**, **Dr. Baltazar Becerril**, **Dr. David Romero** y **Dr. Federico Sánchez** por el tiempo que emplearon para revisar este escrito y los comentarios que permitieron mejorarlo.

A la **Dra. Martha Vázquez**, al **Dr. Enrique Reynaud** y a mis compañeros, **Nacho**, **César**, **René**, **Iván**, **Mónica**, **Sofía**, **Mariana**, **Zoraya**, **Lucía**, **Claudia**, **Daniel** y **Alejandro** por la amistad, el apoyo y el ánimo que me brindaron.

A **Gloria Villa** y **Maribel Velazco** por el excelente apoyo administrativo y a **Carmen Muñoz** por su excelente apoyo técnico.

RESUMEN

El factor de transcripción y reparación TFIIH está constituido por diez proteínas (p8, p34, p44, p52, p62, XPB, XPD, cdk7, cycH y MAT1) conservadas desde levadura hasta humano. En *Drosophila*, p8 está codificada en un bicistrón en conjunto con p18^(Hamlet), un coactivador transcripcional de p53 (en células humanas) y componente del complejo SWR1 (en levadura y *Arabidopsis*). En el interactoma de *Drosophila* se reporta que p52 interacciona con p18^(Hamlet), además, ésta última colocaliza con XPB y XPD en cromosomas politénicos. Dadas las premisas anteriores, en este trabajo, se propuso que p18^(Hamlet) podría interactuar físicamente con las subunidades p8 y p52 de TFIIH. Para abordar dicha hipótesis, se realizaron ensayos de doble híbrido de levadura en los cuales se activó la transcripción de al menos dos de los genes reporteros del sistema, resultado de la interacción de p18^(Hamlet) con p8 y p52. Estos resultados fueron corroborados mediante ensayos de “pull-down” y en conjunto sugieren una posible relación funcional entre p18^(Hamlet) y TFIIH.

Por otra parte, aun cuando las secuencias independientes de p8 y p18^(Hamlet) se tradujeron satisfactoriamente *in vitro*, no fue posible traducirlas en el mismo sistema a partir de la secuencia de DNA que corresponde al bicistrón. Esto sugiere que la región intercistronica entre estas podría ser importante para la regulación de la traducción de este mensajero.

Finalmente, mediante un “screening” por doble híbrido de levadura se encontró que p18^(Hamlet) interacciona físicamente con la isoforma B de presenilina de *Drosophila*, por lo tanto, estas proteínas también podrían estar relacionadas funcionalmente.

CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Reparación por escisión de nucleótidos.....	2
1.2 Papel de TFIIH durante la transcripción.....	4
1.3 Composición y organización estructural de TFIIH	5
1.4 TFIIH: un complejo multifuncional	6
1.5 Mutaciones en algunas subunidades de TFIIH están asociadas a enfermedades en humanos.....	7
II. ANTECEDENTES	9
2.1 <i>Drosophila</i> como modelo de estudio de enfermedades en humanos.....	9
2.2 En <i>Drosophila</i> la subunidad p8 de TFIIH está codificada en un bicistrón	9
2.3 Mutaciones en la subunidad p52 de TFIIH en <i>Drosophila melanogaster</i> producen fenotipos que semejan a la TTD en humanos.....	12
2.4 p18 ^(Hamlet) colocaliza con las subunidades p8 y XPD de TFIIH en cromosomas politénicos.....	13
III. HIPÓTESIS	14
IV. OBJETIVOS	15
4.1 Objetivo general	15
4.2 Objetivos particulares	15
V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	15
5.1 DNA recombinante.....	15
5.2 Ensayo de doble híbrido de levadura.....	16
5.3 Ensayos de “pull-down”	17
VI. METODOLOGÍA	18
6.1 Generación de DNA recombinante.....	19
6.2 Doble Híbrido de levadura	19
6.2.1 Transformación y cotransformación en levadura	19
6.2.2 Ensayo de activación transcripcional	20

6.2.3 Ensayo de toxicidad.....	20
6.2.4 “Yeast mating”	20
6.2.5 Ensayo de actividad β -galactosidasa	21
6.2.6 Selección de clonas positivas	21
6.3 “Pull-down”	21
6.3.1 Purificación de las proteínas de fusión a GST:.....	21
6.3.2 Transcripción traducción in vitro	22
6.3.3 Ensayos de “pull-down”	22
VII. RESULTADOS	22
7.1 Doble híbrido de levadura	23
7.1.1 Activación transcripcional.....	24
7.1.2 Toxicidad.....	25
7.1.3 Complementación de las deficiencias nutricionales.....	25
7.1.4 Actividad β -galactosidasa.....	30
7.2 “Pull-down”	30
7.2.1 Purificación de las proteínas recombinantes	31
7.2.2 Transcripción/ traducción in vitro	33
7.2.3 Ensayos de interacción por “pull-down”:.....	33
VIII. DISCUSIÓN	36
IX. CONCLUSIONES	38
X. PERSPECTIVAS	38
XI. ANEXOS	40
11.1 Búsqueda de proteínas que interaccionen con p18 ^(Hamlet)	40
11.2 Traducción del bicistrón p8-p18 ^(Hamlet) <i>in vitro</i>	42
XII. BIBLIOGRAFÍA	44
XIII. APÉNDICES	50

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cruzas y cotransformaciones.....	24
Tabla 2. Geles de SDS-PAGE	31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Agentes que dañan al DNA y mecanismos generales de reparación..	2
Figura 2. Reparación por escisión de nucleótidos.	3
Figura 3. Transcripción mediada por la RNA pol II.	4
Figura 4. Resumen de las actividades de las distintas subunidades de TFIIH	5
Figura 5. Modelo tridimensional de la organización cuaternaria de TFIIH humano.	6
Figura 6. Síndromes en humanos asociados a mutaciones en algunas subunidades de TFIIH.....	8
Figura 7. Alineamiento de las secuencias de p8 y p18 ^(Hamlet) de <i>Drosophila</i> con sus homólogos en otros eucariotas.	11
Figura 8. p8 y p18 ^(Hamlet) están codificadas en un mismo RNAm.	11
Figura 9. Detección de p18 ^(Hamlet) por western blot.....	12
Figura 10. Fenotipos durante el desarrollo asociados con mutaciones en la subunidad p52 de TFIIH en <i>Drosophila</i>	13
Figura 11. Colocalización de p18 ^(Hamlet) y XPD en cromosomas politénicos.....	14
Figura 12. Estrategia experimental para obtener DNA recombinante.	16
Figura 13. Estrategia experimental para los ensayos de doble híbrido de levadura.....	17
Figura 14. Esquema de la estrategia experimental para los ensayos de “pull-down”..	18
Figura 15. Siembra en SD/-Trp (A) o SD/Leu (B).....	26
Figura 16. Siembra en SD/-Trp/-Leu.....	26
Figura 17. Siembras en SD/-Trp/-Leu/-His.....	27
Figura 18. Siembras en TDO con 3-AT.	28
Figura 19. Siembras en SD/-Trp/-Leu/-Ade.....	28
Figura 20. Siembras en (A) QDO y (B) QDO con X- α -Gal.	29
Figura 21. Ensayo de actividad β -galactosidasa.....	30
Figura 22. Purificación de GST y proteínas de fusión a GST.....	32
Figura 23. Autoradiografía de p8, p18 ^(Hamlet) y p52 transcritas y traducidas <i>in vitro</i> ...	33

Figura 24. ^{35}S -p8 interacciona con GST-p52 y a GST-p18 ^(Hamlet)	34
Figura 25. ^{35}S -p18 ^(Hamlet) interacciona con GST-p8 y GST-p52.....	34
Figura 26. ^{35}S -p52 interacciona con GST-p8 y GST-p18 ^(Hamlet)	35
Figura 27. Autoradiografía de “pull-down” contra ^{35}S -“mock”	36
Figura 28. p18 ^(Hamlet) interacciona con la Psn a través del sistema de doble híbrido de levadura	41
Figura 29. p18 ^(Hamlet) interacciona con la Psn a través de ensayos de “pull-down”.	42

ABREVIATURAS

AD	“activation domain”
CAK	“cyclin activating kinase”
cdk7	“cyclin depending kinase 7”
CS	síndrome de Cockayne
CSA y CSB	CS grupo de complementación A y B
CTD	“carboxi terminal domain”
cycH	ciclina H
DNA	“desoxiribonucleic acid”
DNA BD	“GAL4 DNA binding domain”
GGR	“global genome repair”
GST	glutation-S-transferasa
hHR23B	“human homologue of RAD23”
Kan	Kanamicina
kDa	Kilodaltones
KLH	Keyhole Lymphet Hemocyanine
kv	kilovolts
MAT1	“ménage à trois1”
MMR	“Mismatch repair”
<i>mrn</i>	gen marionette
ms	milisegundos
ng	nanogramos
°C	grados centígrados
PBS	“phosphate-buffered saline”
PBS-T	PBS con tritón al 1%
PCR	“polymerase chain reaction”
Psn	Preseñilina
REB	reparación por escisión de base
REN	reparación por escisión de nucleótidos
RNA pol II	RNA polimerasa II
RNAm	“messenger ribonucleic acid”
RT-PCR	“reverse transcriptase PCR”
SDS-PAGE	“sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis”
SEF	“serrated early flowering”
TBP	“TATA binding protein”
TCR	“transcription coupled repair”
TFIIH	factor de transcripción asociado a la RNA polimerasa II
TTD	tricotiodistrofia
TTD-A	TTD grupo de complementación A
U.V	ultravioleta
W.B	Western Blot
wt	“wild type”
XP	xeroderma pigmentosum
XPA, XPB, XPC, XPD, XPF y	XP grupo de complementación A, B, C, D, F y G

I. INTRODUCCIÓN

El DNA es el material genético de todos los seres vivos. La estructura del DNA proporciona las bases químicas para almacenar y expresar la información genética en las células, así como para transmitirla a generaciones futuras (Klug W. y Cummings M., 1999). Por ello, cuando Watson y Crick descubrieron la estructura del DNA en 1953 (Watson y Crick, 1953), se pensó que esta debía ser una molécula muy estable. Sin embargo, más de 50 años de investigación han revelado que el DNA es muy susceptible a daño ya que está expuesto continuamente a agentes dañinos tanto ambientales (radiación U.V, químicos, etc.) como endógenos (metabolitos oxidativos), e incluso, a errores durante la replicación, afectando en todos los casos procesos esenciales del DNA, tales como la replicación y la transcripción. Esto es relevante, debido a que el daño en el DNA puede inducir mutaciones, lo cual finalmente resulta en defectos genéticos o contribuye a carcinogénesis y envejecimiento (Vermeulen *et al.*, 2000). Para contrarrestar tales efectos, la evolución ha equipado a todos los organismos con un conjunto de maquinarias de reparación, que se encargan de eliminar el daño y mantener la integridad del genoma (Hoeijmakers, 2001).

En general los mecanismos de reparación se clasifican en función del tipo de daño a reparar (Fig. 1). La reparación por escisión es una de las estrategias generales empleadas por células procariotas y eucariotas para reparar múltiples tipos de daños en las bases del DNA, mediante la eliminación de el o los nucleótidos dañados, a través de alguno de los siguientes mecanismos:

- La reparación por escisión de base (REB) corrige bases que alteran la secuencia del DNA, pero no distorsionan la estructura global de la doble hélice, por ejemplo, bases dañadas por oxidación, alquilación, hidrólisis o desaminación (Cooper y Fuss, 2006; Oh *et al.*, 2007).
- “Mismatch repair” (MMR) remueve específicamente bases apareadas incorrectamente que se originan por errores durante la replicación (Cooper y Fuss, 2006; Oh *et al.*, 2007).
- La reparación por escisión de nucleótidos (REN) (Fig. 2) remueve las lesiones provocadas por algunos agentes mutagénicos, por ejemplo, el benzopireno y la radiación ultravioleta, la cual induce principalmente la formación de

fotoproductos que modifican la estructura helicoidal de la molécula de DNA (dímeros de ciclobutano pirimidina y 6-pirimidina-4-pirimidona) (Cooper y Fuss, 2006; Oh *et al.*, 2007).

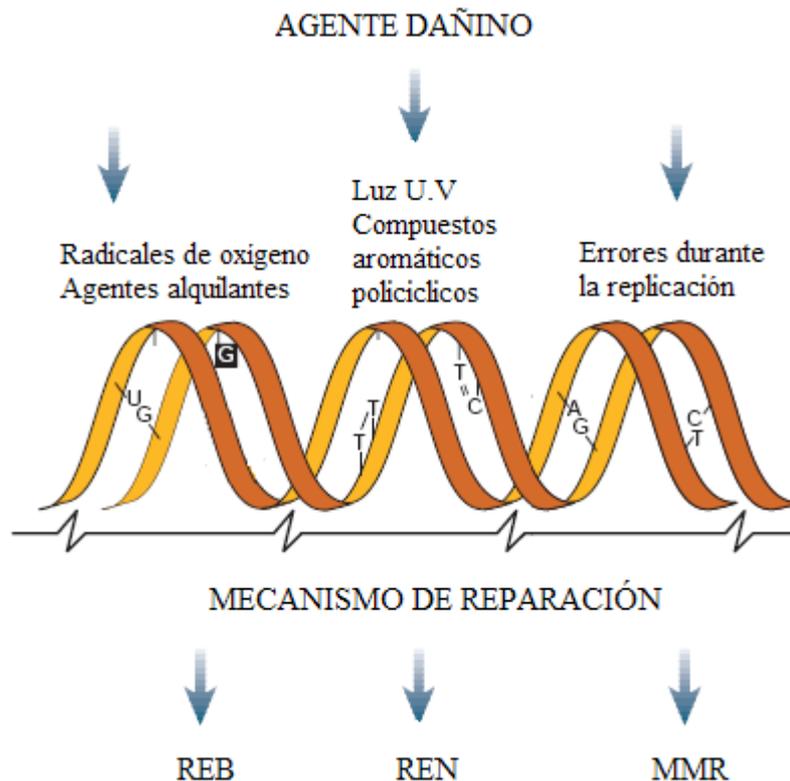


Figura 1. Agentes que dañan al DNA y mecanismos generales de reparación. REB: corrige bases alteradas que no afectan la estructura del DNA. REN: corrige daños estructurales en el DNA. MMR: corrige bases apareadas incorrectamente (editado de Hoeijmakers, 2001).

La REN resulta de particular interés para este trabajo, debido a que el factor de transcripción y reparación IIIH (TFIIH) está involucrado en este proceso, por ello, a continuación se describe con más detalle.

1.1 Reparación por escisión de nucleótidos

La REN puede dividirse en dos clases a partir del lugar en donde ocurre la reparación (Fig. 2); cuando es en regiones de DNA que no se están transcribiendo se denomina reparación global del genoma (“global genome repair”, GGR); cuando es en regiones de DNA que se están transcribiendo se denomina reparación acoplada a la transcripción (“transcription coupled repair”, TCR). La REN se describe por una secuencia de cinco pasos: reconocimiento del daño, desenrollamiento y apertura de la doble hélice mediada por TFIIH, incisión en ambos lados de la lesión, escisión del oligonucleótido que

contiene el daño, y por último síntesis de DNA y ligación (Cooper y Fuss, 2006). La GGR y la TCR difieren en la forma en que se reconoce el daño, debido a que durante la TCR las lesiones provocadas por la radiación U.V en el DNA bloquean directamente la elongación por la RNA polimerasa II (RNA pol II), y esto recluta a las enzimas reparadoras, sin embargo, los pasos subsiguientes de la TCR suceden de forma similar a la GGR, cuyo resultado es un templado sin lesión adecuado para la transcripción (Fig. 2) (Cooper y Fuss, 2006).

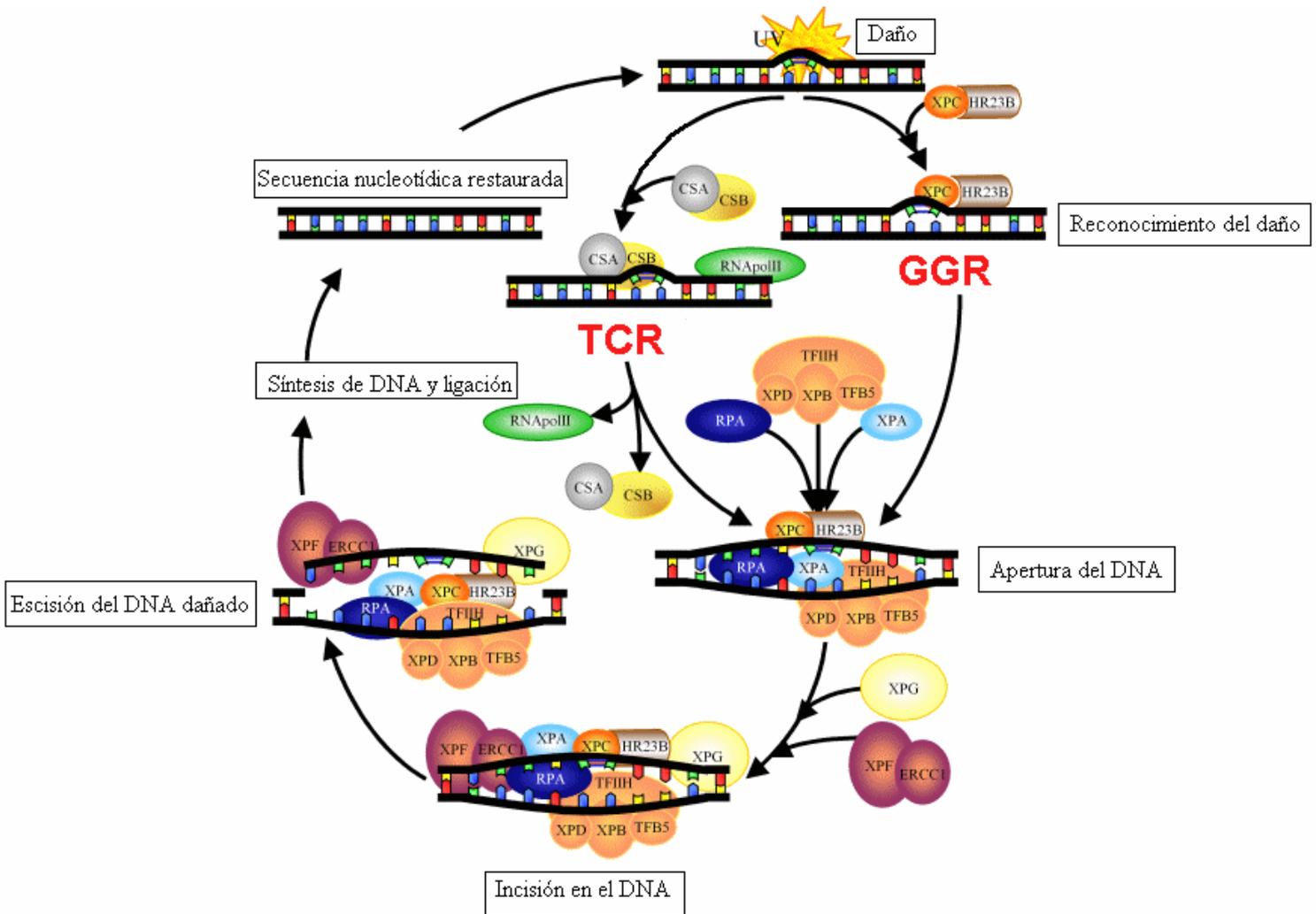


Figura 2. Reparación por escisión de nucleótidos. Durante la GGR, XPC y hHR23B reconocen una distorsión en la hélice de DNA; XPC recluta a TFIIH cuyos componentes XPB y XPD, son helicasas/ATPasas que desenrollan el DNA alrededor de la lesión hasta formar una burbuja de aproximadamente 30 nucleótidos estabilizada por RPA y XPA. Las endonucleasas XPG y XPF/ERCC1 liberan el fragmento que contiene el DNA dañado; la DNA polimerasa llena el espacio vacío resultante y por último una DNA ligasa cierra el corte, con lo cual restaura la cadena dañada. Durante la TCR las proteínas CSA y CSB, son las encargadas de reconocer a la RNA pol II varada y reclutar a las enzimas reparadoras (Cooper y Fuss, 2006). XPA, XPB, XPC, XPD, XPF y XPG: xeroderma pigmentosum (XP) grupo de complementación A, B, C, D, F y G

respectivamente. CSA y CSB: síndrome de Cockayne (CS) grupo de complementación A y B respectivamente (editado de <http://ccr.coriell.org>).

La REN, en ambos casos, requiere de la acción concertada y coordinada de aproximadamente 25 proteínas (Giglia-Mari *et al.*, 2006), entre las cuales se encuentran algunas proteínas de TFIID, este es un componente central de la maquinaria de la REN en cualquiera de sus dos versiones y es parte importante también de la maquinaria de transcripción basal (Cooper y Fuss, 2006) según se describe a continuación.

1.2 Papel de TFIID durante la transcripción

Durante el inicio de la transcripción (Fig. 3) TFIID es responsable de la apertura del DNA alrededor del promotor a través de sus subunidades XPD y XPB, además, a través de la subunidad cdk7, TFIID se encarga de la fosforilación del dominio carboxilo terminal (“cáboxi terminal domain”, CTD) de la subunidad mayor de la RNA polimerasa II (RNA pol II). Esto permite el escape de la polimerasa del promotor, el reclutamiento de las enzimas que procesan el RNAm y la transición entre la iniciación y la elongación (Lainé *et al.*, 2006).

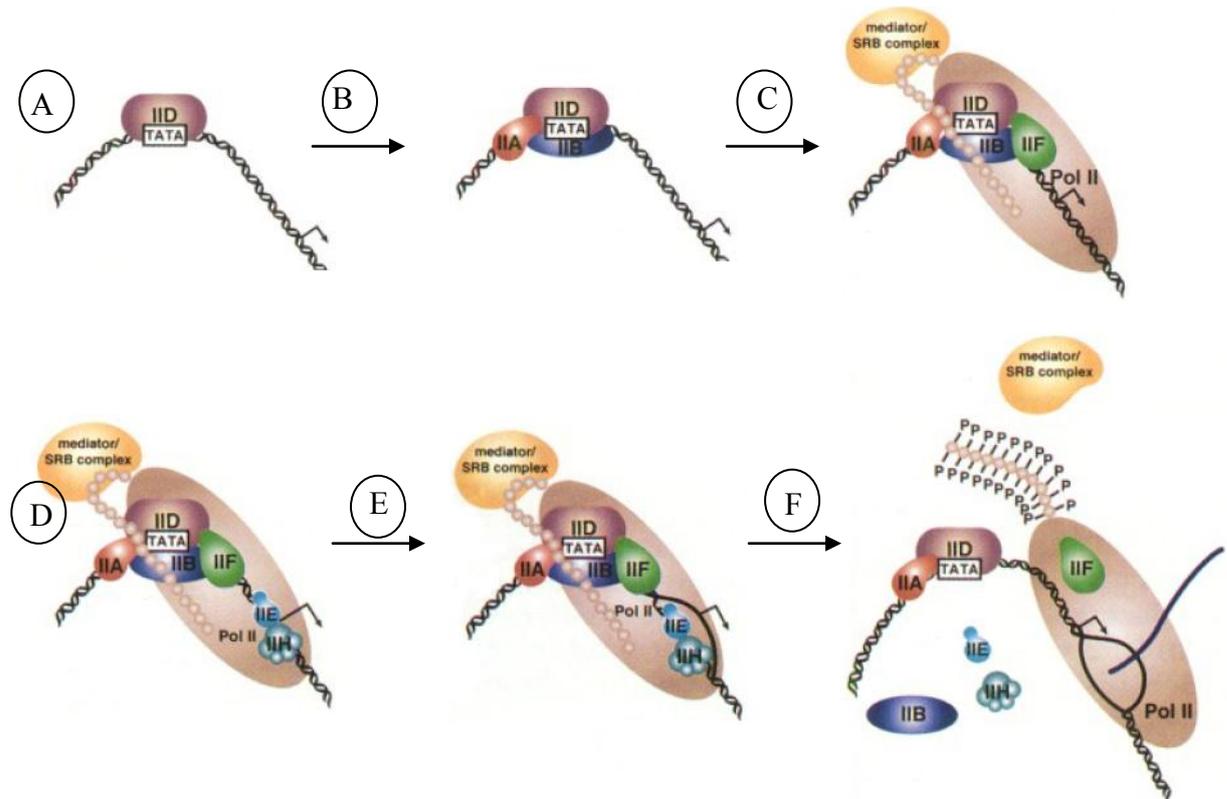


Figura 3. Transcripción mediada por la RNA pol II. **A:** Durante el inicio de la transcripción TBP, un componente de TFIID, se une a la caja TATA del promotor blanco. **B:** Posteriormente se unen TFIIA y TFIIB. **C:** Se recluta al complejo mediador y a TFIIB, este último funciona como anclaje para la RNA polimerasa que es reclutada en

conjunto con TFIIF. **D.** Finalmente se une TFIIE y este recluta a TFIIH. **E y F.** TFIIH abre el DNA alrededor del promotor y fosforila el CTD de la RNA pol II, con lo cual esta escapa del promotor e inicia la elongación (editado de Orphanides *et al.*, 1996).

La multifuncionalidad de TFIIH lo convierte en un blanco de investigación muy interesante y gracias a ello, actualmente se cuenta con una descripción más o menos detallada de las funciones de algunas de sus subunidades durante los procesos mencionados, según se describe en las secciones siguientes.

1.3 Composición y organización estructural de TFIIH

TFIIH está constituido por diez proteínas (Fig. 4) que se dividen en dos subcomplejos unidos por la proteína XPD (xeroderma pigmentosum grupo de complementación D): el “core” está compuesto por XPB (xeroderma pigmentosum grupo de complementación B), p8 (también llamada TTDA), p34, p44, p52 y p62, y el subcomplejo CAK (“cyclin activating kinase”) formado por cdk7 (kinasa dependiente de ciclina), cycH (ciclina H) y MAT1 (“ménage à trois1”) (Giglia-Mari *et al.*, 2006).

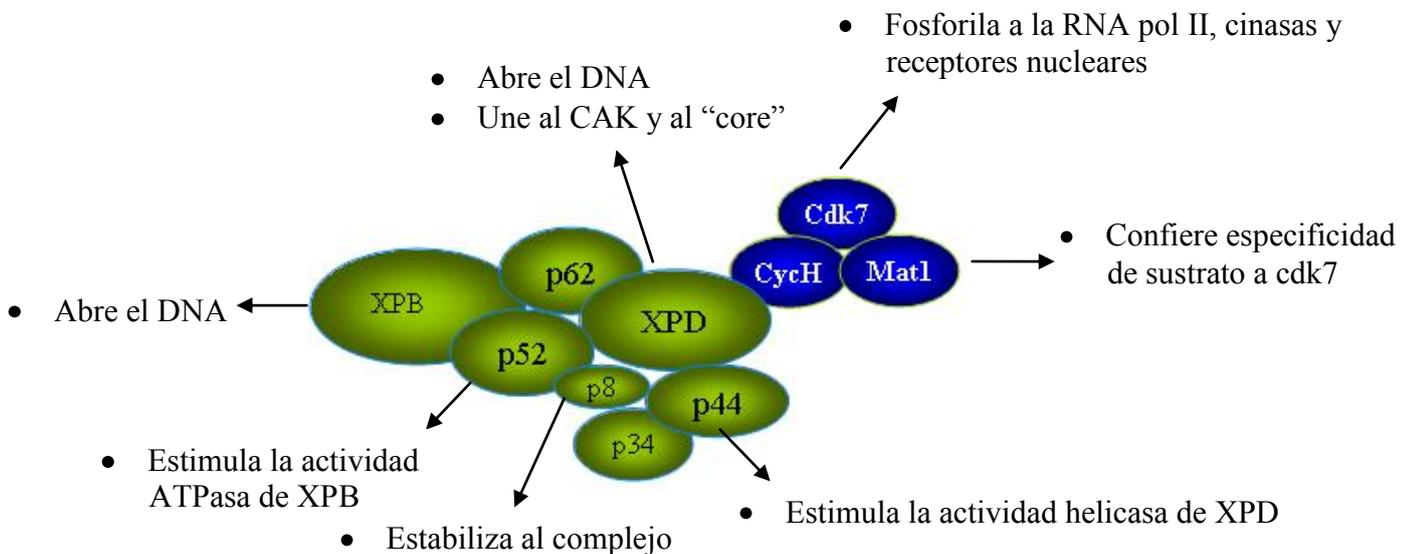


Figura 4. Resumen de las actividades de las distintas subunidades de TFIIH (editado de Egly, 2001).

Las secuencias de las 10 subunidades de TFIIH están conservadas desde levadura hasta humano (Svejstrup *et al.*, 1996), y esto se refleja en la conservación de la estructura y la funcionalidad del complejo entre estos dos organismos (Schultz *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2000; Takagi *et al.*, 2003). El análisis de TFIIH a través de

microscopía electrónica sugiere que éste está organizado en forma de anillo, con un hueco cuyo tamaño es capaz de acomodar una molécula de DNA de doble hebra (Fig. 5) (Schultz *et al.*, 2000). Lo cual es coherente con las funciones atribuidas a TFIIH, durante la REN y durante la transcripción.

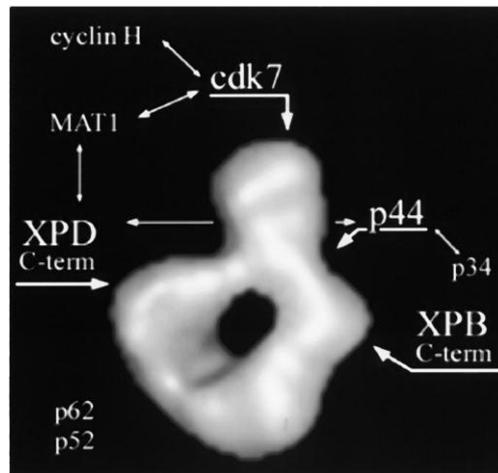


Figura 5. Modelo tridimensional de la organización cuaternaria de TFIIH humano. La posición de cdk7, p44, XPB y XPD determinadas mediante microscopía se indican con flechas, mientras que MAT1, cycH y p34 están posicionadas tentativamente en el modelo de acuerdo a estudios de interacción previamente reportados. Por otra parte, se desconoce la posición de p52 y p62 en este modelo (tomado de Schultz *et al.*, 2000).

1.4 TFIIH: un complejo multifuncional

En las secciones anteriores se describió de manera general, la participación de TFIIH durante la REN y la transcripción basal, a continuación se describen las funciones identificadas para cada subunidad en el complejo.

Actualmente se conocen algunas funciones de las distintas subunidades de TFIIH, se han identificado actividades enzimáticas en algunas de ellas, y por el contrario, se considera que la mayor parte de estas tienen un papel más bien regulador o estructural (Tirode *et al.*, 1999). Las subunidades mejor caracterizadas son XPD y XPB, dos DNA helicasas/ATPasas de polaridad opuesta (5'-3' y 3'-5', respectivamente). Coin y colaboradores (2007) reportaron que durante la REN se requiere de la actividad helicasa de XPD, en combinación con la actividad ATPasa de XPB, para la apertura del DNA alrededor del daño (Winkler *et al.*, 2000; Coin *et al.*, 2007). Por el contrario Tirode y colaboradores (1999) reportaron que XPB es esencial en la apertura del DNA del promotor durante la transcripción y que XPD es dispensable en este proceso

(Winkler *et al.*, 2000; Tirode *et al.*, 1999). Takagi y colaboradores (2005) reportaron que p44 posee una secuencia consenso de “E3 RING ubiquitin ligase”, cuya actividad *in vitro* parece ser estimulada por otra de las subunidades del “core” de TFIIH, p34, pero cuyos blancos no han sido identificados (Takagi *et al.*, 2005). p44 regula además la actividad helicasa de XPD, permite la incorporación de la subunidad p62 a TFIIH y está involucrada en el escape de la RNA pol II del promotor durante el inicio de la transcripción (Tremeau-Bravard *et al.*, 2001). Por otro lado la actividad cinasa de cdk7 está regulada por las otras dos proteínas del CAK de TFIIH, cych y MAT1 (confiere especificidad por el sustrato de fosforilación de cdk7). cdk7 fosforila la serina cinco del heptapéptido repetido “Thy-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser” de la subunidad mayor de la RNA pol II y fosforila también a diversas cinasas dependientes de ciclina que controlan el ciclo celular, y a algunos receptores nucleares y factores transcripcionales (Busso *et al.*, 2000). Jawhary y colaboradores (2002) reportaron que la subunidad p52 favorece la interacción del complejo ternario p34/p44/p62 con XPB y es responsable del anclaje de esta última proteína al “core” de TFIIH. Se identificaron dos dominios en p52, uno de los cuales interactúa con XPB mientras que el otro es una región muy conservada crucial para la estabilidad de TFIIH, a partir de esta observación se propuso que este dominio de p52 podía poseer una estructura tridimensional que “encierra” a XPB dentro de TFIIH (Jawhary *et al.*, 2002). Coin y colaboradores (2006) reportaron que p52 interactúa también con p8 y con XPD *in vitro*. Aunado a esto, demostraron que p8 funciona en reparación al estimular primero la apertura del DNA por las helicasas XPD y XPB, y después la escisión por las endonucleasas XPG y XPF (Coin *et al.*, 2006).

1.5 Mutaciones en algunas subunidades de TFIIH están asociadas a enfermedades en humanos.

Dada la multifuncionalidad del complejo, mutaciones en algunos de los componentes de TFIIH se asocian con tres síndromes de fotosensibilidad en humanos (Fig. 6): xeroderma pigmentosum (XP) (Fig. 6A) caracterizado por engrosamiento y cambios en la pigmentación de la piel, una alta incidencia de cáncer en regiones del cuerpo expuestas al sol (Cooper y Fuss, 2006) y síndromes neurológicos como retraso mental, ataxia y sordera (Coin *et al.*, 2006); síndrome de Cockayne (CS) (Fig. 6B) caracterizado por retraso mental, envejecimiento prematuro y sensibilidad a la luz solar, pero sin desarrollo de cáncer en la piel (Cooper y Fuss, 2006); tricotiodistrofia (TTD) (Fig. 6C)

caracterizado por cabello frágil deficiente de proteínas ricas en azufre, caries, ictiosis, anomalías en el esqueleto y retraso mental progresivo (Coin *et al.*, 2006).



Figura 6. Síndromes en humanos asociados a mutaciones en algunas subunidades de TFIH. **A.** Xeroderma pigmentosum (XP), **B.** Síndrome de Cockayne (CS) y **C.** Trichotiodistrofia (TTD) (Lehman, 1996).

XP es producto de defectos en la GGR, mientras que el CS y la TTD se atribuyen a defectos en la transcripción y en la TCR. La mayoría de los individuos con estos síndromes presentan mutaciones en XPD y en algunos casos en XPB, las dos helicasas de TFIH. Además, reportes recientes indican que también la proteína p8 está implicada en un tipo de TTD denominado TTD-A (TTD grupo de complementación A) (Giglia-Mari *et al.*, 2004). Este síndrome resulta particularmente interesante ya que las mutaciones en cualquiera de los tres genes (*XPB*, *XPD* o *p8*) causan una disminución mayor al 70% en la concentración celular de TFIH (Coin *et al.*, 2006). Un mecanismo que explica el fenotipo celular de la TTD es que una mutación que afecta a una subunidad provoca la inestabilidad del complejo. Coin y colaboradores (2006) demostraron que al silenciar la expresión de p8 se reduce la concentración intracelular de TFIH, mientras que la sobreexpresión de p8 es capaz de restaurar el nivel normal de TFIH tanto en células TTD-A como en células TTD mutadas en el gen *XPD*. En contraste, la sobreexpresión de XPD en células TTD-A no tiene efecto alguno en el nivel de TFIH. Estos resultados definen a p8 como el regulador clave del nivel celular de TFIH (Giglia-Mari *et al.*, 2004) probablemente al estabilizar al complejo o al protegerlo de degradación proteolítica (Giglia-Mari *et al.*, 2006).

El estudio de las distintas subunidades de TFIH y la reciente identificación de p8 como la subunidad encargada de regular su concentración celular, proporcionó

información esencial para entender el mecanismo molecular de algunas de las funciones de este complejo de transcripción y reparación. Así pues, el estudio de TFIIH, sus componentes y su posible interacción con otras proteínas pueden proporcionar conocimientos útiles para elucidar las bases moleculares de las enfermedades relacionadas con las deficiencias en la reparación y transcripción del DNA, esto es relevante debido a que tales conocimientos incrementan las posibilidades de desarrollo de terapias para tratar los síntomas de dichas enfermedades.

II. ANTECEDENTES

2.1 *Drosophila* como modelo de estudio de enfermedades en humanos

Actualmente se sabe que las vías requeridas para el desarrollo están altamente conservadas entre la mosca y el humano y que a pesar de la divergencia evolutiva cuando estas vías se ven afectadas en ambos organismos, frecuentemente se observan defectos semejantes. Aproximadamente el 70% de los genes relacionados con enfermedades en humanos tienen su homólogo en el genoma de *Drosophila*. Así pues, la utilidad de *Drosophila* como organismo modelo para el estudio de enfermedades genéticas humanas está bien documentada (Reiter *et al.*, 2001).

Usando a *Drosophila* como modelo, en nuestro grupo estamos estudiando procesos fundamentales de la transcripción y la reparación del DNA, y la relación que hay entre los defectos en estos procesos y algunas enfermedades en humanos. El enfoque principal es entender el papel de TFIIH durante estos procesos. Los homólogos de los diez componentes de TFIIH están presentes en la mosca, y de hecho, algunos de estos han sido caracterizados en nuestro grupo (Reynaud *et al.*, 1999; Merino *et al.*, 2002; Fregoso *et al.*, 2007). Actualmente estamos caracterizando nuevos factores que podrían interaccionar con TFIIH y que podrían estar involucrados en la transcripción y la reparación del DNA.

2.2 En *Drosophila* la subunidad p8 de TFIIH está codificada en un bicistrón

Recientemente se reportó el descubrimiento, en levadura y en humano, de la subunidad p8 o TTDA de TFIIH (Ranish *et al.*, 2004; Giglia-Mari *et al.*, 2004). Se trata de una

proteína de 72 aminoácidos que está conservada en todos los eucariotas (Fig. 7A). Al analizar la secuencia del genoma de *Drosophila* encontramos al homólogo de p8 y descubrimos que éste está codificado en un transcrito bicistrónico que también codifica otra proteína de 150 aminoácidos que posee un dominio de dedo de zinc de tipo HIT, no caracterizada en la mosca, que también está conservada en eucariotas (Fig. 7B). Los homólogos a esta última proteína en humano, *Arabidopsis* y *Saccharomyces* han sido previamente identificados como ZnF-HIT1/p18^(Hamlet), SEF/*AtSWC6* y SWC6 respectivamente (Mizuguchi *et al.*, 2004; Cai *et al.*, 2005; March-Díaz *et al.*, 2007; Choi *et al.*, 2007; Cuadrado *et al.*, 2007). Esta proteína forma parte de un complejo remodelador de cromatina denominado SRCAP (en humano) y SWR1 (en levadura y *Arabidopsis*), estos complejos catalizan el reemplazo de la histona H2A por la variante H2A.Z/Htz1 (Krogan, 2003; Mizuguchi *et al.*, 2004), lo cual repercute en la expresión de los genes blanco. En *Arabidopsis* esta proteína es importante para el desarrollo normal vegetativo y reproductivo de la planta, dado que plantas homocigas para alelos nulos de SEF/*AtSWC6* presentan anomalías en el desarrollo de diversos órganos como hojas y flores. Por otra parte, Cuadrado y colaboradores (2007) reportaron que células humanas p18^(Hamlet) funciona como coactivador de p53 durante la transcripción de algunos genes pro-apoptóticos (NOXA y PUMA) inducidos por estrés con radiación U.V o cisplatino. p18^(Hamlet) también participa en la detención del ciclo celular en respuesta a radiación γ , a través de la activación dependiente de p53, de p21^{Cip}, un inhibidor del ciclo celular (Cuadrado *et al.*, 2007; Lafarga *et al.*, 2007).

A

	* . ** :::.** .: *:: ::: . . :::*:	
Humano	MVNVLKG-VLIECDPAMKQFLLYLDEANALGKKFIIQ-	36
Drosophila	MVNVMMG-VLVECDPAMKQFLLHLDEKLALGRKFIIQ-	36
Arabidopsis	MVNSIKG-VFISCDVPMAQFIAHLNNSLPASQKFIIQV	37
Saccharomyces	MPRAQKGLLLVECDPTVKQLILNMDEQSP-G--IVIE-	34
	.:* ::: : : : : : : : : :	
Humano	-DIDDTHVVFVIAELVNVLQERVGELMDQNAFSLTQK--	71
Drosophila	-DLDENHLFISTDIVEVLQARVDDLMDRISFPLHDKDA	73
Arabidopsis	LKLDTTSMFVKPYAEEMIRDAVIKFRDENSYAKAN---	72
Saccharomyces	-EIDEERLLVNESRLEQVKAELERRLEENTYQVEE---	68

B

	: : : . : : * * * : * *	
Humano	----MVEKKTSVRSQDPGQRRVLDRAARQRR---INRQLEALELNDNFQDDPHAGLPQLGK	53
Drosophila	----MTGRESNRKDAEKKRVLDSTARQRR---ARKALEALEQDNYHDDPHADL-VMSK	51
Saccharomyces	-MFVTPIEHAVQKRKQKQKRSVVDVTRERQ---LKRNLADLEKDNFSD-----I	46
Arabidopsis	MEEEMSNNRRVSNRTRKRVATKMAAALTSNDNRTOAAIARLEALELNDNGAIEVIDLNDDEEA	60
	: . * . * : ** * * : * * . * ..	
Humano	RLPQFDDD--ADTGKKKKKTR--GDHFKLRFKRN---FQALLEEQNLS--VAEGPNYLTA	104
Drosophila	KLPKFQDS--LKTGKEKKGKRKGAEYFLVKYRKN---FQQLLEED-----KDKQPNYESA	101
Saccharomyces	RFEIPKDL--LQRRVLPISVRR-----ILSSRKT---FVNYLDET-----PNSRYNTC	89
Arabidopsis	SLDEDDDLGYLQKKQHKGSKRKRTRQAKALEARKAPKSFLELLQEANLESLSHPVPTYLKA	120
 * * * * . * * * : * * * . : * * .	
Humano	CAGPPSRPQR-PFCVAVCGFPSPYTCVSCGARYCTVRCGLGTHQETRCCLKWTV	154
Drosophila	AAPAPQKPLR-HFCVAVCGNFSLYSCTACGTRYCCVRCLOTHQDTRCLKWTA	151
Saccharomyces	VAKPSYKPPR-KFCNVCGYWGKYACQNCGTSYCSKGCEVIHSETRCMKVYA	139
Arabidopsis	AVGPPSSSSRRYFCSVCGYIAGYNCCLCGMRFCISIRCQNIHKDTRCQKFVA	171

Figura 7. Alineamiento de las secuencias de p8 y p18^(Hamlet) de *Drosophila* con sus homólogos en otros eucariotas. **A.** Alineamiento de p8. **B.** Alineamiento de p18^(Hamlet). (*)aminoácidos idénticos; (:) aminoácidos similares. El recuadro señala un dominio de dedo de zinc tipo HIT en p18^(Hamlet).

Para corroborar la existencia del transcrito bicistrónico que codifica a p8 y a p18^(Hamlet) en *Drosophila*, se realizaron ensayos de RT-PCR (dato no presentado) y Northern Blot, utilizando sondas marcadas de DNA contra p8 (222 pb) y contra p18^(Hamlet) (456 pb) y en ambos casos se detectó un transcrito de aproximadamente 790 bases en un extracto de RNA de larvas (Fig. 8).

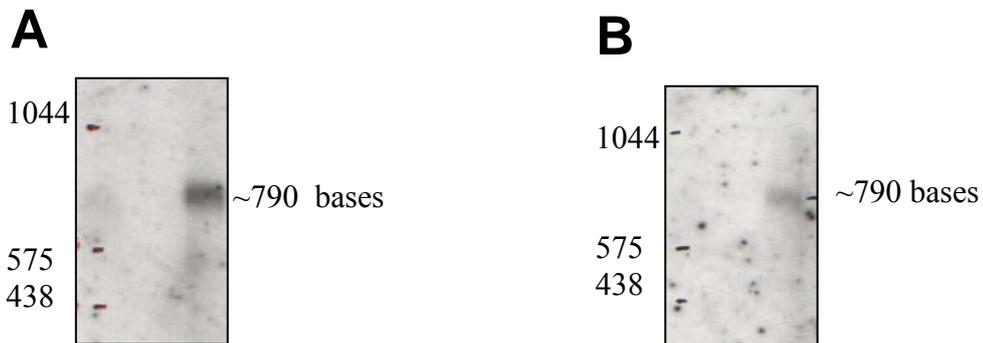


Figura 8. p8 y p18^(Hamlet) están codificadas en un mismo RNAm. A través de ensayos de Northern Blot, empleando sondas de DNA radioetiquetadas contra p18^(Hamlet) (**A**) y p8 (**B**) se identificó por autoradiografía un transcrito de ~790 bases que es muy similar al peso esperado del bicistrón (Dra. D. Montiel, 2004).

Considerando que el mensajero reconocido individualmente por ambas sondas es de el mismo tamaño, y a su vez, este es mayor que las secuencias de p8 o p18^(Hamlet) e incluso es muy aproximado al tamaño del bicistrón esperado de la suma de las dos

secuencias y una región intercistronica entre éstas (732 bases en total) se concluyó que p8 y p18^(Hamlet) están codificadas en un mismo RNAm (nuestros datos no publicados).

Una vez identificado el transcrito bicistrónico, se realizaron ensayos de Western Blot (W.B) para detectar a p18^(Hamlet) en extractos proteicos de moscas “wild type” (wt) y en extractos de moscas transgénicas, previamente diseñadas en el laboratorio, que sobreexpresan a p18^(Hamlet) fusionada a una etiqueta de myc (Fig. 9) y con ello se probó que p18^(Hamlet) está presente en la mosca.

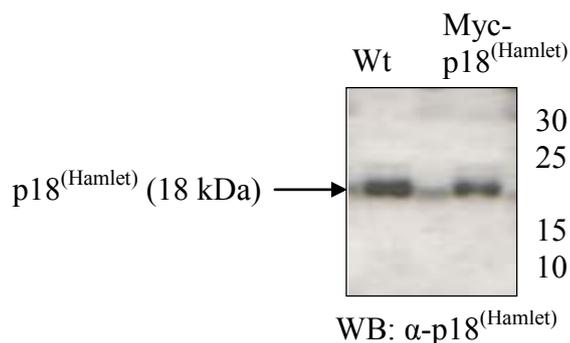


Figura 9. Detección de p18^(Hamlet) por western blot. El anticuerpo contra p18^(Hamlet) se obtuvo inmunizando conejos con un péptido específico de p18^(Hamlet) acoplado a KLH (Keyhole Lymphet Hemocyanine). Este se probó contra extractos de moscas wt y moscas transgénicas (Myc-p18^(Hamlet)), en los cuales detectó, en ambos casos, una proteína de un peso aproximado al de p18^(Hamlet) (18 kDa), (Dra. V. Valadez, 2006).

Existen varios ejemplos de transcritos bicistrónicos en eucariotas (Stallmeyer B. *et al.*, 1999; Andrews J. *et al.* 1996), incluida *Drosophila*, y en general se ha demostrado que las dos proteínas codificadas en un mismo RNA tienen funciones relacionadas (Andrews J. *et al.* 1996), esto sugiere que p18^(Hamlet) podría ser parte de o interactuar con TFIIH.

2.3 Mutaciones en la subunidad p52 de TFIIH en *Drosophila melanogaster* producen fenotipos que semejan a la TTD en humanos.

Recientemente reportamos que mutaciones en la subunidad p52 de TFIIH en *Drosophila*, producen fenotipos específicos durante el desarrollo semejantes a la TTD en humanos. Las moscas mutantes en esta subunidad son mas pequeñas, presentan defectos en la cutícula, así como quetas frágiles y deformes, comparadas con moscas “wild type” (Fig. 10), esto semeja el fenotipo minute y “bristle-bristle” de los individuos

con TTD. Estas moscas presentan además, tumores, inestabilidad cromosomal y esterilidad (Fregoso *et al.*, 2007).

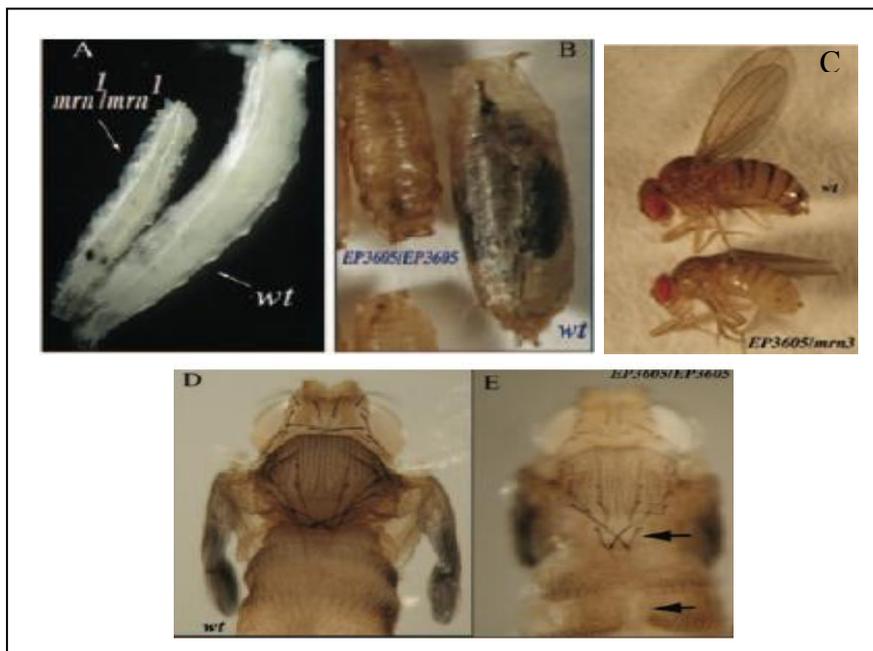


Figura 10. Fenotipos durante el desarrollo asociados con mutaciones en la subunidad p52 de TFIID en *Drosophila*. **A.** Larva de tercer instar homociga para un alelo mutante de p52 (*mrn¹/mrn¹*) y larva “wild type” (wt). **B.** Pupa homociga para un alelo mutante de p52 (*EP3605/EP3605*) y pupa wt. **C.** Mosca adulta heterocigica para p52 (*EP3605/mrn³*) y mosca wt. En A, B y C se observa un fenotipo minute en los organismos mutantes. **D** y **E.** Farato wt y farato homocigo para un alelo mutante de p52 (*EP3605/EP3605*). Los organismos mutantes presentan defectos cuticulares y quetas frágiles y deformes (tomado de Fregoso *et al.*, 2007).

Debido a que en la base de datos que corresponde al proyecto del interactoma de proteínas de *Drosophila* (Giot *et al.*, 2003) se reporta que al usar el sistema de doble híbrido de levadura, la proteína catalogada como CG31917.PA, que corresponde a p18^(Hamlet), interacciona con p52 contamos con mas elementos para suponer que p18^(Hamlet) puede ser parte de TFIID o interaccionar con este último bajo ciertas condiciones.

2.4 p18^(Hamlet) colocaliza con las subunidades p8 y XPD de TFIID en cromosomas politénicos.

Con la finalidad de obtener información sobre la posible interacción de p18^(Hamlet) con TFIID *in vivo*, en nuestro grupo, se realizaron coimmunotinciones en cromosomas politénicos de glándulas salivales de larvas de tercer instar de *Drosophila*, de p18^(Hamlet) con algunas subunidades del complejo. Dado que se ha reportado que tanto TFIID como

p18^(Hamlet) están involucrados en la respuesta a estrés por radiación ultravioleta (Cuadrado *et al.*, 2007; Lainé *et al.*, 2006), se utilizaron cromosomas politénicos de larvas irradiadas y sin irradiar. Se empleó un anticuerpo específico contra p18^(Hamlet) en combinación con un anticuerpo contra la subunidad XPD en cromosomas de larvas wt. En la figura 11 se observa la colocalización (en amarillo) de p18^(Hamlet) (en rojo) con XPD (en verde) en cromosomas de larvas wt después de irradiar con luz U.V. Lo mismo se observa en cromosomas de larvas sin irradiar y al coimmunoteñir con anticuerpos contra p18^(Hamlet) y XPB (datos no mostrados).

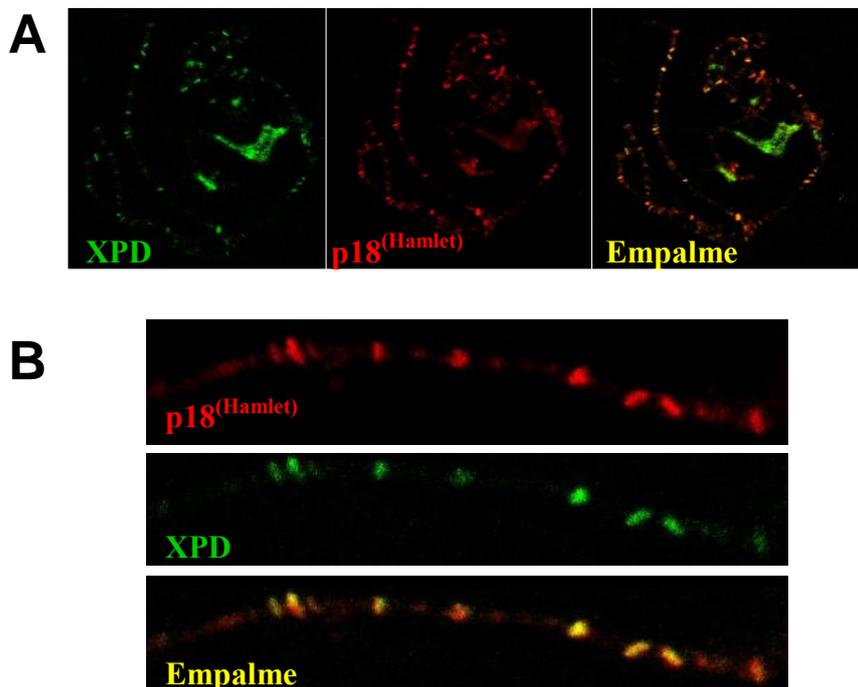


Figura 11. Colocalización de p18^(Hamlet) y XPD en cromosomas politénicos. **A.** p18^(Hamlet) (en rojo) colocaliza (en amarillo) con XPD (en verde) en cromosomas politénicos de larvas de tercer instar de *Drosophila* irradiadas con luz U.V. **B.** Acercamiento del panel A (Dra. V. Valadez, 2007).

III. HIPÓTESIS

Debido a que en el interactoma de proteínas de *Drosophila* se reporta que p18^(Hamlet) interacciona con p52, además, colocaliza con XPD y XPB en cromosomas politénicos y está codificada en un mRNA bicistrónico que también codifica a p8, es posible que p18^(Hamlet) interaccione físicamente con componentes de TFIID para regular las actividades de dicho factor durante la transcripción y reparación.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar si p18^(Hamlet) interacciona físicamente con las subunidades p8 y/o p52 de TFIIH.

4.2 Objetivos particulares

- Analizar la posible interacción *in vitro* entre p18^(Hamlet) y p8, y p18^(Hamlet) y p52, a través de ensayos de “pull-down”.
- Analizar la posible interacción *in vivo* entre p18^(Hamlet) y p8, y p18^(Hamlet) y p52, empleando el sistema de doble híbrido de levadura.

V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

5.1 DNA recombinante

El DNA recombinante es cualquier molécula de DNA compuesta de secuencias derivadas de diferentes fuentes u organismos (Lodish *et al.*, 2004). Esta tecnología permite expresar genes exógenos en distintos organismos, a través de la clonación del gen de interés en el vector de expresión adecuado para la célula hospedera. El esquema general de la estrategia experimental empleada para obtener las construcciones de DNA requeridas para ensayos de interacción proteica (sistema de doble híbrido de levadura y “pull-down”) se muestra en la figura 12. El DNA generado se empleó para expresar proteínas recombinantes de p8, p18^(Hamlet) y p52 de *Drosophila* en levaduras y bacterias.

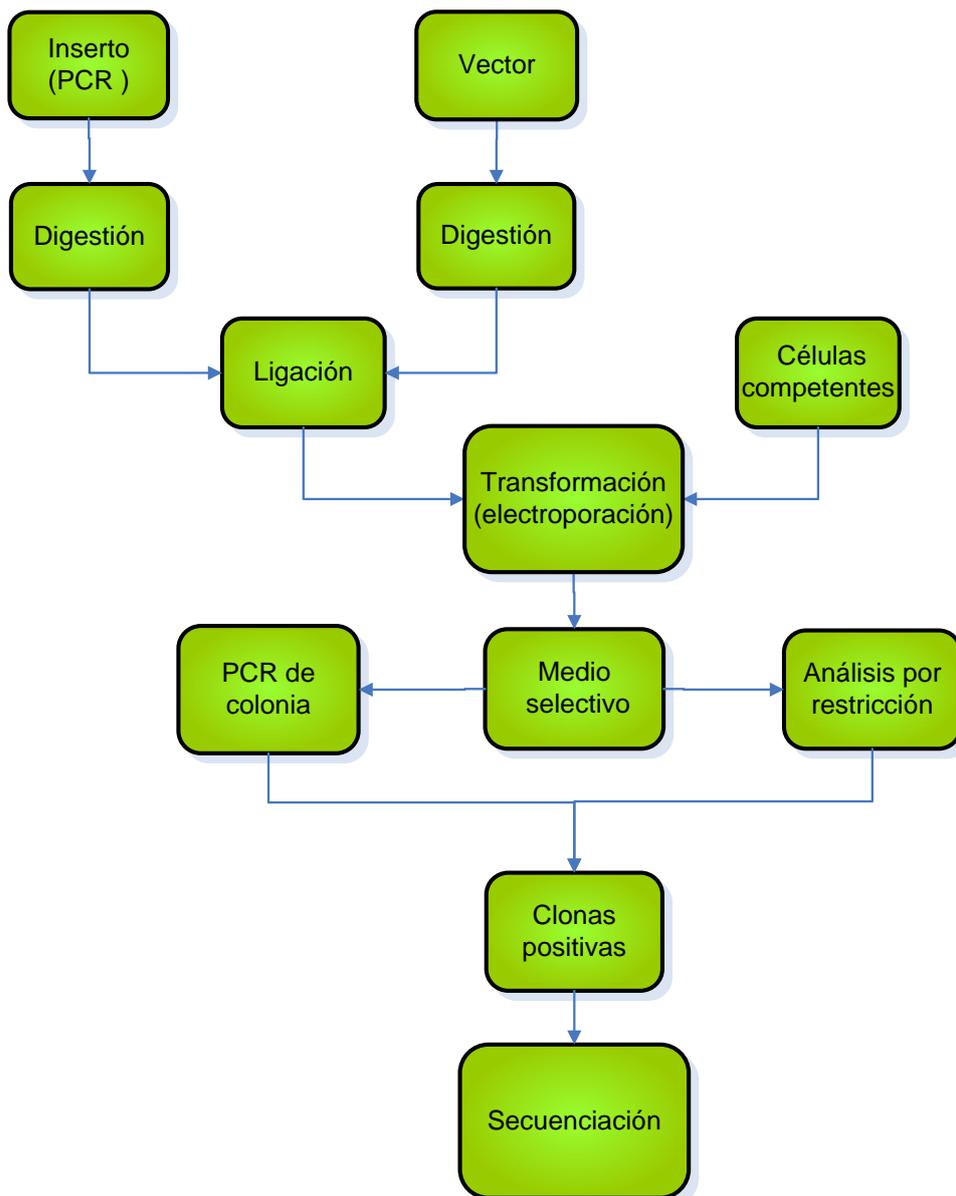


Figura 12. Estrategia experimental para obtener DNA recombinante.

5.2 Ensayo de doble híbrido de levadura

En este ensayo, un gen carnada se expresa como una fusión al dominio de unión al DNA de GAL4 (DNA “Binding Domain”, DNA-BD), mientras que otro gen o cDNA se expresa como fusión al dominio de activación de la transcripción de GAL4 (“Activation Domain”, AD). Cuando ocurre una interacción proteica entre los productos de estos genes, el DNA-BD y el AD de GAL4 se posicionan a una proximidad tal que activan la transcripción de cuatro genes reporteros: *HIS3* (codifica una proteína necesaria para la biosíntesis de histidina), *ADE2* (codifica una proteína necesaria para la biosíntesis de

adenina), *lacZ* (codifica la β -galactosidasa) y *MEL1* (codifica la α -galactosidasa) lo cual permite la identificación de la interacción proteica en clonas capaces de crecer en un medio selectivo astringente (véase sección 6.2.6), en el cual las colonias deben crecer y ser azules. La estrategia experimental empleada para realizar los ensayos de doble híbrido de levadura se muestra en la figura 13.

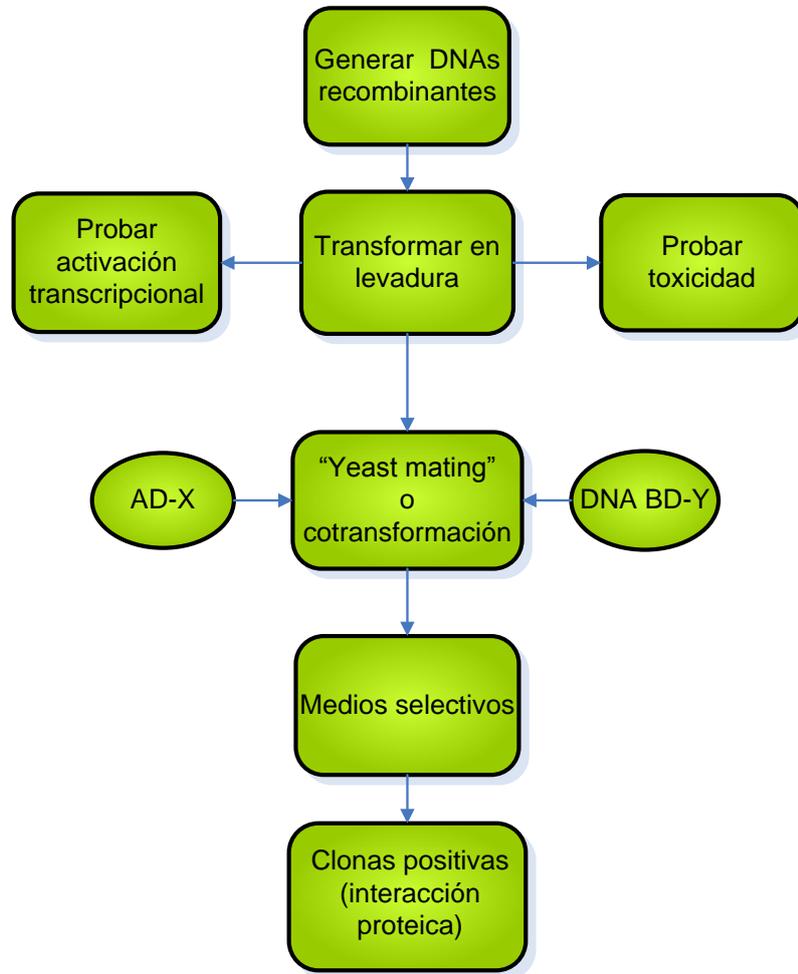


Figura 13. Estrategia experimental para los ensayos de doble híbrido de levadura. “X” y “Y” representan las proteínas de interés.

5.3 Ensayos de “pull-down”

Los ensayos de GST “pull-down” se han convertido en una herramienta valiosa para determinar la posible interacción física entre dos o más proteínas o para comprobar la interacción de éstas, predicha mediante alguna otra técnica experimental.

En los ensayos de “pull-down” una proteína carnada, se expresa en bacterias como una fusión a GST y se purifica por cromatografía de afinidad con una resina de

glutación agarosa, mientras que las proteínas blanco pueden provenir de diversas fuentes, como lisados celulares o productos de traducción *in vitro* marcados o no radioactivamente. En la figura 14 se muestra la estrategia que se utilizó para los ensayos de “pull-down”.



Figura 14. Esquema de la estrategia experimental para los ensayos de “pull-down”.

VI. METODOLOGÍA

A continuación se presenta un bosquejo de las metodologías empleadas en cada paso de los procedimientos ilustrados en la sección de estrategia experimental descrita.

6.1 Generación de DNA recombinante

Se emplearon los plásmidos pGADT7, pGBKT7 (MATCHMARKER GAL4 Two Hybrid System 3, CLONTECH Laboratories, Inc.), pGEX4T-1 (Pharmacia), pQE30, pQE60 (Invitrogen) y pBluescript (Stratagene) para las distintas clonaciones. Se diseñaron oligonucleótidos (véase apéndice A) en cuyas secuencias se incluyeron los sitios de restricción requeridos para clonar en fase el gen de interés en el vector adecuado. El DNA de los insertos se obtuvo como producto de PCR (“Polymerase chain reaction”) y al igual que el DNA plasmídico se digirió con las enzimas correspondientes para cada construcción. Las reacciones de ligación se diseñaron para una proporción molar inserto:vector de 5:1, partiendo de 100ng de vector. Antes de transformar, se eliminaron las sales de la ligación a través de lavados con butanol. Todas las transformaciones se realizaron por electroporación de células DH5 α de *E.coli* (un pulso de 1.8kV durante 5.9ms). Las transformantes se sembraron en placas de medio LB con el antibiótico adecuado y se incubaron a 37°C. En todos los casos se analizaron por PCR un promedio de 10 colonias de la población total obtenida de cada transformación. Se realizaron minipreps (Sambrook *et al.*, 1989) de clonas que resultaron positivas en este ensayo. El DNA plasmídico obtenido se digirió de tal manera que el resultado fuese la liberación del fragmento de interés clonado en cada vector y/o un patrón de restricción definido que permitiese identificar a la clona como positiva. Finalmente el DNA de una clona positiva para cada caso, se secuenció en la unidad de secuenciación del IBT-UNAM y el análisis de las secuencias se realizó utilizando los softwares Enzymex, DNA strider y 4 peaks.

6.2 Doble Híbrido de levadura

6.2.1 Transformación y cotransformación en levadura: Se prepararon y transformaron células competentes de las cepas AH109 (MAT a) y/o Y187 (MAT α) de *S. cerevisiae* empleando el protocolo de acetato de litio (según se describe en BD MatchmakerTM Library Construction and Screening Kits User Manual, BD Biosciences Clontech, 2002). Las células se recuperaron con YPD 2X líquido (para 1L: 40g de peptona, 20g de extracto de levadura y 50mL de glucosa al 40%, pH=6.5) y finalmente se resuspendieron en NaCl al 0.9%. Se sembró en medio mínimo (Para 1L: 6.7g de base nitrogenada para levadura, 20g de agar, 50mL de glucosa al 40%, 850mL de H₂O y 100mL de solución “drop out”, véase Yeast Protocols Handbook, BD Biosciences), dependiendo del marcador nutricional de el o los plásmidos con los que se transformó

(leucina para pGADT7 y triptófano para pGBKT7). Las placas se incubaron a 30°C por siete días.

6.2.2 Ensayo de activación transcripcional: Este ensayo se realiza debido a que algunas proteínas *per se* pueden tener la capacidad de activar la transcripción de los genes reporteros (véase sección 5.2) y, por lo tanto se pueden generar falsos positivos durante el análisis de interacción proteica. Se sembraron clonas previamente transformadas con los DNAs plasmídicos que contienen una proteína de fusión al AD y el DNA-BD de GAL4 vacío y viceversa, en medio mínimo sólido en ausencia de triptófano, leucina e histidina (SD/-Trp/-Leu/-His) y en ausencia de triptófano, leucina y adenina (SD/-Trp/-Leu/-Ade) y en medio QDO con y sin X- α -Gal. Las placas se incubaron a 30°C.

6.2.3 Ensayo de toxicidad: Consiste en comparar la velocidad de crecimiento en medio líquido de un cultivo de células transformadas con el vector pGBKT7 o pGADT7 vacío y células transformadas con las construcciones de los genes fusionados al AD o al DNA-BD de GAL4. En breve, se inoculan 50mL de SD/-Trp/Kan (20 μ g/mL) con una colonia de 2-3mm de diámetro que contiene el DNA recombinante, se incuban 12-16h a 30°C y 250-270rpm. La D.O₆₀₀ del cultivo debe ser ≥ 0.8 , de lo contrario la proteína de fusión resulta tóxica para las células.

6.2.4 “Yeast mating”: Se inoculó 0.5mL de medio YPD 2X con dos colonias de distinto “mating type”, frescas, de 2-3mm de diámetro. Los cultivos se incubaron a 30°C y 50rpm durante 24h. Se sembró en los siguientes medios selectivos:

- ✓ SD/-Trp
- ✓ SD/-Leu
- ✓ SD/-Trp/-Leu
- ✓ SD/-Trp/-Leu/-His (TDO, “Triple Drop Out”)
- ✓ TDO con 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT)
- ✓ SD/-Trp/-Leu/-Ade
- ✓ SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade (QDO, “Quadruple Drop Out”)
- ✓ QDO con X- α -Gal

Las placas se incubaron por 10 días a 30°C.

6.2.5 Ensayo de actividad β -galactosidasa: A través de este ensayo se determina la interacción entre dos proteínas, como consecuencia de la capacidad de las clonas para activar la transcripción del gen reportero *lacZ*, el cual codifica la enzima β -galactosidasa, que utiliza como sustrato X-Gal, y cuya hidrólisis (producto de la actividad de la enzima) proporciona una coloración azul. Se utilizó el protocolo descrito en Yeast Protocols Handbook (BD Biosciences, Clontech, 2002). Brevemente, se toma una colonia fresca con un papel Whatman estéril, se permeabiliza (sumergirla en nitrógeno líquido por 10s, se deja descongelar a temperatura ambiente) y se coloca sobre otro papel Whatman estéril previamente impregnado con buffer Z/X-Gal (60mM Na_2HPO_4 , 40mM NaH_2PO_4 , 10mM KCl, 1mM MgSO_4 , 38.6mM β -mercaptoetanol y 0.5mg/mL X-Gal), se incuba a 30°C por hasta 8h.

6.2.6 Selección de clonas positivas: Se seleccionaron como clonas positivas aquellas que crecieron en color azul en el medio QDO con X- α -Gal y presentaron actividad de β -galactosidasa en el ensayo de Buffer Z, en las cuales, por lo tanto, se activó la transcripción de los cuatro genes reporteros (*HIS3*, *ADE2*, *MEL1* y *lacZ*). Además se consideraron como positivas las clonas que aún cuando no son capaces de crecer en QDO, presentan actividad de α y β -galactosidasa (en estas clonas la interacción podría ser menos fuerte o quizás muy tóxica para las células).

6.3 “Pull-down”

6.3.1 Purificación de las proteínas de fusión a GST: Se partió de una dilución 1:50 de un cultivo “overnight”, se incubó a 37°C y ~250rpm hasta alcanzar una D.O_{600} de entre 0.5-0.7. Se adicionó Isopropil- β -D-Tiogalactósido (IPTG) a una concentración final de 0.4mM para la inducción de GST, GST-p8 y GST-p18^(Hamlet), y de 0.1mM para GST-p52, se incubó por 8h a 18°C y ~250 rpm. Se recuperó el pellet y se congeló a -20°C. Se resuspendió el pellet en buffer de lisis (50 μ L de PBS por mL de cultivo inducido, liozima hasta una concentración final de 1mg/mL, tritón X-100 hasta 1% final e inhibidores de proteasas), se incubó 1h a 4°C en rotación y posteriormente se sonicó en ciclos de 15seg ON y 45seg OFF a un 35% de amplitud hasta obtener un lisado clarificado. Se recuperó el sobrenadante (fracción soluble). Se prepararon las perlas de glutatión agarosa según las indicaciones de la casa comercial (SIGMA). Una vez preparadas se les adicionó el sobrenadante recuperado después de la lisis y se

incubó durante 3h a 4°C con agitación suave. Se recuperaron las perlas y se lavaron 4 veces por 10min con PBS-T (1L: 8g de NaCl, 0.2g de KCl, 1.44g de Na₂HPO₄ y 0.24g de KH₂PO₄ con tritón al 1% final, pH 7.4). Las proteínas purificadas, acopladas a la resina se guardaron a 4°C.

6.3.2 Transcripción traducción in vitro: Se empleó el kit TNT® Quick Coupled Transcription/Translation Systems (Promega) para traducir a p8, p18^(Hamlet) y p52, marcadas radioactivamente con ³⁵S, según se describe en TNT® Quick Coupled Transcription/Translation Systems technical manual (Promega, 2005) empleando como DNA templado las construcciones AD-p8, AD- p18^(Hamlet) y AD-p52 en donde dichos genes se clonaron río abajo de un promotor T7.

6.3.3 Ensayos de “pull-down”: Para los ensayos de “pull-down” las proteínas marcadas con ³⁵S se incubaron con las proteínas de fusión a GST (~3µg) en buffer “pull-down” (50mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 5mM EDTA e inhibidores de proteasas), durante 2h a 4°C. Posteriormente las perlas se lavaron 4 veces con buffer “pull-down” y las proteínas se analizaron por SDS-PAGE, seguida de autoradiografía (Cuadrado *et al.*, 2007).

VII. RESULTADOS

Para realizar los ensayos de doble híbrido de levadura y de “pull-down”, con la finalidad de probar la posible interacción entre las proteínas de interés, se generó DNA recombinante que permitiera expresar a estas proteínas en el sistema de expresión heterólogo apropiado para cada objetivo. Empleando la estrategia planteada en la figura 12 y la metodología descrita en la sección VI para obtener DNA recombinante, se generaron las construcciones que se enlistan a continuación.

- | | | |
|-----------------------------------|---------------------------------|------------|
| ✓ DNA BD-p8 | ✓ GST-p8* | ✓ His-p52 |
| ✓ DNA BD- p18 ^(Hamlet) | ✓ GST- p18 ^{(Hamlet)*} | ✓ His-ORF2 |
| ✓ DNA BD-p52 | ✓ GST-p52 | ✓ p8-His |
| ✓ AD-p8 | ✓ pBKS-p8 | |
| ✓ AD- p18 ^(Hamlet) | ✓ pBKS- p18 ^(Hamlet) | |
| ✓ AD-p52 | ✓ pBKS-p52 | |

*Como antecedente a este trabajo, en el laboratorio, ya se habían generado y secuenciado clonas que expresan las proteínas de fusión GST- p8 y GST-p18^(Hamlet).

Cabe mencionar, que los experimentos de “pull-down” inicialmente fueron diseñados para utilizar proteínas de fusión a GST en combinación con proteínas de fusión a histidinas, sin embargo, no fue posible conseguir la inducción de ninguna de las proteínas de fusión a histidinas, aún cuando se probaron distintas cepas de *E. coli* y distintas cinéticas de inducción, por ello se sustituyó a las proteínas de fusión a histidinas por proteínas sin etiqueta, marcadas con ³⁵S, generadas a través de un sistema de transcripción/traducción *in vitro*.

7.1 Doble híbrido de levadura

Como primera aproximación a una respuesta para la interrogante planteada, se realizaron ensayos de doble híbrido de levadura, según se describió en la sección 6.2 y cuyos resultados se describen a continuación. En la tabla 1 se enlistan las distintas cruza y cotransformaciones que se realizaron para probar las interacciones entre p18^(Hamlet) y p8, y p18^(Hamlet) y p52, así como los controles positivos (Li y Fields, 1993; Coin *et al.*, 2006 y Zhou *et al.*, 2007) y negativos (Ye y Worman, 1995) requeridos para estos ensayos de interacción.

Tabla 1. Cruzas y cotransformaciones

Plásmido en la cepa AH109	Plásmido en la cepa Y187	
-	-	} Controles negativos
pGADT7	pGBKT7	
pGADT7	DNA BD-p8	
pGADT7	DNA BD-p18 ^(Hamlet)	
pGADT7	DNA BD-p52	
pGBKT7 y AD-p8		
pGBKT7 y AD-p18 ^(Hamlet)		
pGBKT7 y AD-p52		} Controles positivos
AD-SV40	DNA BD-Lam	
AD-SV40	DNA BD-p53	
AD-p8	DNA BD-p52	
AD-p52	DNA BD-p8	
AD-p8	DNA BD-p8	} Experimento
AD-p8	DNA BD-p18 ^(Hamlet)	
AD-p52	DNA BD-p18 ^(Hamlet)	
AD-p18 ^(Hamlet) y DNA BD-p8		
AD-p18 ^(Hamlet) y DNA BD-p18 ^(Hamlet)		
AD-p18 ^(Hamlet) y DNA BD-p52		

7.1.1 Activación transcripcional: Las clonas de las construcciones de p8, p18^(Hamlet) y p52 fusionadas al AD o al DNA-BD transformadas con el pGBKT7 o el pGADT7 vacíos, respectivamente, crecieron en el medio SD/-Leu/-Trp/-His, como resultado de la transcripción de escape del gen *HIS3*. Debido a esto fue necesario determinar la concentración mínima de 3-AT (un inhibidor competitivo del producto del gen *HIS3*) suficiente para contrarestar dicho efecto. Por otro lado, no se observó crecimiento en el medio SD/-Leu/-Trp/-Ade, por ende, no hubo activación transcripcional del gen *ADE2* y por lo tanto, este pudo utilizarse sin inconveniente, como reportero de una interacción. Además, los controles negativos no presentaron activación de la transcripción de los genes *MEL1* y *LacZ* en los ensayos de actividad correspondientes.

7.1.2 Toxicidad: Las clonas de las construcciones de p8, p18^(Hamlet) y p52 fusionadas al DNA-BD o al AD de GAL4 e incluso los plásmidos vacíos (pGBKT7 o pGADT7 respectivamente) resultaron tóxicas para la levadura, debido a que presentaron un crecimiento muy lento ($D.O_{600nm} < 0.8$, después de 16h de cultivo); a pesar de ello, fue posible utilizarlas para los ensayos posteriores.

7.1.3 Complementación de las deficiencias nutricionales: a continuación se presentan los resultados obtenidos para el crecimiento de las clonas de levadura en los distintos medios selectivos que carecen de uno (Leu o Trp), dos (Leu y Trp), tres (Leu, Trp y Ade o Leu, Trp e His) o cuatro (Leu, Trp, Ade e His) aminoácidos, según la complementación nutricional esperada de cada clona.

✓ SD/-Trp y SD/-Leu: En estos medios crecen las clonas que contienen el plásmido pGBKT7 (posee triptófano como marcador nutricional) o pGADT7 (posee leucina como marcador nutricional), respectivamente, así como las construcciones derivadas de éstos. Se observó crecimiento en todos los casos (Fig. 15), lo cual indica la presencia de clonas conteniendo la proteína de fusión al DNA-BD de GAL4 (Fig. 15A) o la presencia de clonas conteniendo la proteína de fusión al AD de GAL4 (Fig. 15B) en las levaduras generadas por “mating” o por cotransformación.

A

	AD	p8	p18	p52	SV40
BD					
p8					
p18					
p52					
p53					
Lam					

B

	AD	p8	p18	p52	SV40
BD					
p8					
p18					
p52					
p53					
Lam					

Figura 15. Siembra en SD/-Trp (A) o SD/Leu (B). Se observa crecimiento en todos los casos, debido a la complementación en las levaduras transformantes.

✓ SD/-Trp/-Leu: En este medio crecen las clonas que contienen tanto el plásmido pGBKT7 como el pGADT7 o las construcciones derivadas de ambos, y que, por ende, complementan simultáneamente la deficiencia de triptófano y leucina en el medio. El crecimiento indica que las clonas contienen una proteína de fusión al DNA-BD así como una proteína de fusión al AD de GAL4 (Fig. 16).

	AD	p8	p18	p52	SV40
BD					
p8					
p18					
p52					
p53					
Lam					

Figura 16. Siembra en SD/-Trp/-Leu. Se observa crecimiento de colonias en todos los casos, gracias a una doble complementación resultado de la adquisición de los dos plásmidos por cada clona de levadura.

✓ SD/-Trp/-Leu/-His: El TDO es un medio menos astringente que el QDO, dado que solo requiere la activación de la transcripción de un gen reportero. En la figura 17 se muestra que incluso los controles negativos fueron capaces de crecer en este medio lo cual se atribuye a un efecto de transcripción de escape de algunas cepas de levadura del gen *HIS3* endógeno, el cual codifica a la proteína *HIS3* y con esto le permite crecer en un medio deficiente de histidina. Por lo tanto fue necesario determinar la concentración de 3-AT (un inhibidor competitivo de *HIS3*) necesaria para inhibir tal efecto, según se describe a continuación.

	AD	p8	p18	p52	SV40
BD					
p8					
p18					
p52					
p53					
Lam					

Figura 17. Siembras en SD/-Trp/-Leu/-His. Se observa crecimiento de colonias en todos los casos, como resultado de la transcripción de escape del gen *HIS3* endógeno de la levadura.

✓ SD/-Trp/-Leu/-His con 2.5mM de 3-AT: debido a que las clonas de los controles negativos de interacción fueron capaces de crecer en un medio deficiente de histidina (Fig. 17), las clonas se sembraron en TDO con 3-AT (2.5mM), con lo cual se disminuyó dicho efecto y sólo se observó crecimiento en los controles positivos AD-SV40/DNA-BD-p53 (Li y Fields, 1993) y AD-p8/DNA-BD-p52 (Coin *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2003) (Fig. 18), lo cual sugiere que la interacción entre estas proteínas es fuerte y que por el contrario el crecimiento del resto de las clonas era producto de la transcripción de escape de *HIS3*, inhibida con el 3-AT.

	AD	p8	p18	p52	SV40
BD					
p8					
p18					
p52					
p53					
Lam					

Figura 18. Siembras en TDO con 3-AT. Se observa crecimiento solo de las clonas que corresponden a los controles positivos AD-SV40/DNA-BD-p53 y AD-p8/DNA-BD-p52.

✓ SD/-Trp/-Leu/-Ade: Este medio es también menos astringente que el QDO, sin embargo, a diferencia del TDO, el gen reportero que se rastrea es *ADE2*, por lo tanto este medio tiene como ventaja la ausencia de transcripción de escape de dicho gen. Sólo se observó crecimiento en el caso de los controles positivos AD-SV40/DNA BD-p53 (Li y Fields, 1993) y AD-p8/DNA BD-p52 (Coin *et al.*, 2006 y Zhou *et al.*, 2007) (Fig. 19), lo cual sugiere nuevamente que la interacción entre estas proteínas es fuerte y que por otro lado, el resto de las combinaciones proteicas probadas probablemente no presentan interacción.

	AD	p8	p18	p52	SV40
BD					
p8					
p18					
p52					
p53					
Lam					

Figura 19. Siembras en SD/-Trp/-Leu/-Ade. Se observa crecimiento de clonas con la combinación AD-SV40/DNA BD-p53 y AD-p8/DNA BD-p52.

✓ SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade (QDO) y QDO con X- α -Gal: Estos son los medios de selección mas astringentes, ya que las clonas positivas son aquellas que activan la transcripción de tres de los genes reporteros (*HIS3*, *ADE2* y *MEL1*). Sólo se observó crecimiento y actividad de α -galactosidasa en el caso de los controles positivos AD-SV40/DNA BD-p53 (Li B. y Fields S., 1993) y AD-p8/DNA BD-p52 (Coin *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2007), según se muestra en la figura 20A, lo cual apoya los datos presentados para el resto de los medios selectivos y es indicativo de una interacción fuerte entre estas proteínas. Por otro lado, a pesar de que el resto de las clonas fueron incapaces de crecer en medio QDO, se observó actividad de α -galactosidasa en las combinaciones de AD-p18^(Hamlet)/DNA BD-p8, AD-p18^(Hamlet)/DNA BD-p18^(Hamlet) y AD-p18^(Hamlet)/DNA BD-p52 (Fig. 20B). Algo en lo que es necesario hacer hincapié es el hecho de que el control positivo de la interacción entre p8 y p52 solo funciona en una configuración (AD-p8/DNA BD-p52) y no en la configuración opuesta, es decir, no hay activación de la transcripción de los genes reporteros en la combinación AD-p52/DNA-BD-p8. Esto podría deberse a que el ambiente aminoacídico que rodea la proteína de interés, es distinto cuando se encuentra como proteína de fusión al AD o al DNA-BD de GAL4 y por ello, podría afectarse su conformación y, por lo tanto la conformación de dominios importantes para las interacciones proteicas. Esto podría explicar de igual modo, que no se haya observado interacción en las configuraciones opuestas para p8 y p18^(Hamlet) y p52 y p18^(Hamlet).

	AD	p8	p18	p52	SV40
BD					
p8					
p18					
p52					
p53					
Lam					

	AD	p8	p18	p52	SV40
BD					
p8					
p18					
p52					
p53					
Lam					

Figura 20. Siembras en (A) QDO y (B) QDO con X- α -Gal. A. La interacción de AD-SV40 con DNA BD-p53 y AD-p8 con DNA BD-p52 permite que las clonas crezcan en

el medio QDO y sean azules. **B.** p18^(Hamlet) interacciona con p52 y con p8 (sugerido por la actividad de α -galactosidasa) solo cuando se encuentra como fusión al AD de GAL4.

7.1.4 Actividad β -galactosidasa: debido a que no fue posible crecer a las clonas de interés en medio QDO, el ensayo de actividad de β -galactosidasa se realizó a partir de colonias creciendo en un medio doble (SD/-Leu/-Trp), con lo cual se asegura la presencia de los dos plásmidos en la clona analizada. En la figura 21 se observa la presencia de actividad en las clonas que contienen los controles positivos (Li B. y Fields S., 1993; Coin *et al.*, 2006 y Zhou *et al.*, 2007), y clonas que contienen a p8 y p18^(Hamlet) así como p52 y p18^(Hamlet), lo cual indica la capacidad de activar al gen *lacZ* en esas clonas. Estos resultados apoyan lo observado previamente en el ensayo de α -galactosidasa (Fig. 20B) y en conjunto sugieren la posible interacción entre p18^(Hamlet) y p8, y p18^(Hamlet) y p52.

	AD	p8	p18	p52	SV40
BD					
p8					
p18					
p52					
p53					
Lam					

Figura 21. Ensayo de actividad β -galactosidasa. Se observa actividad en una de las clonas que contienen a p8 y p18^(Hamlet) así como en una de las clonas que contienen p52 y p18^(Hamlet), lo cual sugiere una posible interacción entre éstas, capaz de activar al gen *lacZ*.

7.2 “Pull-down”

Debido a que los experimentos de doble híbrido de levadura sugieren la interacción de p18^(Hamlet) con p8 y con p52, se decidió analizar esta interacción a través de ensayos de “pull-down” con la finalidad de corroborar o refutar lo observado con la primera técnica experimental. Para estos ensayos, fue necesario purificar proteínas de fusión a GST y

generar proteínas marcadas con ^{35}S empleando un sistema de transcripción/traducción *in vitro*.

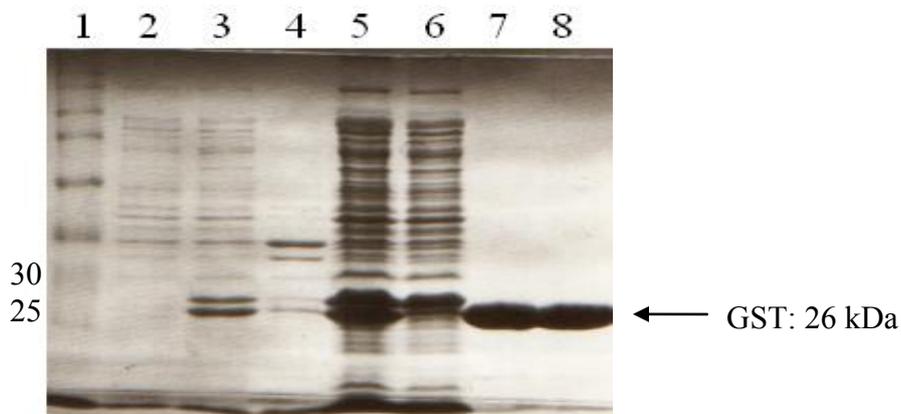
7.2.1 Purificación de las proteínas recombinantes

Se purificó a GST (Fig. 22A), GST-p8 (Fig. 22B), GST-p18^(Hamlet) (Fig. 22C) y GST-p52 (Fig. 22D), según se observa en los siguientes geles de SDS-PAGE, en los cuales se presentan los resultados obtenidos durante la inducción, la lisis y la purificación de las proteínas recombinantes. Las muestras cargadas en cada carril, en todos los casos, se enlistan en la tabla 2.

Tabla 2. Geles de SDS-PAGE

Carril	Muestra
1	Marcador de peso molecular RPN800 (GE)
2	Cultivo no inducido
3	Cultivo inducido
4	Fracción insoluble
5	Fracción soluble
6	Fracción no unida a las perlas de glutatión agarosa
7	Fracción unida a las perlas de glutatión agarosa
8	Fracción retenida en las perlas después de lavar

A



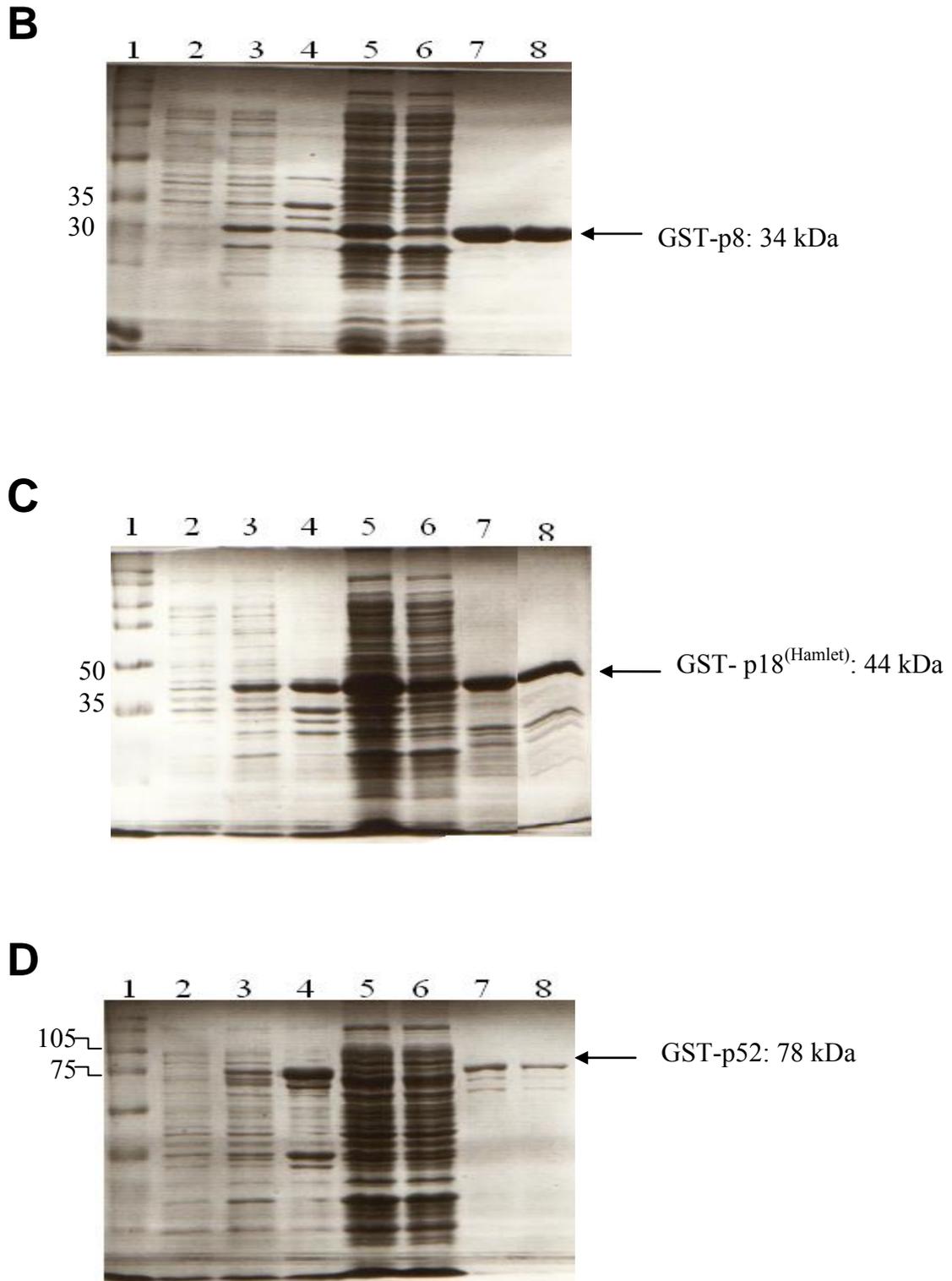


Figura 22. Purificación de GST y proteínas de fusión a GST. **A.** Purificación de GST, **B.** Purificación de GST-p8, **C.** Purificación de GST-p18^(Hamlet) y **D.** Purificación de GST-p52. Al comparar líneas 2 y 3 se observa la inducción de la proteína de fusión. Al comparar líneas 4 y 5 se observa la proporción de cada proteína en las fracciones soluble e insoluble. En 8 se observa la proteína retenida en las perlas después de los lavados (véase tabla 2).

7.2.2 Transcripción/ traducción *in vitro*: Fue posible transcribir y traducir *in vitro* a ^{35}S -p8, ^{35}S -p18^(Hamlet) y ^{35}S -p52 (Fig. 23), a partir de DNA templado de las construcciones AD-p8, AD-p18^(Hamlet) y AD-p52, en donde dichos genes están clonados río abajo del promotor T7 y a su vez el AD de GAL4 se encuentra río arriba de éste y por lo tanto no se incorpora a la secuencia de la proteína. Por otro lado, fue imposible traducir estas proteínas a partir de las construcciones generadas en el vector pBKS, aún cuando este también posee un promotor T7 (datos no presentados).

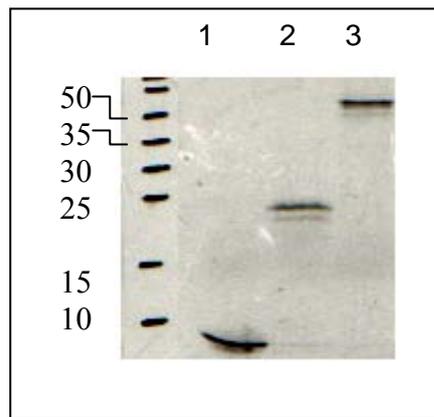


Figura 23. Autoradiografía de p8, p18^(Hamlet) y p52 transcritas y traducidas *in vitro*. En línea 1 se observa a p8 (~8kDa), en 2 a p18^(Hamlet) (~18kDa), y en 3 a p52 (~52kDa).

7.2.3 Ensayos de interacción por “pull-down”: al igual que en el sistema de doble híbrido de levadura, para los ensayos de “pull-down” se utilizó como control positivo la interacción previamente reportada entre p8 y p52 (Coin *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2007). En los ensayos de “pull-down” contra ^{35}S -p8 se encontró que cuando se utiliza a GST-p52 o a GST-p18^(Hamlet) como carnadas, estas atrapan a un par de proteínas que aparentemente corresponden a dos versiones distintas de ^{35}S -p8, según se muestra en la figura 24. Sin embargo, a diferencia de GST-p52, GST-p18^(Hamlet) atrapa preferencialmente a la proteína de mayor peso. Al respecto, se cree que una de las bandas podría ser una forma truncada o degradada de ^{35}S -p8. Por el contrario, p8 no se une inespecíficamente a la resina de glutatión agarosa, ni a GST. Estos resultados proporcionan mas evidencias que sugieren que p18^(Hamlet) podría interaccionar con p8.

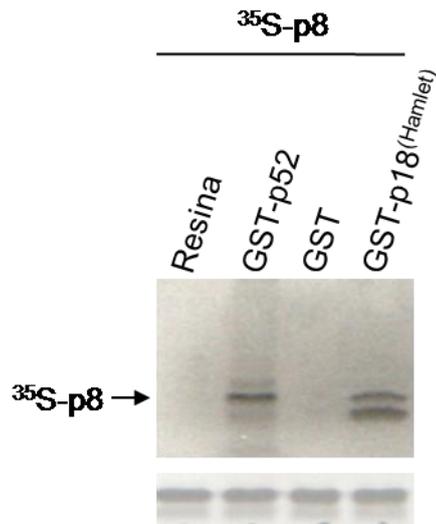


Figura 24. ³⁵S-p8 interacciona **Input ³⁵S-p8 (4%)** con GST-p52 y a GST-p18^(Hamlet).

En los ensayos de “pull-down” contra ³⁵S-p18^(Hamlet) se encontró que ésta se une inespecíficamente a la resina de glutatión agarosa y a GST (Fig. 25), sin embargo, cuando se utiliza a GST-p8 o GST-p52 como carnadas, la unión parece ser más específica, ya que ³⁵S-p18^(Hamlet) se enriquece respecto a dichos controles negativos según se muestra en la figura 25. Similarmente a lo que sucede con ³⁵S-p8, en la autoradiografía se observan dos versiones de ³⁵S-p18^(Hamlet) e igualmente, una de ellas podría corresponder a una proteína truncada o degradada. Estos resultados proporcionan más evidencias que sugieren que p18^(Hamlet) podría interactuar con p8 y con p52.

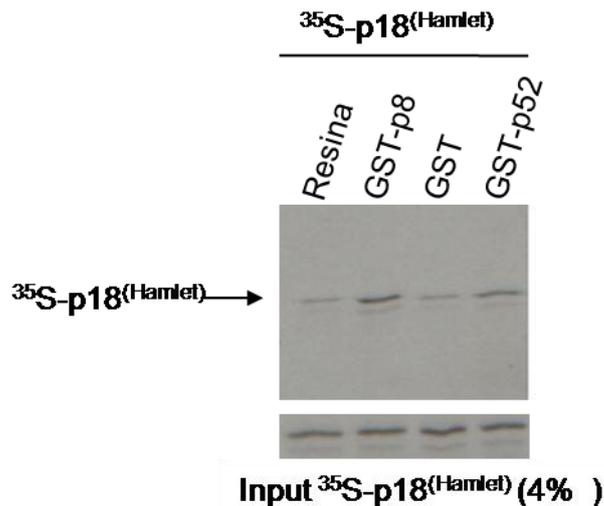


Figura 25. ³⁵S-p18^(Hamlet) interacciona con GST-p8 y GST-p52.

En los ensayos de “pull-down” contra ^{35}S -p52 se encontró que esta se une inespecíficamente a la resina de glutatión agarosa y a GST (Fig. 26), sin embargo, cuando se utiliza a GST-p8 o GST-p18^(Hamlet) como carnadas, la unión a estas parece ser más específica, ya que ^{35}S -p52 se enriquece claramente, respecto a dichos controles negativos según se muestra en la figura 26. Estos resultados apoyan lo observado para la interacción de GST-p52 con ^{35}S -p18^(Hamlet) (Fig. 25) y proporcionan más evidencias que sugieren que p18^(Hamlet) podría interactuar con p52.

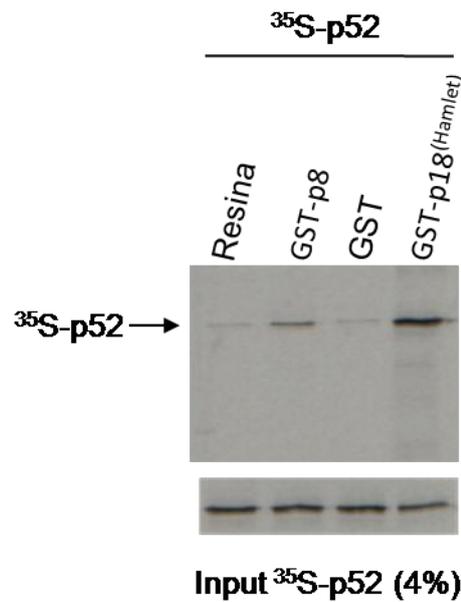


Figura 26. ^{35}S -p52 interacciona con GST-p8 y GST-p18^(Hamlet).

Finalmente, para probar la especificidad de las interacciones observadas en los ensayos anteriormente descritos, se realizaron ensayos de “pull-down” contra proteínas “mock”. En estos, se utilizó a MOD(mdg4) (59kDa) y una versión truncada de la proteína DREF (17.5kDa), las cuales, entre otras cosas, son factores transcripcionales (Hirose *et al.*, 1996; Georgiev *et al.*, 1989); se utilizaron las mismas cantidades de proteína carnada y condiciones de interacción que en todos los casos anteriores (véase sección 6.3.3). En la figura 27 se observa que DREF (^{35}S -“mock”) se une de modo inespecífico con la misma afinidad a todas las carnadas que se usaron como prueba. Lo cual sugiere que las interacciones vistas a través de los ensayos de “pull-down”, entre p18^(Hamlet) y p8 y p18^(Hamlet) y p52 son *bona fide*.

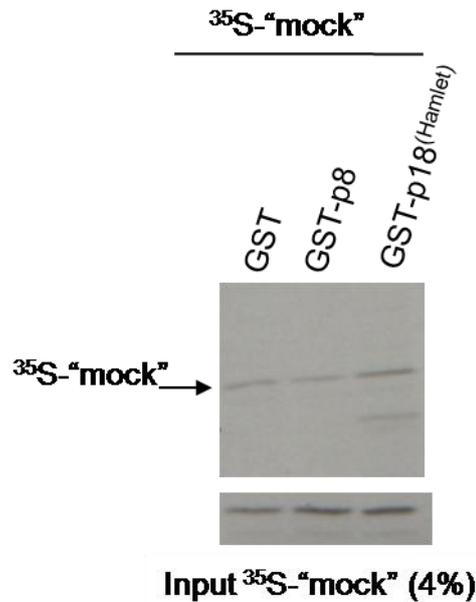


Figura 27. Autoradiografía de “pull-down” contra ³⁵S-“mock”.

VIII. DISCUSIÓN

El DNA es la molécula encargada de almacenar la información genética en todos los seres vivos, por ello, la manutención de su integridad es determinante para la adecuada transmisión de los caracteres hereditarios entre organismos (Klug S. *et al.*, 1999). Dada su importancia, el DNA y los procesos en que este se involucra han sido blanco de estudio durante años de investigación. Entre los procesos más estudiados en este campo se encuentran la transcripción, y la reparación del DNA cuando este es sujeto a daño. La complejidad de estos mecanismos se refleja en la intervención de un gran número de proteínas con muy diversas funciones. Así mismo, se sabe que algunas de estas proteínas pueden compartir su función, en ambos mecanismos, un ejemplo de esto, es el factor de transcripción y reparación TFIIH, este complejo está conservado desde levadura hasta humano y sus funciones se comparten, como su nombre lo indica, tanto en reparación como en transcripción e incluso en el control del ciclo celular (Cooper y Fuss, 2006).

TFIIH está constituido por 10 proteínas. La subunidad p8 es una proteína de 72 aminoácidos (~8kDa) cuya función en TFIIH parece ser estructural. Al respecto, Coin y colaboradores reportaron que la concentración celular de TFIIH disminuye en ausencia de p8, sugiriendo que esta podría estar estabilizando al complejo o protegiéndolo de

degradación (Coin *et al.*, 2006; Giglia-Mari *et al.*, 2004). En *Drosophila*, p8 está codificada en un bicistrón que también codifica a p18^(Hamlet), esta última, es una proteína recientemente identificada en humano (no caracterizada en la mosca), que funciona como coactivador transcripcional de p53 de genes pro-apoptóticos y de genes de arresto del ciclo celular (Cuadrado *et al.*, 2007), y cuyo homólogo en levadura y *Arabidopsis* se denomina SWC6 (Choi *et al.*, 2006), el cual es parte del complejo remodelador de cromatina SWR1 que intercambia a la histona H2A por su variante HTZ1 (Krogan, 2003).

Por otra parte, la subunidad p52 de TFIID es una proteína de 499 aminoácidos (~52kDa) que favorece la interacción del complejo ternario p34/p44/p62 con XPB y es responsable del anclaje de esta última proteína al “core” de TFIID (Jawary *et al.*, 2002). Se sabe que p52 interactúa con p8 y con XPD *in vitro* (Coin *et al.*, 2006) y además en la base de datos del interactoma de *Drosophila* se reporta que p52 interacciona con el homólogo de p18^(Hamlet) (Giot *et al.*, 2003) el cual, como se mencionó anteriormente, en *Drosophila* está codificado en un bicistrón junto con la subunidad p8 de TFIID. La existencia de este bicistrón en *Drosophila*, resulta interesante, debido a que p8 y p18^(Hamlet) por estar codificadas en un mismo mensajero podrían tener funciones semejantes o relacionadas (Stallmeyer *et al.*, 1999). Esto aunado a la interacción reportada en el interactoma de *Drosophila* de p52 con p18^(Hamlet), sugiere que p18^(Hamlet) podría interactuar física y/o funcionalmente con TFIID.

Dadas las premisas anteriores, en este trabajo, se propuso la existencia de una posible interacción física entre las subunidades p8 y p52 de TFIID con la proteína p18^(Hamlet). Para abordar dicha hipótesis se realizaron ensayos de doble híbrido de levadura y de “pull-down”, en los cuales se obtuvieron datos que sugieren que p18^(Hamlet) interacciona con p8 y con p52. En el ensayo de doble híbrido de levadura se observó la activación de al menos dos de los genes reporteros como consecuencia de las interacciones proteicas. Estos datos fueron apoyados por los resultados obtenidos a través de los “pull-down”, en donde, a pesar de observar que p52 y p18^(Hamlet) presentan cierta unión inespecífica, se vio que las uniones entre sí mismas parecen ser mucho más específicas debido a que hay un enriquecimiento notable de estas proteínas marcadas con ³⁵S al comparar con los controles negativos o contra proteínas “mock”.

Estos datos son interesantes, dado que sugieren una posible relación entre las actividades de p18^(Hamlet) y TFIIH. Sin embargo, es necesario corroborar que lo mismo sucede con las proteínas en su estado endógeno o nativo, para validar lo observado en los sistemas *in vitro*. Y posteriormente plantear estrategias que permitan proponer el papel de p18^(Hamlet) y su posible interacción funcional con TFIIH.

De la misma manera, sería interesante determinar si p18^(Hamlet) está relacionada funcionalmente con otras proteínas.

IX. CONCLUSIONES

A partir de los datos obtenidos por los ensayos de doble híbrido de levadura y “pull-down”, se puede concluir lo siguiente:

- ✓ p18^(Hamlet) interacciona con p8 y con p52 en el sistema de doble híbrido de levadura en un modo dependiente de la configuración en la que se encuentren clonados ambos genes.
- ✓ p18^(Hamlet) interacciona con p8 y con p52, a través de ensayos de “pull-down” *in vitro*.
- ✓ Estos datos sugieren que p18^(Hamlet) podría tener algún papel en las actividades de TFIIH.

X. PERSPECTIVAS

El objetivo general que se planteó para el presente trabajo, fue determinar si p18^(Hamlet) interaccionaba físicamente con algunas de las subunidades de TFIIH, mediante un ensayo *in vitro* y otro *in vivo*, pero en ambos casos, utilizando proteínas recombinantes en sistemas de expresión heterólogos. Los datos obtenidos y discutidos anteriormente, sugieren que la hipótesis es afirmativa, sin embargo, se espera poder confirmarlo a través de trabajos futuros. Si se corroboran los datos de interacción, se podría realizar una amplia gama de experimentos que permitieran proponer las funciones de p18^(Hamlet) asociadas o no a TFIIH. Para ello, se sugiere:

- ✓ Realizar ensayos de coimmunoprecipitación de p18^(Hamlet) a partir de extractos celulares, para analizar si ésta proteína se asocia con TFIIH en su contexto natural.

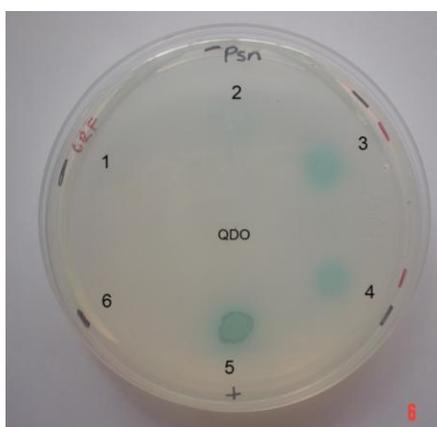
- ✓ Determinar, a través de ensayos de “pull-down”, los dominios de interacción de p18^(Hamlet) con p8 y p52, para determinar si estas últimas se unen a un mismo dominio o a dominios distintos de p18^(Hamlet), lo cual a su vez podría indicar o descartar la posible formación de heteromultímeros de combinaciones particulares de p18^(Hamlet) con estas y otras proteínas bajo ciertas condiciones.
- ✓ Dado que se sabe que en células humanas p38 es la cinasa responsable de fosforilar a p18^(Hamlet) cuando se induce daño en el DNA mediante radiación U.V y esto permite la interacción física de este último con diversas proteínas (Cuadrado *et al.*, 2007), determinar si la fosforilación influye del mismo modo en su interacción con p8 y/o p52, y si existe alguna competencia por la unión a este. Esto podría proporcionar información que sugiera o descarte que la interacción de p18^(Hamlet) con las diferentes proteínas está regulada a través de modificaciones post-traduccionales, que como en el caso de la fosforilación por p38, surjan como resultado de un estímulo en particular.
- ✓ Determinar, a través de ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina, si p18^(Hamlet) se localiza en promotores en donde también se encuentre TFIIH. Esto nos indicaría si p18^(Hamlet) se recluta en conjunto con TFIIH, en regiones de transcripción activa *in vivo*.
- ✓ Determinar, a través de coimmunotinciones, la dinámica de p18^(Hamlet) durante el desarrollo embrionario y en respuesta a daño al DNA en *Drosophila melanogaster*, en fondos “wild type” y en fondos mutantes de TFIIH, para observar si el patrón de distribución de p18^(Hamlet), se ve afectado en estos fondos mutantes o se modifica cuando se somete a estrés por radiación ultravioleta.
- ✓ Determinar, a través de coimmunotinciones, si p18^(Hamlet) colocaliza con TFIIH en regiones de DNA dañadas con radiación ultravioleta. Esto nos indicaría si p18^(Hamlet) se recluta a zonas donde actúa la REN *in vivo*.
- ✓ Determinar si p18^(Hamlet) afecta las funciones de TFIIH durante la reparación y la transcripción mediante ensayos *in vitro*.

XI. ANEXOS

11.1 Búsqueda de proteínas que interaccionen con p18^(Hamlet)

Con la finalidad de identificar otras proteínas que interaccionan físicamente con p18^(Hamlet) se realizó un “screening” a través del sistema de doble híbrido de levadura, empleando como carnada a esta proteína fusionada al BD de GAL4 (DNA BD-p18^(Hamlet)) y, una biblioteca de cDNA de *Drosophila melanogaster* fusionada al AD de GAL4, previamente generada en el laboratorio a partir de embriones de 0 a 12h. Para realizar el “screening” se siguió el protocolo de “yeast mating” descrito en BD Matchmaker™ Library Construction and Screening Kits User Manual (BD Biosciences Clontech, 2002). Brevemente, se combinaron células de levadura que contienen la construcción DNA BD-p18^(Hamlet) en la cepa Y187, resuspendidas en 5mL de medio SD/-Trp, a una concentración de $\sim 1 \times 10^{10}$ células/mL con una alícuota de la biblioteca que contiene $\sim 2 \times 10^7$ células/mL (1mL) en la cepa AH109, se incubaron en 45mL de YPD 2X con kanamicina (50 μ g/mL) en un matraz de 2L, a 30°C y 50 rpm durante 24h. Posteriormente se centrifugó el cultivo y el pellet celular se resuspendió en 10mL de YPD 0.5X con kanamicina. Finalmente el cultivo se sembró en placas de medio QDO, SD/-Trp, SD/-Leu y SD/-Trp/-Leu. De este modo se obtuvieron 163 clonas capaces de crecer en medio QDO, lo cual indica la activación de los genes reporteros *ADE2* y *HIS3* como resultado de una interacción proteica en las clonas diploides. Sin embargo, con la finalidad de seleccionar, para un análisis posterior, solo aquellas clonas capaces de activar los cuatro genes reporteros las clonas obtenidas se probaron posteriormente en ensayos de actividad de α y β galactosidasa (Fig. 29), según se describió en las secciones 6.2.2 y 6.2.5 de este escrito. Como resultado se obtuvieron dos clonas positivas para ambos ensayos. Se extrajo el DNA de estas clonas según se describe en ProQuest™ Two-Hybrid System with Gateway® Technology Instruction Manual (Invitrogen, 2002) y posteriormente este se amplificó en *E.coli* para su secuenciación. Al analizar las secuencias obtenidas, se encontró que ambas clonas contenían el mismo DNA, y a través de un alineamiento (“Basic Local Alignment Search Tool”, BLAST) se encontró que dicha secuencia corresponde a la región carboxilo (aminoácidos 325 a 527) de la isoforma B de la presenilina (Psn) de *Drosophila*, que a su vez corresponde a la isoforma 1 de la presenilina de humano (Ps1).

Para descartar que la presenilina *per se* tiene la capacidad de activar los genes reporteros del sistema, y por lo tanto, generar un falso positivo, se cotransformaron levaduras con el plásmido pGBKT7 vacío y el plásmido aislado a través del “screening”, el cual contiene la fusión AD-Psn, además se subclonó dicha secuencia en el plásmido pGBKT7, generando así la fusión DNA BD-Psn la cual se empleó para cotransformar levaduras en combinación con el plásmido pGADT7 vacío. Las clonas así generadas fueron incapaces de activar la transcripción de los genes reporteros, dado que no crecieron en el medio QDO y tampoco presentaron actividad de α o β galactosidasa (Fig. 28).



Código numérico	Plásmidos
1	pGADT7 y DNA BD- p18 ^(Hamlet)
2	pGADT7 y DNA BD-Psn
3	AD-Psn y DNA BD- p18 ^(Hamlet)
4	AD-p18 ^(Hamlet) y DNA BD-Psn
5	AD-SV40 y DNA BD-p53
6	AD-SV40 y DNA BD-Lam

Figura 28. p18^(Hamlet) interacciona con la Psn a través del sistema de doble híbrido de levadura. Activación de la transcripción de los genes reporteros *ADE*, *HIS3* y *MEL1*, en clonas capaces de crecer en medio QDO e hidrolizar X- α -Gal (clonas 3, 4 y 5) como consecuencia de una interacción proteica.

Así mismo, con la finalidad de corroborar la interacción observada entre p18^(Hamlet) y la presenilina a través del sistema de doble híbrido de levadura, se realizaron ensayos de “pull-down” *in vitro* en donde se empleó como carnada a p18^(Hamlet) fusionada a GST y, por otra parte, se empleó el sistema de transcripción traducción *in vitro* para producir a la presenilina marcada radioactivamente (³⁵S-Psn). Se siguió el protocolo descrito en la sección 6.3.3 y se observó que GST-p18^(Hamlet) interacciona con ³⁵S-Psn (Fig. 29), con lo cual se confirma la interacción observada a través del “screening” por doble híbrido. Estos resultados son interesantes, dado que sugieren la posibilidad de que estas proteínas además interaccionen funcionalmente durante algún proceso celular.

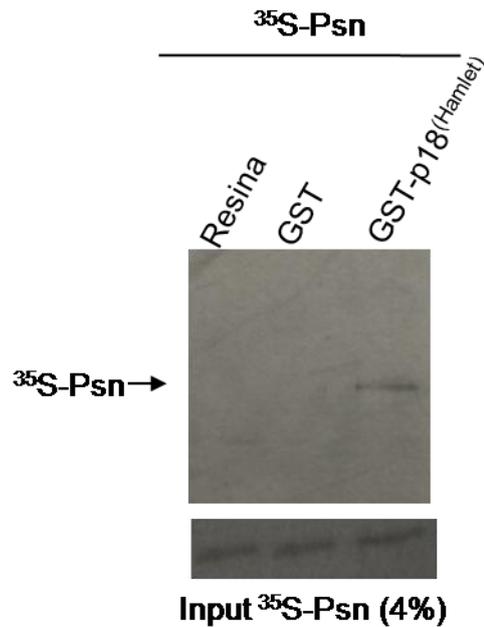


Figura 29. p18^(Hamlet) interacciona con la Psn a través de ensayos de “pull-down”.

En secciones anteriores se describió la participación de p18^(Hamlet) en procesos como la activación de la transcripción, mediada por p53, de genes involucrados en apoptosis y arresto del ciclo celular (Cuadrado *et al.*, 2007; Lafarga *et al.*, 2007), y el remodelaje de la cromatina, a través del intercambio de histonas (Krogan *et al.*, 2003; Mizuguchi *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2007; March-Díaz *et al.*, 2007). Por otra parte, se sabe que la presenilina (Ps1), entre otras cosas, es una proteína asociada con complejos de γ -secretasas cuya actividad proteolítica es importante para el procesamiento de proteínas, como Notch y β APP, importantes durante los procesos de diferenciación y apoptosis respectivamente (Steiner *et al.*, 1999; Fluhner *et al.*, 2004; Alves da Costa *et al.*, 2006). Se sabe además que mutaciones en este gen en humano, están asociadas a la generación de Alzheimer (Steiner *et al.*, 1999), lo cual la ha convertido en un importante blanco de investigación y, de hecho, se cuenta con una gran cantidad de mutantes de este gen en *Drosophila*. Por lo tanto, será muy interesante estudiar si la presenilina y p18^(hamlet) participan en algún proceso celular común y para ello, será necesario probar primeramente que estas proteínas interactúan físicamente *in vivo* y si existe además interacción genética o relación funcional entre ellas.

11.2 Traducción del bicistrón p8-p18^(Hamlet) *in vitro*

Se conocen varios ejemplos de transcritos bicistrónicos en eucariotas y se han propuesto distintos modelos de traducción de los mismos, por ejemplo, la existencia de sitios

internos de entrada del ribosoma (IRES, por sus siglas en inglés) en el mensajero, así como los modelos de “scanning” y “context-dependent leaky scanning” del ribosoma sobre el mensajero (Wall *et al.*, 2005). Si bien es importante elucidar el mecanismo molecular de la traducción de un mensajero bicistrónico, es necesario también determinar si las proteínas codificadas en el mismo, se traducen o no simultáneamente, lo cual podría tener relevancia funcional para las proteínas. Con la finalidad de obtener información sobre cómo se da la traducción del bicistrón p8-p18^(Hamlet) y dado que se pudieron traducir las secuencias de estas proteínas independientemente a través del sistema de transcripción/traducción *in vitro*, nos preguntamos si a través de este mismo sistema podríamos traducir la secuencia del bicistrón, considerando cuatro posibles resultados. El primero de ellos sería que p8 y p18^(Hamlet) fueran traducidas simultáneamente, lo cual en un contexto *in vivo* implicaría que ambas proteínas pueden estar presentes en cantidades equimolares; la segunda posibilidad sería que se tradujera solo una de las dos proteínas, lo cual en un contexto *in vivo* sería muy interesante, dado que implicaría la necesidad de un mecanismo de regulación traduccional que permita la presencia de una proteína o la otra, tal vez como resultado de estímulos o condiciones particulares; el tercero consistía en que se generara una sola proteína cuyo peso correspondiera a la traducción del mensajero completo (~27kDa) y la última posibilidad sería que no se tradujera ninguna de las proteínas esperadas, estos dos últimos casos podrían deberse a la ausencia de factores importantes para la regulación transcripción y/o la traducción del mensajero en el sistema *in vitro* o la ausencia de secuencias reguladoras dentro del DNA empleado como templado. Para realizar dichos ensayos, se subclonó la secuencia del bicistrón (partiendo del ATG de inicio de p8 hasta el codón de paro de p18^(Hamlet)) en los plásmidos pGADT7 y pBKS; las construcciones generadas se utilizaron como templado en reacciones de transcripción/traducción *in vitro* (según se describe en la sección 6.3.4) en cuyo producto se observó la ausencia de proteínas de los pesos esperados, esto resulta interesante, dado que, como se mencionó en un principio, las secuencias de las proteínas independientes se traducen satisfactoriamente en este sistema, sin embargo, en esos casos el DNA templado empleado carece de la secuencia que corresponde a la región intercistrónica (ICR, por sus siglas en inglés) de 54 nucleótidos que existe entre p8 y p18^(Hamlet) presente en el DNA templado del bicistrón. Esto sugiere que dicha región, podría ser importante en la regulación del mecanismo de traducción del mensajero bicistrónico. Por lo tanto, será necesario

realizar experimentos *in vivo* que permitan probar o descartar dicha hipótesis y obtener información sobre cómo se da la traducción de este mensajero en *Drosophila*.

XII. BIBLIOGRAFÍA

- Alves da Costa C., Sunyach C., Pardossi-Piquard R., Sévalle J., Vincent B., Boyer N., Kawarai T., Girardot N., George-Hyslo P. y Checler F. (2006). Presenilin-dependent γ -secretase-mediated control of p53-associated cell death in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Disease*, **26**: 6377-6385.
- Andrews J., Smith M., Merakovsky J., Coulson M., Hannan F., y Kelly L.E. (1996). The stoned locus of *Drosophila melanogaster* produces a dicistronic transcript and encodes two distinct polypeptides. *Genetics*, **143**: 1699–1711.
- BD Bioscience Clontech (2002). BD Matchmaker™ Library Construction and Screening Kits User Manual.
- Cai, Y., Jin, J., Florens, L., Swanson, S. K., Kusch, T., Li, B., Workman, J. L., Washburn, M. P., Conaway, R. C., y Conaway, J. W. (2005). The mammalian YL1 protein is a shared subunit of the TRRAP/TIP60 histone acetyltransferase and SRCAP complexes. *J. Biol. Chem.*, **280**: 13665-13670.
- Chang, W.H. y Kornberg, R.D. (2000). Electron crystal structure of the transcription factor and DNA repair complex, core TFIIH. *Cell*, **102**: 609-613.
- 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. y Egly J.M. (2003). Assay of promoter melting and extension of mRNA: role of TFIIH subunits. *Methods enzymol.*, **370**: 713-733.
- Coin F., Proietti L., De Santis, Nardo T., Zlobinskaya O., Stefanini M. y Egly J.M. (2006). p8/TTD-A as a Repair Specific TFIIH Subunit. *Mol. Cell*, **21**: 215-226.
- Coin F., Oksenysh V. y Egly J.M. (2007). Distinct roles for the XPB/p52 and XPD/p44 subcomplexes of TFIIH in damaged DNA opening during nucleotide excision repair. *Mol. Cell*, **26**: 245-256.
- Cooper, P. y Fuss J. (2006). DNA Repair: Dynamics Defenders against Cancer and Aging. *PLoS Biol.*, **4**: 0899-0903.

- Cuadrado A., Lafarga V., Cheung P., Dolado I., Llanos S., Cohen P. y Nebreda A. (2007). A new p38 MAP kinase-regulated transcriptional coactivator that stimulates p53-dependent apoptosis. *The EMBO journal*, **26**: 2116-2126.
- Di Lello P., Jenkins L., Mas C., Langlois C., Malitskaya E., Fradet-Turcotte A., Archambault J., Legault P. y Omichinski J. (2008). p53 and TFIIE α share a common binding site en the Tfb1/p62 subunit of TFIIF. *PNAS*, **105**: 106-111.
- Egly J.M, (2001). TFIIF: from transcription to clinic. *FEBS letters*, **24884**: 124-128.
- Fluhrer R., Friedlein A., Haass C. y Walter J. (2004). Phosphorylation of presenilin 1 at the caspase recognition site regulates its proteolytic processing and the progression of apoptosis. *J. Biol. Chem.*, **279**: 1585-1593.
- Fregoso M., Lainé J.P., Aguilar-Fuentes J., Mocquet V., Reynaud E., Coin F., Egly J.M. y Zurita M. (2007). DNA repair and transcriptional deficiencies caused by mutations in the *Drosophila* p52 subunit of TFIIF generate developmental defects and chromosome fragility. *Mol. Cell*, **27**: 3640-3650.
- Giglia-Mari G., Miquel C., Theil F., Mari P., Hoogstraten D., Ng J., Dinant C., Hoeijmakers J. y Vermeulen W. (2006). Dynamic interaction of TTDA con TFIIF is estabilized by nucleotide excision repair in living cells. *PLoS Biol.*, **4**: 952-963.
- Giglia-Mari G., Coin F., Ranish A., Hoogstraten D., Theil A., Wijgers N., Jaspers N., Raams A., Argentini M., Spek P., Botta E., Stefanini M., Egly J.M., Aebersold R., Hoeijmakers J., y Vermeulen W. (2004). A new, tenth subunit of TFIIF is responsible for the DNA repair syndrome trichothiodystrophy group A. *Nat. Genet.*, **36**: 714-719.
- Giot L., Bader J.S., Brouwer C., Chaudhuri A., Kuang B., Li Y., Hao YL., Ooi C.E., Godwin B., Vitols E., Vijayadamar 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., Carrolla S., Vickelhaupt E., Lazovatsky Y., DaSilva A., Zhong J., Stanyon C.A., Finley Jr. R.L., White P., Braverman M., Jarvie T., Gold S., Leach M., Knight J., Shimkets R.A., McKenna M.P., Chant J. y Rothberg J.M. (2003). A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Sci.*, **302**: 1727-1736.

- Georgiev P. y Gerasimova T. (1989). Novel genes influencing the expression of the yellow locus and mdg4 (gypsy) in *Drosophila melanogaster*. *Molec. gen. Genet.* **220**: 121-126.
- Hirose, F., Yamaguchi, M., Kuroda, K., Omori, A., Hachiya, T., Ikeda, M., Nishimoto, Y., Matsukage, A. (1996). Isolation and characterization of cDNA for DREF, a promoter-activating factor for *Drosophila* DNA replication-related genes. *J. Biol. Chem.*, **271**: 3930-3937.
- Hoeijmakers, J.H.J. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nat.*, **411**: 366-374.
- Invitrogen (2002). ProQuest™ Two-Hybrid System with Gateway® Technology Instruction Manual.
- Ito S., Kuraoka I., Chymkowitz P., Compe E., Takedachi A., Ishigami c., Coin F., Egly J.M. y Tanaka K. (2007). XPG stabilizes TFIIH, allowing transactivation of nuclear receptors: implications for Cockayne syndrome in XP-G/CS patients. *Mol. Cell*, **26**: 231-243.
- Jawhary A., Lainé J.P., Dubaele S., Lamour V., Poterszman A., Coin F., Moras D. y Egly J.M. (2002). p52 Mediates XPB Function within the Transcription/Repair Factor TFIIH. *J. Biol. Chem.*, **277**: 31761-31767.
- Klug W. y Cummings M. (1999). Conceptos de genética, 5^{ta} ed., Ed. Prentice Hall, pág.277.
- Krogan N., Keogh M.C., Datta N., Sawa C., Ryan O.W., Ding H., Haw R.A., Pootoolal J., Tong A., Canadien V., Richards D.P., Wu X., Emili A., Hughes T.R., Buratowski S. y Greenblatt J.F. (2003). A Snf2 family ATPase complex required for recruitment of the histone H2A variant Htz1. *Mol. Cell*, **12**: 1565-1576.
- Lafarga V., Cuadrado A. y Nebreda A. (2007). p18^(Hamlet) mediates different p53 dependent responses to DNA damage-inducing agents. *Cell cycle*, **6**: 2319-2322.
- Lainé, J. P., Mocquet V. y Egly J.M (2006). TFIIH enzymatic activities in transcription and nucleotide excision repair. *Methods Enzymol.*, **408**: 246-263.
- Li B. y Fields S. (1993). Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 T antigen by using the yeast two-hybrid system. *FASEB J.*, **7**: 957-963.
- Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C., Krieger M., Scott M. (2004) Molecular cell biology, 5^{ta} ed., W.H. Freeman and Company, pág. 361.

- March-Díaz R., García-Domínguez M., Florencio F.J. y Reyes J.C. (2007). SEF, a new protein required for flowering repression in Arabidopsis, interacts with PIE1 and ARP6. *Plant Physiol.*, **143**: 893-901.
- Matsuno M., Kose H., Okabe M. y Hiromi Y. (2007). TFIIH controls developmentally-regulated cell cycle progression as a holocomplex. *Genes to cells*, **12**: 1289-1300.
- Merino C., Reynaud E., Vázquez M. y Zurita M. (2002). DNA repair and transcriptional effects of mutations in TFIIH in *Drosophila* development. *Mol. Biol. Cell.*, **13**: 3246-56.
- Mizuguchi G., Shen X., Landry J., Wu W., Sen S. y Wu C. (2004). ATP-driven exchange of histone H2A.Z variant catalyzed by SWR1 chromatin remodelling complex. *Science*, **303**: 343-348.
- Oh Kyu-Seon, Imoto K., Boyle J., Khan G. y Kraemer K. (2007). Influence of XPB helicase on recruitment and redistribution of nucleotide excision repair proteins at sites of UV-induced DNA damage. *DNA repair*, **6**: 1359-1370.
- Orphanides G., Lagrange T. y Reinberg D. (1996). The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev.*, **10**: 2657-83.
- Ranish J.A., Hahn S., Lu Y., Yi E.C., Li X.J., Eng J. y Aebersold R. (2004). Identification of TFB5, a new component of general transcription and DNA repair factor IIIH. *Nat. Genet.*, **36**: 707-713.
- Reiter L.T., 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 euchromatic regions and has a dynamic response to U.V light-induced lesions in polytene chromosomes. *Mol. Biol. Cell*, **10**: 1191-203.
- Sambrook J., Fritsch E. y Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2a Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schultz, P., Fribourg S., Poterszman A., Mallouh V., Moras D., y Egly J.M. (2000). Molecular structure of Human TFIIH. *Cell*, **102**: 599-607.

- Shivji M.K., Moggs J.G., Kuraoka I. y Wood R.D. (1999). Dual incision assays for nucleotide excision repair using DNA with a lesion at a specific site. *Methods Mol. Biol.*, **113**: 373-392.
- Stallmeyer B., Drugeon G., Reiss J., Haenni A.L. y Mendel R.R. (1999). Human molybdopterin synthase Gene: Identification of a bicistronic transcript with Overlapping Reading Frames. *Am. J. Hum. Genet.*, **64**: 698–70.
- Steiner H., Campell A., Leimer U. y Haass C. (1999). Genes and mechanisms involved in β -amyloid generation and Alzheimer's disease. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.*, **249**: 266-270.
- Svejstrup, J. Q., Vichi, P., y Egly, J. M. (1996). The multiple roles of transcription/repair factor TFIIH *Trends Biochem. Sci.*, **21**: 346-350.
- Takagi Y., Komori H., Chang Wei-Hau, Hudmon A., Erdjument-Bromage H., Tempst P. y Kornberg R. (2003). Revised subunit structure of yeast TFIIH and reconciliation with human TFIIH. *J. Biol. Chem.*, **278**: 43897-43900.
- Takagi Y., Masuda C., Chang Wei-Hau., Komori H., Wang D., Hunter T., Joazeiro C. y Kornberg R. (2005). Ubiquitin ligase activity of TFIIH and the transcriptional response to DNA damage. *Mol. Cell*, **18**: 237-243.
- Tirode, F., Busso, D., Coin, F., y Egly, J.M. (1999). Reconstitution of the transcription factor TFIIH: assignment of functions for the three enzymatic subunits, XPB, XPD, and cdk7. *Mol. Cell*, **3**: 87–95.
- Tremeau-Bravard, A., Perez, C., y Egly, J. M. (2001). A Role of the C-terminal part of p44 in the promoter escape activity of transcription factor IIIH. *J. Biol. Chem.*, **276**, 27693–27697.
- Vermeulen W., Bergmann E., Auriol J., Rademakers S., Frit P., Appeldoorn E., Hoeijmakers J. y Egly J.M. (2000). Sublimiting concentration of TFIIH transcription/DNA repair factor causes TTD-A trichothiodystrophy disorder. *Nat. Genet.*, **26**: 307-313.
- Wall A., Phillips M. y Kelly E. (2005). Effective Translation of the Second Cistron in Two *Drosophila* Dicistronic Transcripts Is Determined by the Absence of In-frame AUG Codons in the First Cistron. . *J. Biol. Chem.*, **280**: 27670-27678.
- Wang X.W., Yeh H., Schaeffer L., Roy R., Moncollin V. Egly J.M. Wang Z., Friedberg E.C., Evans M.K., Taffe B.G., Bohr V.A., Weeda G., Hoeijmakers J.,

- Forrester K. y Harris C. (1995). p53 modulation of TFIIH-associated nucleotide excision repair activity. *Nat. Genet.*, **10**: 188-195.
- Watson J. y Crick F. (1953). Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nat.*, **171**: 737-738.
 - Winkler S., Araújo S., Fiedler U., Vermeulen W., Coin F., Egly J.M., Hoeijmakers J., Wood R., Timmers M., y Weed G., (2000). TFIIH with inactive XPD helicase functions in transcription initiation but is defective in DNA Repair. *J. Biol. Chem.*, **275**: 4258-4266.
 - Ye Q. y Worman H. (1995). Protein-protein interactions between human nuclear lamins expressed in yeast. *Experimental Cell Res.*, **219**: 292-298.
 - Zhou Y., Kou H. y Wang Z. (2007). Tfb5 interacts with Tfb2 and facilitates nucleotide excision repair in yeast. *Nucleic Acids Res.*, **35**: 861-871.
 - Zawel L. y Reinberg D. (1992). Advances in RNA polymerase II transcription. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **4**: 488-495.

XIII. APÉNDICES

A. Oligonucleótidos empleados para PCR

AD-p8, DNA BD-p8 y pBKS-p8

Oligo 5': ATG GAG GCC AGT GAA TTC ATG GTA AAT GTT ATG AAA GG

Oligo 3': ATC TGC AGC TCG AG CTC GAG CGT CCT TGT CGT GCA GCG G

AD-p52, GST-p52 y pBKS-p52

Oligo 5': GGG C GAA TT C ATG GCC GAC ACG AAA TCC GGT

Oligo 3': GGC TC GAG AAC ACC ACT C TT AGA GTA C TT CTT

AD-p18^(Hamlet), DNA-BD-p18^(Hamlet) y pBKS-p18^(Hamlet)

Oligo 5': ATG GAG GCC AGT GAA TTC ATG ACG GGT CGC GAA TC

Oligo 3': ATC TGC AG GTC GAC CTC GGG CCG TCC ACT TGA GGC AGC G

DNA-BD-p52

Oligo 5': GGG C GAA TTC ATG GCC GAC ACG AAA TCC GGT

Oligo 3': GG GTC GAC AAC ACC ACT C TT AGA G TA C TT CTT

His-p18^(Hamlet)

Oligo 5': TAA GGA TCC ACG GGT CGC GAA TCC AAC CGC

Oligo 3': ATT AAG CTT TCA GGC CGT CCA CTT GAG GCA

His-p52

Oligo 5': TAA GGA TCC GCC GAC ACG AAA TCC GGT AGT

Oligo 3': ATT AAG CTT CTA AAC ACC ACT CTT AGA GTA

p8-His

Oligo 5': TAA CCA TGG TAA ATG TTA TGA AAG GAG TGC

Oligo 3': ATT AGA TCT AGC GTC CTT GTC GTG CAG CGG