



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

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

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular

“DINÁMICA DE LAS SUBUNIDADES DmP8 Y DmP52 DE TFIIH  
DURANTE EL DESARROLLO Y EN  
RESPUESTA A DAÑO AL ADN EN *Drosophila melanogaster*”

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

BIOL. MANDY JUÁREZ RODRÍGUEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. MARIO E. ZURITA ORTEGA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

INTEGRANTES DE COMITÉ TUTOR:

DRA. SVETLANA SHISHKOVA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

DR. CRISTOPHER WOOD  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

MÉXICO, DF

FEBRERO 2014



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.

**Con todo mi amor a la persona  
que ha sido y seguirá siendo mi maestro  
Se que algún día nos volveremos a ver  
Antonio Juárez Huerta**

## **AGRADECIMIENTOS**

**A mis padres: Zenaida Rodríguez y Rafael Juárez por todo su apoyo, amor incondicional y por confiar en mí. Porque todo lo que soy y todo lo que tengo se los debo a ellos.**

**A mis hermanos: Rafa Juárez y Beto Juárez por cuidarme y ser el motor que me impulsa a seguir.**

**A mis tíos: Verónica Juárez y Luis Flores por su apoyo y excelentes consejos que me han orientado en todo momento.**

**A mis abuelos: Virginia Hoyos, Margarita Huerta, Miguel Juárez por ser el pilar de la familia y por compartir tantas experiencias de vida conmigo.**

**A mis primos: Viri, Moni, Jacquie, Osvaldo, Caro e Iván por ser parte de mi vida y por darme tantas buenas lecciones de vida.**

**Al Dr. Mario Zurita por permitirme ser parte de su excelente equipo de trabajo, por confiar en mí, por compartir tanto conocimiento y por ser el mejor jefe del mundo.**

**A Grisel Cruz por su amistad, por todas sus enseñanzas, consejos y críticas constructivas.**

**A mi comité tutorial: Dra. Svetlana y el Dr. Wood por sus excelentes críticas y correcciones.**

**Al LNMA: Andrés Saralegui y Arturo Pimentel por ayudarme a conseguir tan magníficas imágenes y videos.**

**A todas las Zuritas: Cinthya, Gris, Aly, Dafne, Mari Tere, Silvia, por tantos buenos momentos que hemos vivido.**

**A mi mejor amiga: Cinthya Gurrión, por su amistad incondicional, por apoyarme y estar conmigo en las buenas, en las malas y por no dejarme caer en las peores. Mil gracias por hacer de esta aventura algo simplemente excepcional.**

**A esa persona especial que a lo largo de estos 4 años ha sido parte fundamental en mi vida, gracias por creer en mí. Porque sólo tú y yo sabemos estar distantemente juntos. Te adoro...Francisco J. Acevedo Barranco**

## ÍNDICE GENERAL

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 El Factor de Transcripción IIIH .....	1
1.2 El papel de TFIIH en la transcripción .....	2
1.3 El papel de TFIIH en la reparación por escisión de nucleótidos .....	4
1.4 El papel de TFIIH en el ciclo celular .....	6
1.5 <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo de estudio .....	7
1.6 Desarrollo embrionario de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	8
1.7 Espermatogénesis en <i>Drosophila melanogaster</i> .....	9
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>12</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	<b>19</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
4.1 General .....	20
4.2 Particulares .....	20
<b>5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b> .....	<b>21</b>
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>22</b>
6.1 Rescate de los fenotipos de letalidad y semi-letalidad con el transgen YFP-DmP52 .....	22
6.2 Western blot .....	23
6.3 Visualización de embriones transgénicos <i>in vivo</i> .....	23
6.4 Visualización de glándulas salivales transgénicas <i>in vivo</i> .....	24
6.5 Purificación del anticuerpo DmP52 (vo397) .....	24
6.6 Inmunotinción de embriones .....	24
<b>7. RESULTADOS</b> .....	<b>26</b>
7.1 El transgén YFP-DmP52 rescata la condición letal de la inserción EP3605 homóciga .....	26
7.2 La línea rescatada expresa la proteína de fusión YFP-DmP52 .....	28
7.3 El transgén YFP-DmP52 complementa la disminución de DmP52 en un fondo heteroalélico de DmP52 .....	30
7.4 La proteína YFP-DmP52 se expresa durante el desarrollo embrionario temprano .....	33

7.5 La proteína YFP-DmP52 tiene una localización nuclear y citoplásmica durante el desarrollo embrionario temprano.....	35
7.6 Inmunotinciones de embriones silvestres para visualizar a la proteína DmP52 endógena .....	37
7.7 La proteína DmP8-CFP se expresa durante el desarrollo embrionario temprano.....	37
7.8 La proteína DmP8-CFP tiene una localización nuclear y citoplásmica durante el desarrollo embrionario temprano.....	38
7.9 Las proteínas YFP-DmP52 y DmP8-CFP tienen la misma localización durante el desarrollo embrionario temprano .....	40
7.10 La proteína DmP8-CFP pierde su localización particular en los espermatoцитos primarios en un fondo mutante de DmP52 .....	41
7.11 Las proteínas YFP-DmP52 y DmP8-CFP se localizan en los núcleos de glándulas salivales de larvas de tercer instar .....	43
7.12 Dinámica de la proteínas YFP-DmP52 y DmP8-CFP en respuesta al ADN por luz UV .....	45
<b>8. DISCUSIÓN .....</b>	<b>48</b>
8.1 Los trasngénes YFP-DmP52 y DmP8-CFP son completamente funcionales.....	48
8.2 Las proteínas YFP-DmP52 y DmP8-CFP tienen una localización nuclear y citoplásmica durante el desarrollo embrionario temprano.....	50
8.3 La localización de la proteína DmP8-CFP en los espermatoцитos primarios es dependiente de DmP52 .....	51
8.4 Las proteínas YFP-DmP52 y DmP8-CFP tienen una dinámica distinta durante la reparación del ADN .....	51
<b>9. CONCLUSIONES .....</b>	<b>54</b>
<b>10. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>55</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>56</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Componentes, funciones y actividades enzimáticas del factor de transcripción II H.....	1
Figura 2. Modelo de la regulación del inicio de la transcripción por la ARN polimerasa II .....	3
Figura 3. Modelo de la Reparación por Escisión de Nucleótidos (REN).....	5
Figura 4. Modelo esquemático del mecanismo de activación de las cinasas dependientes de ciclina (Cdks) .....	6
Figura 5. Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	8
Figura 6. Espermatogénesis de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	11
Figura 7. Dinámica de los subcomplejos de TFIIH durante el desarrollo embrionario temprano.....	13
Figura 8. Defectos en el desarrollo embrionario temprano en organismos DmP8 nulos .....	14
Figura 9. Localización de la proteína DmP8 durante la mitosis.....	15
Figura 10. La espermatogénesis se detiene en el estadio de espermatocitos primarios en organismos nulos para DmP8 .....	16
Figura 11. Esquema de las mutaciones en la proteína DmP52 ( <i>EP3605</i> y <i>mrn5</i> ).....	17
Figura 12. YFP-DmP52 se expresa en la línea rescatada .....	28
Figura 13. Expresión de DmP52 en las moscas de tipo silvestre y transgénicas .....	29
Figura 14. Restablecimiento de los niveles proteicos en un fondo mutante de	

DmP52 y en un fondo rescatado con YFP-DmP52 .....	33
Figura 15. La localización de la proteína YFP-DmP52 se debe a la proteína DmP52 y no a la proteína YFP .....	34
Figura 16. Localización de la proteína YFP-DmP52 durante el desarrollo embrionario temprano.....	36
Figura 17. Patrón de localización de la proteína DmP8-CFP.....	38
Figura 18. Localización de la proteína DmP8-CFP durante el desarrollo embrionario temprano.....	39
Figura 19. Dinámica de las proteínas YFP-DmP52 y DmP8-CFP durante el desarrollo embrionario temprano.....	40
Figura 20. Localización de las proteínas YFP-DmP52 y DmP8-CFP en testículos, con fondos mutantes para DmP8 y DmP52 .....	42
Figura 21. La proteína DmP8-CFP no se degrada en testículos mutantes para DmP52.....	43
Figura 22. Las proteínas de fusión YFP-DmP52 y DmP8-CFP se localizan en los núcleos de glándulas salivales de larvas de tercer instar.....	44
Figura 23. Dinámica de la proteína YFP-DmP52 en respuesta a daño al ADN por luz UV .....	46
Figura 24. Dinámica de la proteína DmP8-CFP en respuesta a daño al ADN por luz UV .....	47

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Porcentaje de supervivencia de las clases rescatadas con el transgén	
YFP-DmP52 en la progenie de la crucea YFP-DmP52/CyO;EP3505/TM2 .....	26
Tabla 2. Porcentaje de supervivencia de organismos heteroalélicos de la	
crucea SP/CyO;EP3505/TM6B x SP/CyO;mrn5/TM6B .....	30
Tabla 3. Porcentaje de supervivencia de organismos heteroalélicos rescatados	
de la crucea YFP-DmP52;EP3605/TM6B x YFP-DmP52;mrn5/TM6B .....	31

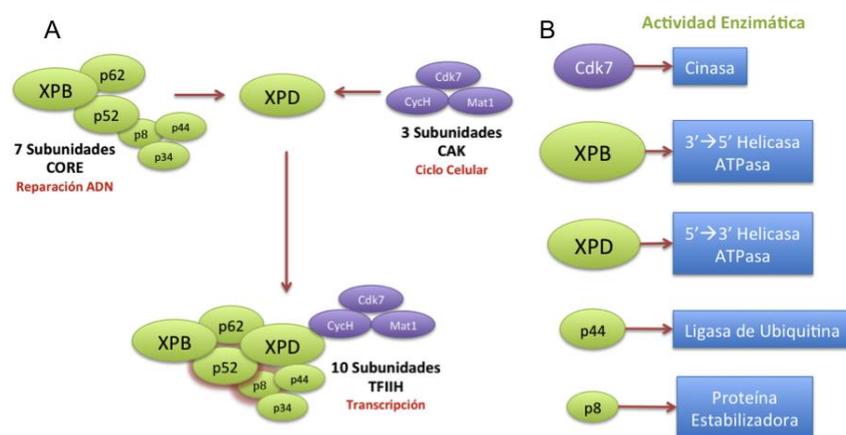
## RESUMEN

El factor de transcripción-reparación IIIH (TFIIH) está compuesto por 10 proteínas (XPD, XPB, p44, p34, p52, p62, p8, Cdk7, CycH y MAT1) y está conservado desde levaduras hasta humanos. Participa en la regulación de la transcripción, la reparación del ADN y en el control del ciclo celular. Sabemos que las proteínas p8 y p52 interactúan físicamente, sin embargo, la función de esta interacción dentro de TFIIH es desconocida. En estudios previos hemos observado que organismos nulos para p8 presentan defectos en las divisiones mitóticas embrionarias y la espermatogénesis se detiene en el estadio de espermatozoides primarios. De manera similar, organismos que tienen niveles reducidos de p52 presentan los mismos defectos durante la espermatogénesis. En este trabajo describimos por primera vez la dinámica *in vivo* de p8 y p52 durante divisiones mitóticas que ocurren en el desarrollo embrionario temprano y en la espermatogénesis de *Drosophila melanogaster*, usando moscas transgénicas que expresan a p8 y p52 fusionadas a CFP y YFP respectivamente. En el estadio de blastodermo sincicial observamos que ambas proteínas permanecen en el núcleo durante la profase y metafase, al final de la anafase comienzan a dirigirse hacia el citoplasma, en la telofase son completamente citoplásmicas y finalmente, al inicio de la interfase del siguiente ciclo mitótico se localizan nuevamente en el núcleo. Estos datos y los defectos mitóticos previamente observados pueden sugerir un posible papel de estas proteínas en la mitosis durante la embriogénesis. Sin embargo, más estudios son necesarios para confirmar esta hipótesis. Por otra parte, en testículos p8-CFP y YFP-P52 se localizan en el núcleo y nucleólo de los espermatozoides primarios y parece colocalizar con los cromosomas bivalentes durante la meiosis en estas células. En organismos mutantes para p52, la localización de p8-CFP en testículos se ve afectada y mediante ensayos tipo western blot observamos que los niveles de otros componentes de TFIIH disminuyen. Sin embargo, no ocurre lo mismo en organismos mutantes para p8. Esto sugiere que p52 es importante para mantener la estabilidad de TFIIH en la mosca y no p8 como ha sido reportado en células humanas.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 El Factor de transcripción IIIH

El factor de transcripción IIIH (TFIIH) es un complejo que consta de diez proteínas que pueden ser divididas en dos subcomplejos: el “core” compuesto por p8, p34, p44, p52, p62, XPB y XPD, y el subcomplejo “CAK” formado por Cdk7, CycH y MAT1 (Gigliamari *et al.*, 2004). TFIIH interviene en tres procesos fundamentales para la célula: 1) Las proteínas del “core” intervienen en la reparación por escisión de nucleótidos del ADN (REN), 2) El subcomplejo “CAK” participa en el control del ciclo celular, 3) Ambos subcomplejos participan junto con las ARN polimerasas II y I en el inicio y elongación de la transcripción (Nonnekens *et al.*, 2013; Assafalg *et al.*, 2011). Algunas de las proteínas que componen a TFIIH tienen varias actividades enzimáticas, XPB y XPD son helicasas/ATPasas de ADN y se ha descrito que la subunidad XPD interacciona con MMS19 en el complejo MMXD, el cual es requerido para correcta segregación cromosomal (Ito *et al.*, 2010), Cdk7 es una cinasa, mientras que se ha reportado que la subunidad p44 tiene actividad, *in vitro*, de ligasa de ubiquitina (Takagi *et al.*, 2005). La subunidad p52 regula la actividad ATPasa de XPB, así como su ensamblaje al complejo. Por otra parte, a pesar de que no se le ha atribuido alguna actividad enzimática a la subunidad p8, se sabe que en células humanas, esta proteína contribuye a la estabilidad de TFIIH en la célula (Cleaver, 2005) (Figura 1).

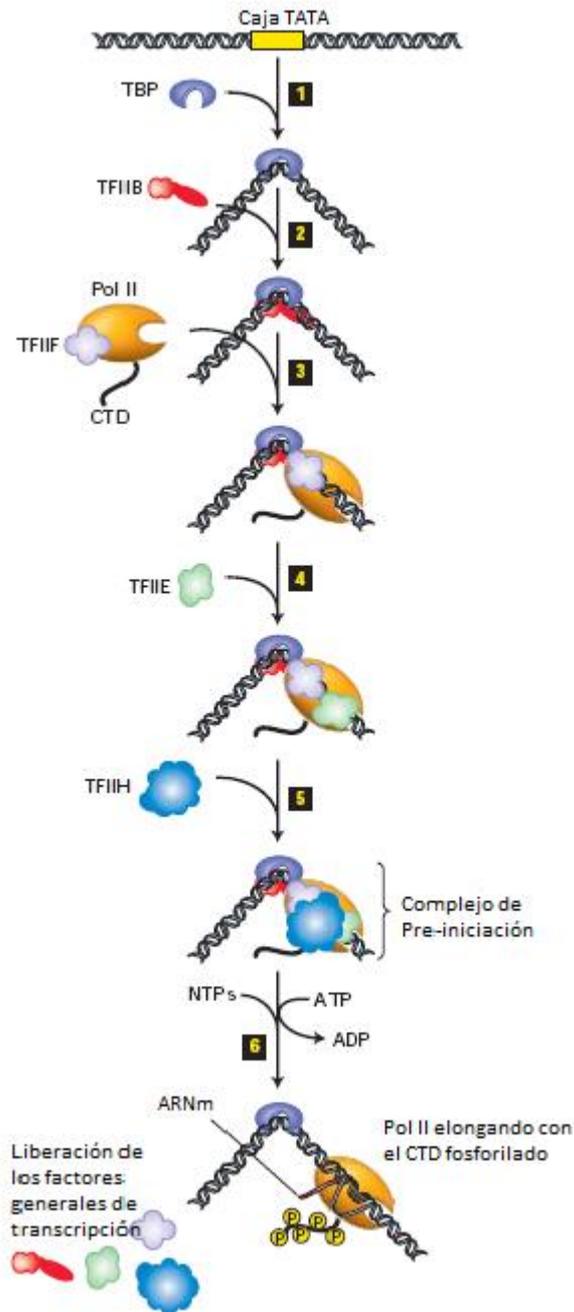


**Figura 1. Componentes, funciones y actividades enzimáticas del factor de transcripción IIIH.** A) TFIIH está compuesto por diez proteínas: p8, p34, p44, p52, p62, XPB y XPD conforman el subcomplejo “core”, el cual participa en la reparación del ADN. Por otra parte,

Cdk7, CycH y MAT1 conforman el subcomplejo CAK, el cual participa en el control del ciclo celular. En conjunto ambos subcomplejos participan en la regulación de la transcripción. B) A cuatro de las subunidades de TFIIH se le han descrito actividades enzimáticas: XPB y XPD son helicinas/ATPasas de ADN, Cdk7 es una cinasa y la subunidad p44 tiene actividad de ligasa de ubiquitina. Finalmente a la subunidad p8 no se le ha descrito ninguna actividad enzimática pero se ha reportado que le confiere estabilidad a TFIIH. (Giglia-Mari *et al.*, 2004; Nonnekens *et al.*, 2013; Assafalg *et al.*, 2011).

## 1.2 El papel de TFIIH en la transcripción

Para que la transcripción pueda llevarse a cabo es necesario que se ensamble el Complejo de Preiniciación de la Transcripción (PIC). Este complejo está formado por la ARN Polimerasa II (ARN Pol II) y los Factores Generales de Transcripción (FGT's) que son TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF y TFIIH (Rossignol *et al.*, 1997). El primer paso para el ensamblaje de PIC es el reconocimiento de la caja TATA por la "proteína de unión a la caja TATA" (TBP) la cual es parte del Factor de Transcripción IID. (Kim *et al.*, 2005). Una vez que el complejo TBP-ADN se ha formado, TFIIA y TFIIB son reclutados; TFIIA está compuesto por las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ , siendo el factor que incrementa la probabilidad de que el promotor sea reconocido de manera precisa (Coleman *et al.*, 1999). TFIIB es un único polipéptido de 316 residuos de aminoácidos que incrementa la unión de TBP a la caja TATA (Imbalzano *et al.*, 1994). Posteriormente, se une TFIIF, lo cual permite la unión de la ARN Pol II al PIC (Dvir *et al.*, 2001). El siguiente factor en unirse al complejo es TFIIE, el cual permite que TFIIH sea reclutado. De esta manera queda completamente ensamblado el PIC. Tanto TFIIE como TFIIH son requeridos para la formación el complejo abierto necesario para la formación del primer enlace fosfodiéster, el cual es el primer paso en la transcripción. Las actividades de helicasa/ATPasa de TFIIH, en sus subunidades XPB y XPD, permiten que las cadenas de ADN se separen y Cdk7 fosforila el dominio carboxilo terminal (CTD) de la subunidad mayor de la ARN pol II, en particular las serinas número 5 y 7 del heptapéptido que se encuentra repetido varias veces. Esta fosforilación es requerida para que la ARN pol II se desprenda del promotor y comience la elongación, así como para el reclutamiento de la maquinaria de splicing. (Rossignol *et al.*, 1997; Zurita and Merino, 2003; Dahmus, 1995) (Figura 2).



**Figura 2. Modelo de la regulación del inicio de la transcripción por la ARN polimerasa II**

1) Para que se inicie la transcripción es necesario que TBP, un componente de TFIID, se una a la caja TATA del gen que se va a transcribir. 2) Posteriormente se une TFIIB quien refuerza la unión de TBP a la caja TATA. 3) TFIIF es reclutado y esto permite la incorporación de la ARN polimerasa. 4) Cuando TFIIE se incorpora, permite el reclutamiento de TFIIF quedando completo el complejo de pre-iniciación. 5 y 6) TFIIF abre la cadena de ADN alrededor del promotor y fosforila el CTD de la RNA polimerasa. Finalmente los factores de transcripción se desprenden del complejo permitiendo que comience la elongación. (Tomado de Lodish, 2004.5th Ed.)

### 1.3 El papel de TFIIH en la reparación por escisión de nucleótidos

Uno de los mecanismos de reparación del ADN que tienen los organismos eucariotas es la Reparación por Escisión de Nucleótidos (REN). Este mecanismo remueve lesiones que afectan la estructura del ADN, como los dímeros ciclobutano de pirimidina (CPD's) y los 6-4 fotoproductos (6-4 PP's) generados por agentes químicos y por la luz ultravioleta (Lindahl *et al.*, 1997). REN ocurre en dos regiones diferentes del genoma: en las regiones no transcritas, proceso denominado Reparación Global del Genoma (RGG), y en las regiones transcritas proceso conocido como Reparación Acoplada a la Transcripción (RAT) (Hanawalt, 2002).

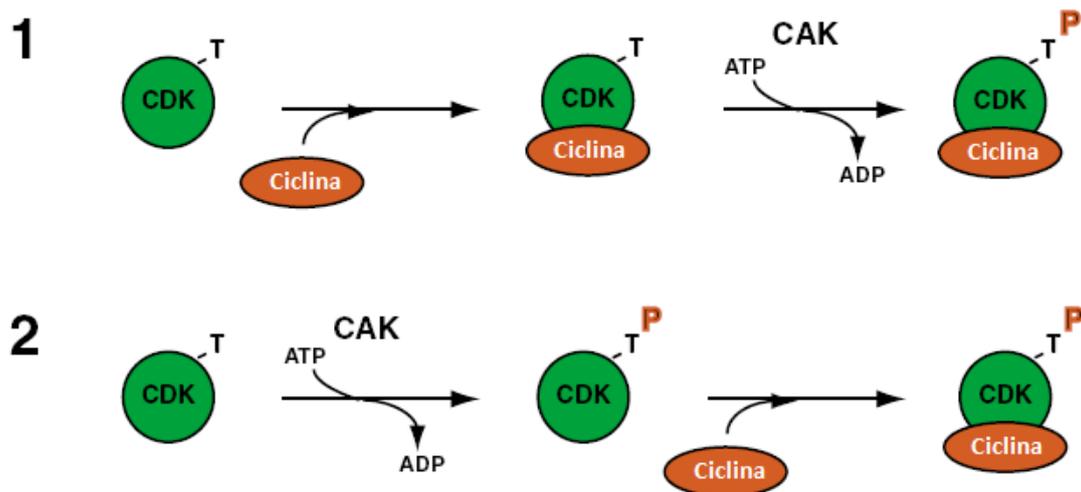
Un primer paso en ambos procesos es el reconocimiento del daño al ADN. En las regiones del genoma que no son transcritas, el complejo DDB y el complejo XPC-HHR23B-centrina reconocen las distorsiones en la molécula de ADN (Sugasawa *et al.*, 2005). Enseguida XPC recluta a TFIIH y a XPG, las subunidades XPB y XPD de TFIIH tienen la actividad de helicasa/ATPasa, por lo que, TFIIH se encarga de abrir las hebras de ADN (Zurita and Merino, 2003). Una vez separadas las cadenas de ADN se favorece la llegada de XPA y RPA, estas proteínas estabilizan la burbuja de ADN abierto alrededor del daño (Evans *et al.*, 1997). Posteriormente, XPG y XPF, con actividad endonucleasa, cortan en el sitio dañando; XPG corta en sentido 3' y XPF corta en sentido 5' (Sijbers *et al.*, 1996). El espacio generado por este corte es llenado por la acción de PCNA, RFC y la ADN polimerasa; finalmente las cadenas de ADN son unidas por una ADN ligasa (Lindhal *et al.*, 1997). En las regiones del genoma que son transcritas, el daño causado al ADN por luz UV es reconocido por las proteínas CSA y CSB las cuales reclutan a la maquinaria de reparación. Después de esto ocurre un mecanismo similar al de RGG como se ilustra en la figura 3 (Le Page *et al.*, 2000). De manera muy interesante, durante el proceso de reparación el subcomplejo CAK de TFIIH se desprende del subcomplejo core. Este proceso es catalizado por XPA, una vez que el daño ha sido reparado el subcomplejo CAK se reincorpora a TFIIH. Este hecho se ha observado en células humanas y en cromosomas politénicos de glándulas salivales de *Drosophila melanogaster* (Coin *et al.*, 2008; Juárez, datos no publicados).



recluta a TFIIH y las subunidades XPB y XPD desenrollan el DNA alrededor de la lesión hasta formar una burbuja estabilizada por RPA y XPA. Las endonucleasas XPG y XPF/ERCC1 liberan el fragmento que contiene el DNA dañado, enseguida el espacio generado por este corte es llenado por la acción de PCNA, RFC y la ADN polimerasa. Finalmente las cadenas de ADN son unidas por una ADN ligasa. Durante la TCR las proteínas CSA y CSB, son las encargadas de reconocer a la RNA pol II incapaz de continuar con la elongación y reclutan a la maquinaria de reparación, posteriormente ocurre un mecanismo similar al de GGR. (Modificado de Kraemer *et al.*, 2007).

#### 1.4 El papel de TFIIH en el ciclo celular

El ciclo celular está regulado por la acción sucesiva de diferentes cinasas dependientes de ciclina (Cdks) (Nigg, 1995). La actividad de las Cdks está regulada positiva y negativamente por su asociación con ciclinas, así como, por eventos de fosforilación y defosforilación (Morgan, 1995). La activación completa de las Cdks requiere la fosforilación de un residuo conservado de treonina localizado en el “T-loop”, un sustrato común para todas las Cdks y muchas otras cinasas. En moléculas de Cdks monoméricas inactivas, el “T-loop” bloquea el sitio catalítico y obstaculiza la unión del sustrato. El complejo activador de cinasas dependientes de ciclina (“cdk-activating kinase” o CAK) fosforila a diferentes tipos de cinasas en su residuo de treonina durante el ciclo celular (Matsuoka *et al.*, 1994) (Figura 4).



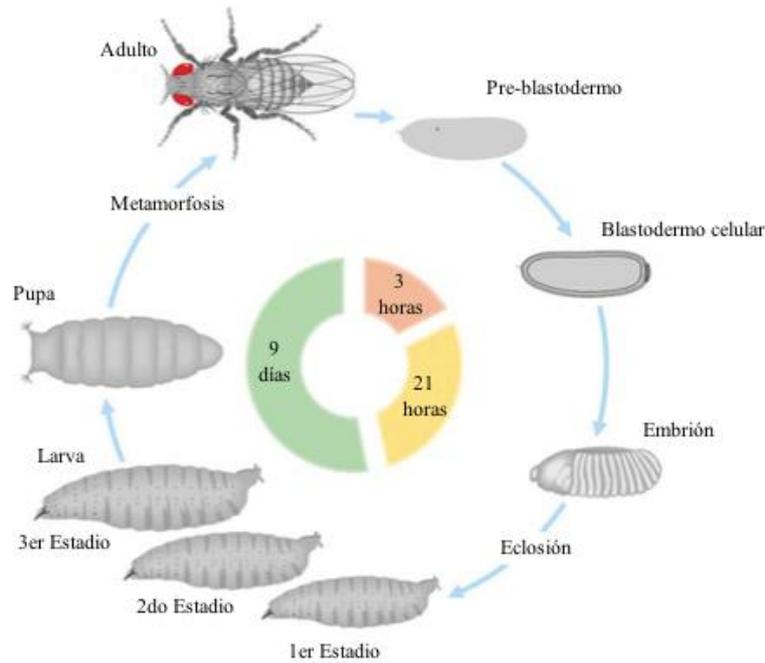
**Figura 4. Modelo esquemático del mecanismo de activación de las cinasas dependientes de ciclina (Cdks).** 1) Unión de una ciclina para formar un complejo inactivo precede a la

fosforilación del T loop por CAK. Este es el mecanismo seguido para la activación del complejo de CDK1-ciclinaB por CDK7 en células animales. 2) CAK fosforila el T loop de CDK, el cual se activa después de la unión de una ciclina (Tomado de Fisher, 2005).

Interesantemente, experimentos recientes han demostrado que en *D. Melanogaster* las subunidades p52 y XPB del subcomplejo “core” de TFIID, en conjunto con la subunidad Cdk7 del subcomplejo CAK, son requeridas para la transición de la fase G1/S del ciclo celular. Esto sugiere que la integración del subcomplejo “core” de TFIID es requerida para regular la progresión del ciclo celular (Matsuno *et al.*, 2007).

### **1.5 *Drosophila melanogaster* como modelo de estudio**

La mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* es un organismo que se utiliza frecuentemente en la investigación científica debido a que presenta muchas ventajas. Es un animal pequeño fácil de manejar, produce un elevado número de descendientes, es fácil de cultivar en el laboratorio con un costo de mantenimiento relativamente bajo. Es un modelo eucariota de alta complejidad con únicamente 4 pares de cromosomas: los cromosomas sexuales Y y X (I) y los cromosomas autosomales (II, III, IV) (Petitpierre, 1997). Las glándulas salivales de las larvas presentan cromosomas politénicos, que son de gran utilidad en estudios citogenéticos. Se disponen de muchas técnicas y herramientas para manipular la expresión genética, pudiéndose generar diversas mutaciones en este organismo (Matthews *et al.*, 2005). Su genoma está muy bien estudiado y su ciclo de vida es corto 20 días a 25°C (Figura 5). Las características principales del ciclo de vida de *D. melanogaster* son un periodo muy rápido de embriogénesis que se completa 24 horas después de la fertilización, seguido por tres periodos de crecimiento como larva antes de sufrir una metamorfosis y finalmente la eclosión de un organismo adulto.



**Figura 5. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.** Tres horas después de la fertilización del huevo comienza la celularización del embrión, durante este periodo comienza la transcripción global del embrión. Transcurridas 24 horas entra al primer estadio larvario, al que le siguen otros dos, durante estos estadios la larva se alimenta e incrementa su tamaño. En el tercer estadio larvario se prepara para pupar y finalmente después de 10 días eclosiona un organismo adulto listo para poder reproducirse. (Tomado de Morgan, 1999).

### 1.6 Desarrollo embrionario temprano de *Drosophila melanogaster*

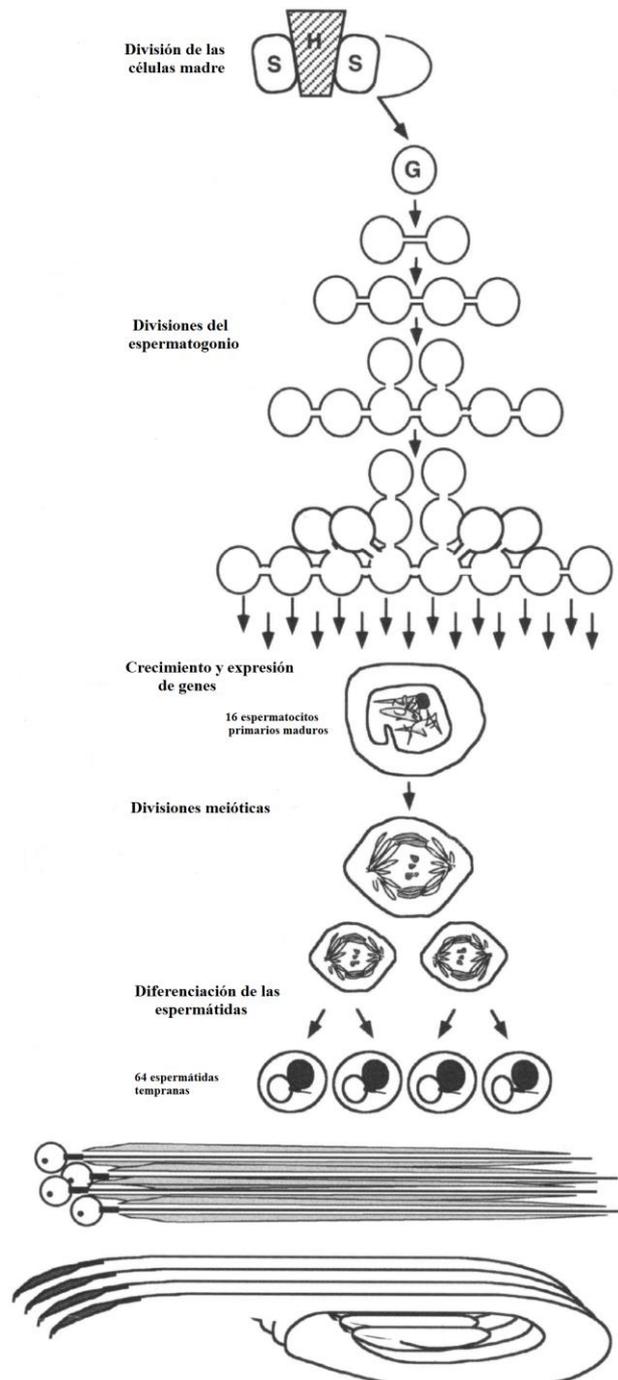
El desarrollo embrionario temprano de *Drosophila melanogaster* comprende las tres primeras horas posteriores a la fecundación del huevo. Como en otros organismos durante este periodo no hay transcripción cigótica global, de manera que las proteínas y la mayor parte del ARNm que el embrión necesita para su desarrollo son depositados por herencia materna. La embriogénesis comienza con 13 divisiones mitóticas sin división celular, en donde los ciclos celulares únicamente comprenden las etapas de síntesis (S) y mitosis (M) y los núcleos se dividen y mueven en un citoplasma común. A esta célula multinucleada se le conoce como sincicio. Las primeras nueve divisiones mitóticas son sincrónicas, a este estadio se le llama preblastodermo y en las divisiones 10, 11, 12 y 13 se pierde ésta sincronía, los núcleos comienzan a dividirse desde los polos hacia el ecuador del embrión, a este estadio se denomina blastodermo sincicial.

Durante el ciclo diez se forman las células polares en el lado posterior del embrión, estas células constituyen las líneas progenitoras germinales. También durante este ciclo los núcleos comienzan a migrar del centro a la periferia del embrión. En el ciclo 14 la membrana plasmática incrementa su tamaño y se invagina entre los núcleos dando origen a células independientes, a esta etapa se le conoce como celularización y es en este estadio cuando comienza la transcripción cigótica global del embrión (Foe *et al.*, 1993). Inmediatamente después de que el proceso de celularización termina comienza la gastrulación en donde se forman las tres capas germinales: endodermo, mesodermo y ectodermo, las cuales van a dar origen a los órganos y tejidos del organismo adulto (Browder *et al.*, 1991).

### **1.8 Espermatogénesis en *Drosophila melanogaster***

La espermatogénesis inicia en el eje apical del testículo, en esta zona se encuentran 8 o 9 células madre germinales que se encuentran rodeadas por 16 o 18 células progenitoras del quiste, las cuales son derivadas somáticamente (Kiger *et al.*, 2001). Las células madre se dividen asimétricamente originando otra célula madre y a un espermatogonio primario. De igual manera las células progenitoras del quiste se dividen asimétricamente, generando dos células quiste que enquistan al espermatogonio primario. El espermatogonio primario sufre una primera ronda de división mitótica en donde se genera un espermatogonio secundario, el cual entra en 4 rondas de división mitótica generando 16 espermátocitos primarios, durante estas divisiones no ocurre la citocinesis y por lo tanto se forma un sincicio (Giansanti *et al.*, 2012). Los espermátocitos primarios entran en una fase de crecimiento en donde aumentan su tamaño 20-25 veces. Después de este periodo de crecimiento los 16 espermátocitos primarios de cada quiste, se dividen dos veces meióticamente produciendo 64 espermátidas redondas. Durante la meiosis I y II cada espermátida recibe el mismo complemento de cromosoma haploide y la misma cantidad de mitocondrias (Fuller, 1993). Después de que la meiosis II se completa las células entran en el estadio denominado “onion stage”, durante este estadio las mitocondrias de los espermátocitos se fusionan en dos derivados mitocondriales muy grandes los cuales se entrelazan formando una estructura denominada cuerpo de Nebenkern (Tokuyasu *et al.*, 1975).

Durante los estadios finales de la espermatogénesis el cuerpo de Nebenkern y el núcleo de las espermátidas en desarrollo sufren un remodelamiento drástico (Fabrizio *et al.*, 1998). El derivado mitocondrial empieza a desplegarse hacia abajo por el axonema y llegará a convertirse en el flajelo, este estadio se conoce como “comet stage”. Durante la etapa tardía de elongación del flagelo la forma esférica del núcleo de las espermátidas también se transforma a una estructura que asemeja un gancho largo y delgado como aguja, a este estadio se le conoce como “canoe stage”. En este estadio la cromatina se condensa y el volumen del núcleo disminuye considerablemente (Rathke *et al.*, 2007). Finalmente, la individualización de cada célula espermática comienza, el proceso de individualización se inicia en la cabeza del quiste de espermátidas, durante este proceso, se elimina la mayor parte del citoplasma de la espermátida, se pierden las conexiones de las espermátidas en un quiste y cada uno de los espermatozoides resultantes se envuelve en su propia membrana plasmática (Fuller, 1993). (Figura 6)

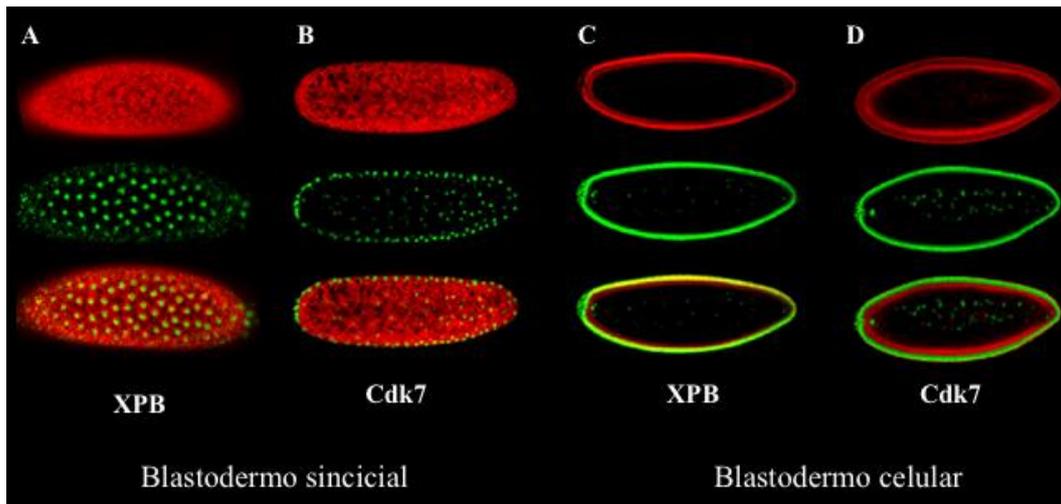


**Figura 6. Espermatogénesis de *D. melanogaster*.** La espermatogénesis comienza con la división de una célula madre germinal que produce otra célula madre y un espermatogonio primario, el cual pasa por 4 rondas de división mitótica sin citocinesis, generando un sincicio. El resultado son 16 células denominadas espermatocitos primarios que posteriormente entran en dos rondas meiosis para generar un quiste con 64 espermátidas haploides interconectadas unas con otras. Las espermátidas sufren cambios morfológicos dramáticos. Para el final de la espermatogénesis, las espermátidas completamente elongadas sufren un proceso de individualización (Fuller, 1993).

## 2. ANTECEDENTES

*Drosophila melanogaster* es un organismo que se utiliza frecuentemente como modelo en estudios que se relacionan con enfermedades en humanos, esto es debido a que aproximadamente el 70% de los genes relacionados con enfermedades humanas tienen su homólogo en el genoma de este organismo (Reiter *et al.*, 2001).

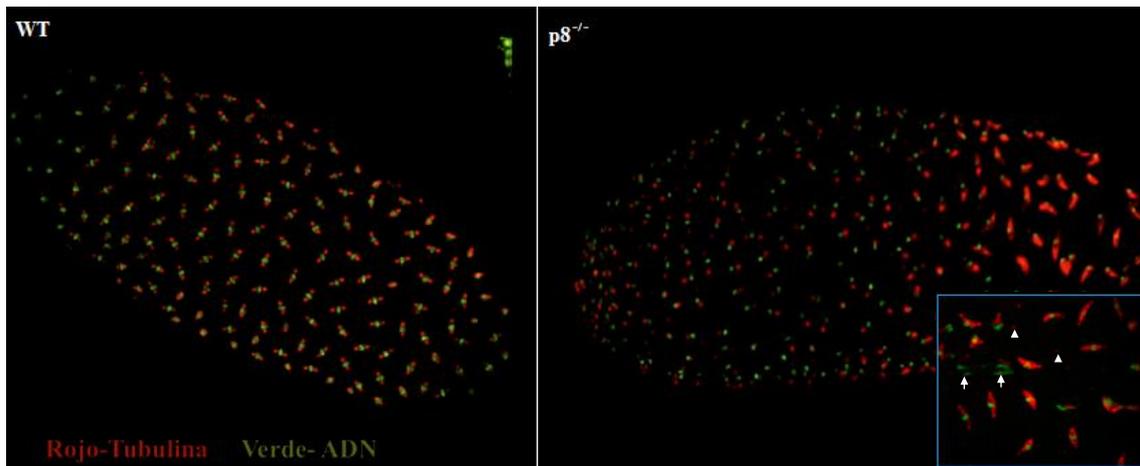
Usando a *Drosophila* como modelo, en nuestro grupo se están estudiando los procesos de transcripción y reparación del ADN, así como la relación que hay entre los defectos de estos procesos y algunas enfermedades en humanos. Hemos analizado la distribución sub-celular de algunas de las subunidades de TFIID y se observó que es altamente dinámica (Reynaud *et al.*, 1999; Aguilar *et al.*, 2006). Por ejemplo, las helicasas del subcomplejo core, XPB y XPD, así como las subunidades Cdk7 y MAT1 del subcomplejo CAK se mantienen en el citoplasma hasta antes de que se active la transcripción cigótica en el embrión en el estadio de blastodermo sincicial. Cuando la transcripción se activa, durante el estadio de blastodermo celular, XPB y XPD se localizan en el núcleo. Los componentes del subcomplejo CAK, Cdk7 y MAT1 se mantienen en el citoplasma aún en el momento de la activación de la transcripción cigótica. Sin embargo, mediante ensayos de inmunoprecipitación en fracciones nucleares y citoplasmáticas de embriones tempranos observamos que aunque los componentes del subcomplejo core son preferentemente nucleares en el estadio de blastodermo celular, también están en el citoplasma y que aunque los componentes del subcomplejo CAK son preferentemente citoplasmáticos, también se encuentra en el núcleo (Aguilar *et al.*, 2006) (Figura 7). La dinámica del resto de las subunidades de TFIID durante la embriogénesis no ha sido descrita hasta el momento.



**Figura 7. Dinámica de los subcomplejos de TFIID durante el desarrollo embrionario temprano.** A-B) Inmunotinción de embriones en el estadio de blastodermo sincicial. En rojo se muestra la señal de los anticuerpos de XPB y Cdk7, que son componentes de los subcomplejos core y CAK respectivamente. En verde se muestra la tinción con sytox. Se observa que ambas proteínas son citoplasmáticas en este estadio. C-D) Inmunotinción de embriones en el estadio de blastodermo celular. En rojo se muestra la señal de los anticuerpos de XPB y Cdk7. En verde se muestra la tinción con sytox. Se observa que cuando la transcripción cigótica se activa durante el estadio de blastodermo celular, XPB se localiza preferentemente en el núcleo, en contraparte Cdk7 se mantiene en el citoplasma. La misma localización es observada para las proteínas XPD y MAT1, otros componentes de los subcomplejos core y CAK de TFIID. (Modificado de Aguilar *et al.*, 2006).

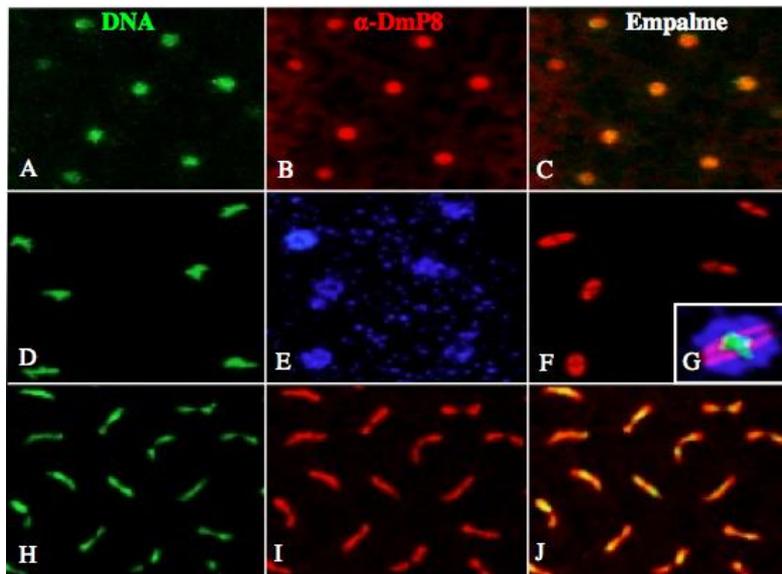
En estudios recientes caracterizando a la subunidad DmP8 en *Drosophila* encontramos que una mutación nula en esta subunidad de TFIID es semi-letal, es decir solo nacen alrededor del 30% de los individuos esperados. Interesantemente, los machos son estériles, las hembras son semi-fértiles y llegan a depositar algunos huevos de los cuales una proporción se desarrolla normal, mientras que otra proporción que avanza muy poco en el desarrollo (Herrera *et al.*, 2012). El hecho de que hembras nulas para DmP8 depositen huevos que inician el desarrollo es muy interesante ya que estos embriones no contienen a DmP8 y el que únicamente un bajo porcentaje se desarrolle normalmente muestra que DmP8 es importante para la embriogénesis temprana (Cruz, datos no publicados). El fenotipo que hemos podido detectar en los embriones es que durante las divisiones mitóticas sincronizadas que ocurren en el blastodermo sincicial, los

cromosomas no se segregan de manera adecuada, lo que genera regiones del embrión que no tienen cromosomas. Además, hay una deformación del huso acromático, centrosomas aislados sin huso acromático y por lo tanto sin cromosomas unidos a este. También observamos defectos en la condensación de los cromosomas (Figura 8).



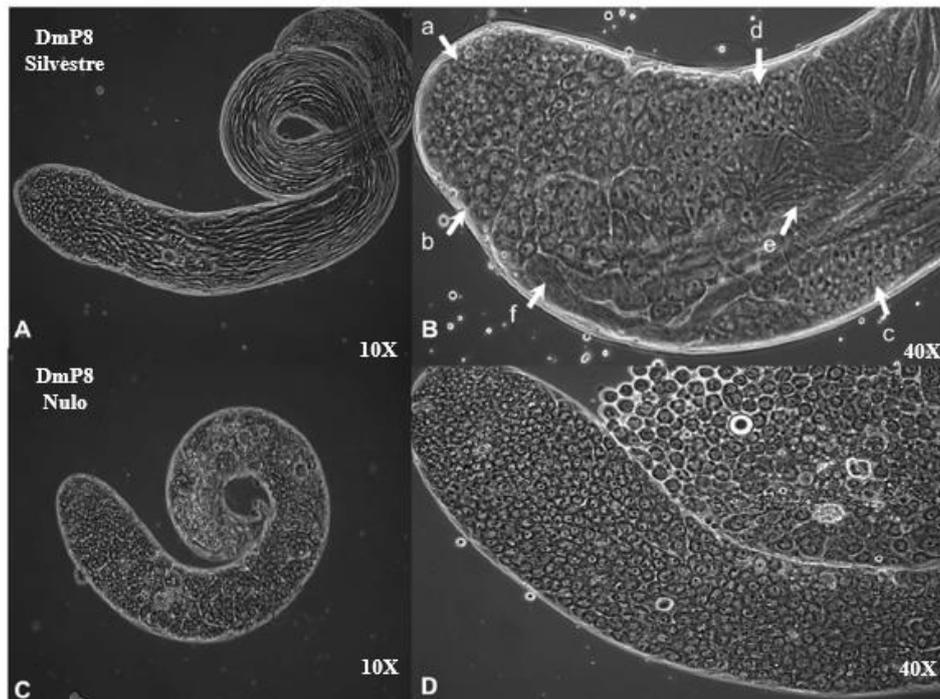
**Figura 8. Defectos en el desarrollo embrionario temprano en organismos nulos para DmP8.** En el panel izquierdo se muestra la inmunotinción de un embrión silvestre en el estadio de blastodermo sincicial. En rojo se muestra la señal del anticuerpo contra tubulina y en verde se muestra la tinción de sytox. Durante este estadio del desarrollo las divisiones mitóticas son sincrónicas. En el panel derecho se muestra la misma inmunotinción pero en un embrión nulo para la proteína DmP8, además de la pérdida de la sincronía en las divisiones mitóticas, se observan otros defectos como ADN descondensado (flechas) y centrosomas aislados (cabezas de flechas) (Cruz, datos no publicados).

Por otra parte, hemos detectado que a diferencia de las subunidades XPD, XPB, Cdk7, MAT1 y p34 de TFIIH, DmP8 se mantiene unida a los cromosomas durante la profase, metafase y anafase de la mitosis (Figura 9). Todos los datos expuestos anteriormente sugieren que la subunidad DmP8 es importante para la sincronía de las mitosis, el ensamblaje del huso mitótico y la correcta segregación cromosomal.



**Figura 9. Localización de la proteína DmP8 durante la mitosis.** A-C) Inmunotinción de un embrión en el estadio de blastodermo sincicial, con los núcleos en profase. En verde se muestra el ADN teñido con sytox, en rojo se muestra la señal del anticuerpo contra DmP8. Se observa que la proteína DmP8 es nuclear en este estadio. D-G) Doble inmunotinción de un embrión en el estadio de blastodermo sincicial, con los núcleos en metafase. En verde se muestra el ADN teñido con sytox, en azul se muestra la señal del anticuerpo contra DmP8, en rojo se muestra la señal del anticuerpo contra tubulina. Se observa que la proteína DmP8 se localiza alrededor del ADN en este estadio. H-I) Inmunotinción de un embrión en el estadio de blastodermo sincicial, con los núcleos en anafase. En verde se muestra el ADN teñido con sytox, en rojo se muestra la señal del anticuerpo contra DmP8. Se observa una sobreposición de la proteína DmP8 con el ADN. (Cruz, datos no publicados).

Por otro lado, también hemos caracterizado los defectos que los machos nulos para DmP8 presentan en la espermatogénesis. Observamos que la espermatogénesis se detiene en el estadio de espermatocitos primarios, es decir justo cuando se inicia la entrada a la meiosis (Figura 9). Interesantemente, DmP8 en estas células se localiza en el nucléolo y además parece colocalizar con los cromosomas bivalentes.

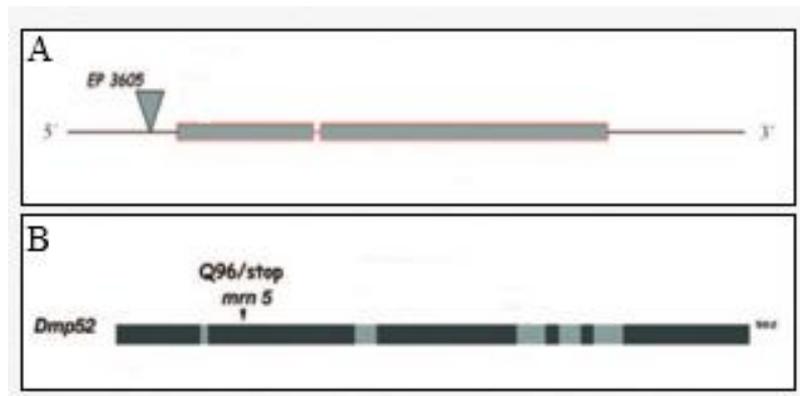


**Figura 10. La espermatogénesis se detiene en el estadio de espermatocitos primarios en organismos nulos para DmP8.** Microscopía de contraste de fases de testículos silvestres (DmP8 +/-) con un aumento 10X y 40X (A-B respectivamente). En la zona más apical del testículo se muestran las siguientes estructuras: a. células madre; b. espermatocitos primarios; c y d. espermátidas redondas en “onion-stage”; e. espermátidas en elongación temprana; f. flagelos completamente elongados. Microscopía de contraste de fases de testículos nulos para DmP8 con un aumento 10X y 40X (C-D respectivamente). Se observa un tamaño reducido de los testículos y la detención de la espermatogénesis en el estadio de espermatocitos primarios. (Cruz, datos no publicados).

Por otra parte, analizando a nivel genético, molecular y bioquímico a DmP52, se encontró que esta proteína es codificada por el gen *marionette* en *Drosophila* (DmP52) y que defectos en DmP52 causan en las moscas sensibilidad a la luz UV y fenotipos durante el desarrollo como infertilidad, organismos más pequeños que los de tipo silvestre, defectos en la cutícula, tumores melanóticos e inestabilidad cromosomal. Estos defectos en la proteína DmP52 son debidos a tres mutaciones puntuales (*mrn1*, *mrn3* y *mrn5*) y a la inserción de un elemento P (*EP3605*). En la mutación *mrn1*, se cambia un aminoácido altamente conservado, ácido glutámico por una lisina en la posición 340 (E340K). En las mutaciones *mrn3* y *mrn5*, se generan dos proteínas

truncas de 225 y 96 aminoácidos respectivamente. Finalmente, la inserción *EP3605* está situada 20 nucleótidos río arriba del inicio de la traducción, lo cual reduce los niveles de la proteína DmP52 (Fregoso *et al.*, 2007). Para este proyecto usamos las moscas que tienen a la inserción *EP3605* y al alelo *mrn5*. (Figura 11).

También se han analizado los defectos producidos por mutaciones en la subunidad DmP52 durante la espermatogénesis. En trabajos anteriores en el grupo, se encontró que combinaciones heteroalélicas de las mutaciones en DmP52 (*mrn5/EP3605*), producen machos estériles (Fregoso *et al.*, 2007). Cuando analizamos los defectos en la espermatogénesis, observamos que ésta se ve detenida en el estadio de espermatoцитos primarios, tal como ocurre en la mutante de DmP8. Así mismo, durante el análisis de los defectos producidos por mutaciones en DmP52, se encontró que en los neuroblastos, los cromosomas en metafase no se compactan bien y en algunos casos se encuentran fragmentados (Fregoso *et al.*, 2007).



**Figura 11. Esquema de las mutaciones en la proteína DmP52 (*EP3605* y *mrn5*).** La proteína DmP52 está constituida por dos exones y un pequeño intrón, tiene 502 aminoácidos y pesa aproximadamente 52 KDa. La inserción *EP3605*, que se muestra como un triángulo invertido, está situada 20 nucleótidos río arriba del inicio de la traducción. Ésta inserción reduce los niveles de la proteína DmP52 (A). Por otra parte, en el alelo *mrn5* el cambio de una C por una T introduce un codón de paro en el aminoácido 96 (Q96/Stop), generando una proteína trunca de 96 aminoácidos (B). (Modificado de Fregoso *et al.*, 2007).

Se ha demostrado que muchos de los fenotipos presentados en las mutantes para el gen DmP52, incluidos defectos en el desarrollo, esterilidad e incluso letalidad, pueden ser suprimidos con la sobreexpresión de DmP8, aunque en un bajo porcentaje: 4.4% para el fenotipo de letalidad que se presenta en los alelos *mrn1*, 3 y 5 homocigos y hasta un 30% para el fenotipo de esterilidad que se presenta en combinaciones heteroalélicas de la inserción *EP3605* y los alelos *mrn1*, 3 y 5. También se ha observado que moscas transgénicas que sobreexpresan DmP8 tienen una mayor resistencia a la radiación UV, esto aparentemente porque el mecanismo de reparación se hace más eficiente (Aguilar *et al.*, 2008).

Los datos obtenidos hasta el momento sugieren que DmP8 y DmP52 puede tener una función diferente a las descritas para TFIIH, probablemente durante la mitosis. Esto nos conduce a analizar la dinámica de otros componentes de TFIIH de los que aún no tenemos datos. En particular analizaremos la distribución de DmP8 y DmP52 en organismos transgénicos que tienen a ambas proteínas fusionadas a la Cyan Fluorescent Protein (CFP) y Yellow Fluorescent Protein (YFP) respectivamente. Nos enfocaremos en estas proteínas porque, como se mencionó, DmP52 es la proteína que interacciona directamente con DmP8 en el contexto de TFIIH. La información que obtendremos con estos experimentos nos permitirá tener una visión más amplia de la dinámica de TFIIH en el desarrollo temprano.

### **3. HIPOTESIS**

El patrón de la localización de las proteínas YFP-DmP52 y DmP8-CFP es similar durante las primeras divisiones mitóticas que ocurren en el embrión, así como, en las glándulas salivales de las larvas de tercer instar y se comportan de la misma manera en respuesta a daño al ADN inducido por luz UV.

#### 4. OBJETIVOS

Objetivo general:

Describir la dinámica de la localización de las subunidades DmP8 y DmP52 de TFIIH en respuesta a daño al ADN y durante el desarrollo embrionario temprano en *Drosophila melanogaster*.

Objetivos específicos:

1. Verificar la funcionalidad de las proteínas de fusión YFP-DmP52 y DmP8-CFP expresadas en moscas transgénicas para analizar la localización de YFP-DmP52 y DmP8-CFP durante el desarrollo embrionario temprano de *Drosophila melanogaster*.
2. Determinar si las proteínas YFP-DmP52 y DmP8-CFP tienen el mismo comportamiento después de haber causado daño al ADN por luz UV en glándulas salivales.
3. Analizar si existe una dependencia en la localización específica de la proteína DmP8-CFP en un fondo mutante de la proteína DmP52 en testículos.

## 5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

### ❖ Para el objetivo 1:

Se realizaron ensayos de complementación o rescate de fenotipos en fondos mutantes de DmP52 y DmP8 con los transgenes YFP-DmP52 y DmP8-CFP, respectivamente, a través de cruza. Se verificó la expresión de las proteínas de fusión mediante microscopía de fluorescencia y a través de Western blot con anticuerpos específicos contra las proteínas CFP, YFP, DmP52 y DmP8 en extractos de proteína de las líneas transgénicas. De igual manera, se analizó *in vivo*, mediante microscopía confocal y de fluorescencia, la localización de YFP-DmP52 y DmP8-CFP durante las tres primeras horas de desarrollo del embrión.

### ❖ Para el objetivo 2:

Se analizó la dinámica de YFP-DmP52 y DmP8-CFP *in vivo* en respuesta a daño al ADN, a través de microscopía confocal en preparaciones de glándulas salivales en condiciones normales y después de irradiar con luz UV.

### ❖ Para el objetivo 3:

Se analizó la localización de DmP8-CFP *in vivo* mediante microscopía confocal en testículos con un fondo mutante de Dmp52. Para ello se generó una línea que tuviera en el cromosoma dos el transgen DmP8-CFP homócigo y en el cromosoma tres cada alelo mutante de DmP52.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS.

**6.1 Rescate de los fenotipos de letalidad y semi-letalidad con el transgen YFP-DmP52:** El rescate de letalidad se realizó en un fondo mutante para la proteína DmP52, que contiene una inserción de un elemento *P* (*EP3605*), localizada 20 nucleótidos río arriba del sitio de inicio de la traducción de DmP52, la cual es letal en condición homociga. Éste rescate se realizó mediante cruzas de organismos que llevan en el cromosoma dos una copia del transgen YFP-DmP52 balanceado con *CyO* y en el cromosoma tres la inserción *EP3605* balanceado con *TM2* o *MKRS* (Fregoso *et al.*, 2007). El rescate de semi-letalidad se realizó en un fondo heteroalélico de DmP52 en donde además de tener a la inserción *EP3605*, tiene al alelo *mrn5*. Se realizaron cruzas con organismos que llevan en el cromosoma dos el transgen YFP-DmP52 en estado homocigo y en el cromosoma tres la inserción *EP3605* y el alelo *mrn5*, balanceado con *TM6B*. El porcentaje de supervivencia para cada genotipo se calculó dividiendo el número de los organismos observados entre el número de los organismos esperados, tomando como 100% la clase más sana para cada cruce (Fregoso *et al.*, 2007).

La proteína de fusión YFP-DmP52 con la que se realizaron los rescates anteriores se construyó de la siguiente manera: la secuencia de la proteína DmP52 se insertó en el plásmido pEYFP-C1, sin ATG y con un codón de paro, (Cat. 6005-1, CLONTECH) entre los sitios XhoI/EcoRI. De esta manera la secuencia de la proteína YFP quedó en el extremo amino de la proteína DmP52. Posteriormente la secuencia YFP-DmP52 se liberó usando las enzimas SalI/EcoRI y se subclonó en el plásmido que contiene al promotor Hsp83, el cual es un promotor constitutivo suave, entre los sitios XhoI/EcoRI. Finalmente se hizo una ligación y se confirmó que la secuencia estuviera completa y sin mutaciones mediante secuenciación. La otra proteína de fusión que se usó durante este trabajo, DmP8-CFP, se contruyó de la siguiente manera: la secuencia de la proteína DmP8 se insertó en el plásmido pECFP-N1, con ATG y sin codón de paro, (Cat. 6900-1, CLONTECH) entre los sitios XhoI/EcoRI. De esta manera la secuencia de la proteína CFP quedó en el extremo carboxilo de la proteína DmP8. Posteriormente, se subclonó en el plásmido Hsp83 entre los sitios XhoI/NotI. Finalmente se hizo una ligación y se confirmó que la secuencia estuviera completa y sin mutaciones mediante secuenciación. El ADN purificado, de ambas construcciones, se

envió a la compañía Genetic Services, Inc. para la inyección de embriones silvestres que generaron a los organismos transgénicos adultos.

**6.2 Western blot:** Se obtuvieron extractos de proteína total de organismos adultos completos y de testículos. Las moscas se homogeneizaron en “douncing buffer” (250mM sacarosa, 50mM Tris pH 7.5, 25mM KCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM EDTA) con inhibidores de proteasas (Complete, Cat. 11697498001, Roche) y se incubaron con SDS al 1%. Posteriormente se centrifugó a 10 000g hasta clarificar el extracto. Se corrieron 50µg de extracto en geles desnaturalizantes de acrilamida-bisacrilamida (5-15%) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.2µm (Cat. 162-0112, Biorad). La membrana se bloqueó 12 horas a 4°C con leche semidescremada (Nestle, Cat. 273535, Carnation) a una concentración de 10-20% en PBST (PBS con Tween 20 al 0.1%). Inmediato al bloqueo, la membrana se lavó brevemente con PBST y se incubó durante dos horas a temperatura ambiente con el anticuerpo primario en PBST con leche semidescremada al 5%. Enseguida, se eliminó con PBST el exceso de anticuerpo primario y se incubó con el anticuerpo secundario (1: 3000) acoplado a HRP (Horseradish peroxidase, Invitrogen) durante 1 hora a temperatura ambiente. De igual forma, se lavó con PBST el exceso de anticuerpo secundario. Finalmente la membrana se lavó con PBS y las proteínas se detectaron por quimioluminiscencia (Pearce, Cat. 34080, ThermoScientific). Los anticuerpos primarios que se usaron para este proyecto fueron: rat  $\alpha$ -XPB (Rh2; Aguilar *et al.*, 2006) 1: 2000, rabbit  $\alpha$ -GFP (ab290; Abcam) 1: 4500, mouse  $\alpha$ -Ciclina A (A12.C; DSHB) 1: 1500, rat  $\alpha$ -p52 (1D11; Fregoso *et al.*, 2007) 1: 2500, mouse  $\alpha$ -Cdk7 (20H5; DSHB) 1: 750, mouse  $\alpha$ - $\beta$ Tubulina (E7C; DSHB) 1: 1000, mouse  $\alpha$ -Actina (JLA20; DSHB) 1: 1500. Para los extractos de testículos se siguió en mismo protocolo con 15 pares de testículos por cada genotipo que se analizó, la disección se realizó en PBS con complete 1X en frío.

**6.3 Visualización de embriones transgénicos *in vivo*:** Se colectaron embriones de 0 a 3 horas y se decorionaron con una cinta de doble cara o con hipoclorito de sodio al 2,5%. Se lavaron con agua para quitar el exceso de cloro. Posteriormente, con la ayuda de un pincel, se montaron en un cubreobjetos sobre una capa de pegamento hecho con 2mL de heptano y 4cm de cinta adhesiva de doble cara y se cubrieron con una capa fina de aceite de halocarbono700 (Cat. H-8898, SIGMA) (Rothwell and Sullivan, 1976). Fueron observados *in vivo* mediante microscopía en el equipo confocal Olympus

FV1000 Multi-fotónico Invertido, con un objetivo 40X.

**6.4 Visualización de glándulas salivales transgenicas *in vivo*:** Para la disección de glándulas salivales, se seleccionaron larvas de tercer instar. Se colocaron en vidrio de disección con una solución de PBS1X (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) y bajo el microscopio estereoscópico, con la ayuda de unas pinzas de disección se tomó la larva por los extremos y se extendió ligeramente su probóscide. Las glándulas se montaron en una cámara con PBS1X y fueron visualizadas mediante microscopía confocal en el equipo Olympus FV1000 Multi-fotónico Invertido, con un objetivo 40X.

**6.5 Purificación del anticuerpo DmP52 (vo397):** En el laboratorio se mandó hacer a la compañía New England Peptide un anticuerpo que reconociera al extremo amino terminal de la proteína p52. Una vez que el anticuerpo liofilizado llegó al laboratorio, se corrieron extractos de proteína total de organismos adultos en geles desnaturalizantes de acrilamida-bisacrilamida (5-10%) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.2µm (Biorad). A la membrana se le retiró la región donde migra la proteína DmP52 (55 kDa), enseguida el resto de la membrana se incubó en 1mL de suero con el anticuerpo de DmP52 durante 14 horas a 4°C, se recuperó el anticuerpo y se diluyó en 1mL de agua. El anticuerpo diluido se incubó durante 14 horas a 4°C con otra membrana de nitrocelulosa a la cual también se le retiró la zona donde migra DmP52. Este anticuerpo pre-absorbido se utilizó para una posterior purificación con GST-DmP52. La purificación se realizó por afinidad, utilizando 2mg de la proteína de fusión GST-DmP52, transferida a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se incubó con 100mM de glicina, pH 2.5 (1X5'), posteriormente se realizaron dos lavados (5'c/u) con TBS (20mM de tris, 500mM NaCl y 0.05% tween 20) y se incubó durante 12-14 horas a 4°C con 1.5mL de anticuerpo "limpio" (rata vo397) diluido 1:2 con TBS, después de lo cual la membrana se lavó con TBS (2X5'c/u) y posteriormente con PBS (2X5'c/u). Finalmente, el anticuerpo se eluyó con 1mL de glicina 100mM, pH 2.5 y el pH se neutralizó con 200µL de una solución de Tris-HCl 1M, pH 8.0

**6.6 Inmunotinción de embriones:** Se colectaron embriones de distintos estadios del desarrollo (0 a 3h) y se decorionaron con una solución de hipoclorito de sodio al 2.5%. Se utilizaron tres diferentes métodos de fijado, en el primero los embriones fueron fijados con una mezcla de metanol-heptano (1:1). Se mantuvieron en máxima agitación durante 15 segundos, se dejaron reposar por 1 minuto y los vitelos fueron removidos. En el protocolo siguiente los embriones se incubaron en una solución de fijado en proporción 1:1 con heptano y Engrailed buffer (140mM KCl, 40mM NaCl, 4mM Na<sub>3</sub>EGTA, 30mM PIPES, en el momento se le agrega paraformaldehído al 4%, 1mM de espermidina y β-mercaptoetanol al 0.2%) y los embriones se devitelinizaron a mano (Rothwell and Sullivan.,1976). En el último protocolo los embriones se incubaron durante 20 minutos, en una solución de fijado en proporción 1:1 con heptano y Engrailed buffer con paraformaldehído al 4%, en el momento se le agregó 1mM de espermidina y β-mercaptoetanol al 0.2%, para devitelinizar se eliminó la fase acuosa de la solución de fijado y se agregó un volumen de metanol igual al que quedo de heptano (chorro a presión), este paso se repitió hasta quedar sólo con el metanol. Después de ser fijados, los embriones se hidrataron durante 1 hora en TBST (Tris-base 20mM, NaCl 150mM y tween 20 al 0.5%) y se trataron con 10µg/mL de RNAsa A en TBST, durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron con TBST y se bloquearon 9 horas a temperatura ambiente con suero de cabra (Cat. 016201, Invitrogen) al 10% en TBST. Después del bloqueo, los embriones se lavaron nuevamente con TBST y se incubaron 12-16 horas a 4°C con los anticuerpos primarios diluidos en TBST con suero de cabra al 5%. El exceso de anticuerpo primario se lavó con TBST y posteriormente se incubó durante dos horas a temperatura ambiente con los distintos anticuerpos secundarios (Alexa Fluor, Cat. C11399, Invitrogen). De igual forma, el exceso de anticuerpo secundario se lavó con TBST. Enseguida, para teñir el DNA, los embriones se incubaron con 15nM de Sytox Green (Cat. S7020, Molecular Probes) durante 20 min, después de lo cual se lavaron con TBST. Finalmente, los embriones se montaron en Citifluor y se observaron a través de microscopía con el equipo confocal Olympus FV1000 multi-fotónico Invertido, con un objetivo 40X.

## 7. RESULTADOS

**7.1 El transgen YFP-DmP52 rescata la condición letal de la inserción EP3605 homóciga.** Debido a nuestro interés en seguir la dinámica de DmP8 y DmP52 *in vivo* durante el desarrollo embrionario temprano, en el laboratorio se generaron moscas transgénicas que expresan a DmP8 y DmP52 fusionadas a las proteínas fluorescentes CFP y YFP respectivamente (Cruz, datos no publicados). Para verificar la funcionalidad de la proteína de fusión YFP-DmP52 se realizó un ensayo de complementación de una mutante en el gen DmP52. Esta mutante contiene una inserción de un elemento *P* (*EP3605*), localizada 20 nucleótidos río arriba del sitio de inicio de la traducción de DmP52, la cual es letal en condición homóciga (Fregoso *et al.*, 2007). Para realizar este ensayo, se utilizó una línea que tiene el transgen YFP-DmP52 insertado en el cromosoma dos, balanceado con *CyO* y en el cromosoma tres tiene la inserción *EP3605* balanceado con *TM2* marcado con *ultrabithorax*. Es importante mencionar que la pérdida de este marcador en el cromosoma tres indica ganancia de homocigocidad de la inserción *EP3605*. La palabra “balanceado” se refiere que tiene la presencia de un cromosoma “balanceador”, el cual, impide la recombinación homóloga, de manera que nos aseguramos de no perder nuestra inserción o transgen en el cromosoma donde deseamos que esté.

En la tabla 1 se muestran los porcentajes de supervivencia de las diferentes clases esperadas para este ensayo. En caso de que el transgen YFP-DmP52 complemente la mutación de DmP52 en la mosca se observarían cuatro genotipos en la progenie, dos de los cuales corresponderían a organismos viables homócigos para la inserción *EP3605* con una o dos copias del transgen. Por otra parte, si el transgen no complementa la mutación, se observarían solo los genotipos que corresponderían a la condición heteróciga de la inserción *EP3605*. La presencia de los cuatro genotipos esperados (Tabla 1) evidencia que el transgen YFP-DmP52 rescata el fenotipo de letalidad, inducido por la condición homóciga de la inserción *EP3605*, hasta en un 79% con una copia del transgen.

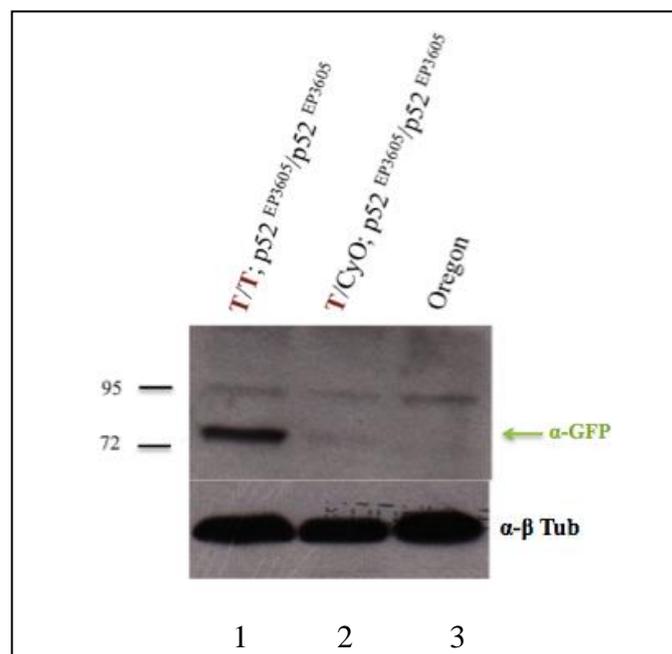
**Tabla 1. Porcentajes de supervivencia de las clases rescatadas con el transgen YFP-DmP52 en la progenie de la cruce YFP-DmP52/CyO; EP3605/TM2.** El transgen YFP-DmP52 es capaz de rescatar el fenotipo de letalidad de la condición homóciga de la inserción EP3605, por lo tanto el transgen genera una proteína funcional que está compensando la falta de la proteína DmP52 endógena. Interesantemente el porcentaje de supervivencia es mayor con una copia del transgén YFP-DmP52 (79%) que con dos copias del transgen (57%). Probablemente esto se deba a que el sitio donde se insertó el transgen esté afectando la expresión de alguna proteína que es importante para el correcto desarrollo del organismo o bien que un exceso de DmP52 sea tóxico para el organismo. Cy= Curly (alas rizadas), Ubx= Ultrabithorax (queta larga en el alterio), Obs/Esp= (observados/esperados).

<b>Genotipo</b>	<b>Porcentaje de Supervivencia (Obs/Esp)</b>
$\frac{\text{YFP-DmP52}}{\text{YFP-DmP52}} ; \frac{\text{DmP52}^{EP3605}}{\text{DmP52}^{EP3605}}$	57% $\pm$ 5.3 (373/650)
$\frac{\text{YFP-DmP52}}{\text{CyO}_{Cy}} ; \frac{\text{DmP52}^{EP3605}}{\text{DmP52}^{EP3605}}$	79% $\pm$ 5.8 (1035/1300)
$\frac{\text{YFP-DmP52}}{\text{YFP-DmP52}} ; \frac{\text{DmP52}^{EP3605}}{\text{TM2}_{Ubx}}$	77% $\pm$ 3.7 (1020/1300)
$\frac{\text{YFP-DmP52}}{\text{CyO}_{Cy}} ; \frac{\text{DmP52}^{EP3605}}{\text{TM2}_{Ubx}}$	100% $\pm$ 0 (2600/2600)

Esto nos indica que YFP-DmP52 genera una proteína que puede estar cumpliendo con las funciones de DmP52 silvestre, por ende estas moscas podrían ser una herramienta útil y confiable en la visualización de la dinámica de DmP52. Interesantemente, se puede observar que hay mayor porcentaje de supervivencia con una copia (hasta 79%) que con dos copias (hasta el 57%) del transgen. Esto puede tener al menos dos causas: que el sitio donde se insertó el transgen esté afectando la expresión de alguna proteína que es importante para el organismo, este interfiriendo con el correcto desarrollo de la mosca en la condición homóciga, o bien que un exceso de DmP52 sea tóxico para el organismo.

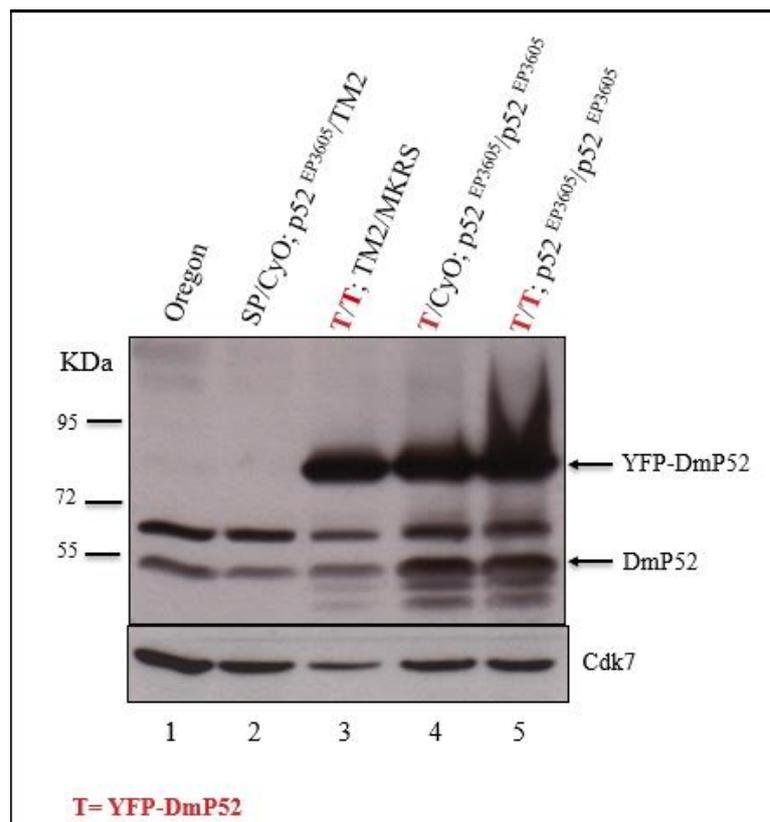
## 7.2 La línea rescatada expresa la proteína de fusión YFP-DmP52.

Para confirmar la expresión de la proteína YFP-DmP52 en la línea rescatada, se analizaron extractos de proteína total de organismos adultos a través de Western blot, utilizando un anticuerpo contra GFP que, por la similitud de sus secuencias, es capaz de reconocer también a YFP (Donado por Dr. Paul Gaytan, IBT-UNAM). En la figura 12 se observa la expresión de la proteína de fusión YFP-DmP52, que tiene un peso esperado aproximado de 78kDa, en la línea rescatada que tiene la inserción *EP3605* en condición homociga con una o dos copias del transgen (carriles 1 y 2, respectivamente).



**Figura 12. YFP-DmP52 se expresa en la línea rescatada.** Western blot de organismos silvestres y rescatados con el transgen YFP-DmP52 usando un anticuerpo  $\alpha$ -GFP. La proteína DmP52 pesa 52 KDa y la proteína YFP pesa 26 KDa, por lo tanto esperamos ver a la proteína de fusión YFP-DmP52 en un peso aproximado de 78 KDa. Se observa que en la condición homociga del transgen (carril 1) hay más proteína de fusión YFP-DmP52 que en la condición heterociga (carril 2). Los organismos silvestres carecen del transgen (carril 3). Anticuerpo anti-  $\beta$  Tubulina ( $\beta$  Tub) fue usado para el control de carga en este experimento. T=YFP-DmP52. Oregon= Organismos silvestres.

Por otra parte, al utilizar un anticuerpo que reconoce a DmP52 endógena, que tiene un peso esperado aproximado de 52kDa, sorprendentemente se observó la presencia de esta proteína tanto en organismos silvestres como en mutantes (Figura 13). La inserción *EP3605* podría ser hipomorfa y de ser así lo que esperamos es tener bajos niveles de la proteína DmP52, contrariamente a lo que se observa (Figura 13, carril 4). Una posible causa del incremento de DmP52 en las líneas rescatadas es porque al ser *TM2* difícil de identificar, en algún momento pude haber confundido moscas que no tuvieran *TM2* (homócigas) con moscas que sí lo tengan (heterócigas); con lo cual estaría teniendo niveles normales de DmP52. Finalmente, observamos que el anticuerpo que reconoce a DmP52 endógena es capaz de reconocer a la proteína de fusión YFP-DmP52 tanto en los extractos de la línea con el transgen como en los organismos rescatados (Figura 13, carriles 3, 4 y 5).



**Figura 13. Expresión de DmP52 en las moscas de tipo silvestre y transgénicas.** Western blot de organismos adultos silvestres, mutantes y organismos rescatados con el transgen YFP-DmP52 usando un anticuerpo  $\alpha$ -DmP52. Se observa que la proteína DmP52 endógena,

de un peso aproximado de 52KDa, está presente en la mosca silvestre (carril 1), en la mosca transgénica (carril 3) y la mutante rescatada con una y con dos copias del transgen (carriles 4 y 5, respectivamente). Este anticuerpo es capaz de reconocer también a la proteína de fusión YFP-DmP52 que tienen los organismos transgénicos, como se observa en los carriles 3, 4 y 5. Se esperaría que en éstos carriles no estuviera presente la proteína endógena DmP52, porque DmP52 está fusionada a YFP y únicamente deberíamos ver a la proteína YFP-DmP52, sin embargo, creemos que el transgén YFP-DmP52 está estabilizando al complejo de TFIID que se está sintetizando DmP52 endógena en estos organismos y por este motivo vemos también a la proteína DmP52. La proteína Cdk7 fue usada como control de carga para este experimento. T=YFP-DmP52. Oregon= Organismos silvestres.

**7.3 El transgen YFP-DmP52 complementa la disminución de DmP52 en un fondo heteroalélico de DmP52.** Para corroborar nuestros datos del rescate de la inserción homociga letal *EP3605* con el transgen YFP-DmP52, decidimos hacer un segundo rescate con este mismo transgen pero en un fondo heteroalélico de DmP52. Este fondo heteroalélico contiene a la inserción *EP3605* y al alelo de DmP52 llamado *mrn5*, ambos en el cromosoma tres, en el alelo *mrn5* se cambia una C por una T en la base 286, generando un codón stop y originando una proteína trunca de 96 aminoácidos de DmP52 (*mrn5*). En este rescate cambiamos el cromosoma balanceador *TM2* por *TM6B*, el cual tiene el marcador *Drop* que en los organismos adultos se visualiza en el ojo, el cual es de tamaño muy reducido siendo mucho más fácil de identificar. En la tabla 2 se muestran los porcentajes de supervivencia de organismos heteroalélicos sin el transgen YFP-DmP52 y se observa que los organismos heteroalélicos son semi-viables en un 57%.

**Tabla 2. Porcentajes de supervivencia de organismos heteroalélicos de la cruce *SP/Cyo; EP3605/TM6B* x *SP/Cyo; mnr5/TM6B*.** Los organismos heteroalélicos (*EP3605/mnr5*) son semi-viables en un 57%. Los organismos heterocigos (*EP3605/TM6B*) la clase más sana con un 100% de supervivencia y los organismos heterocigos (*mnr5/TM6B*) sobreviven en un 85%. SP= esternopleural (quetas laterales extras) Cy= Curly (alas rizadas), Dr=Drop (ojo pequeño), Tb= Tubby (organismos pequeños), Obs/Esp= (observados/esperados).

Genotipo	Porcentaje de Supervivencia (Obs/Esp)
<u>SP</u> ; <u>DmP52<sup>EP3605</sup></u> CyO <sub>Cy</sub> Dmp52 <sup>mnr5</sup>	57% ± 2 (263/462)
<u>SP</u> ; <u>DmP52<sup>EP3605</sup></u> CyO <sub>Cy</sub> <i>TM6B<sup>Dr,Tb</sup></i>	100% ± 0 (462/462)
<u>SP</u> ; <u>DmP52<sup>mnr5</sup></u> CyO <sub>Cy</sub> <i>TM6B<sup>Dr,Tb</sup></i>	85% ± 1 (400/462)

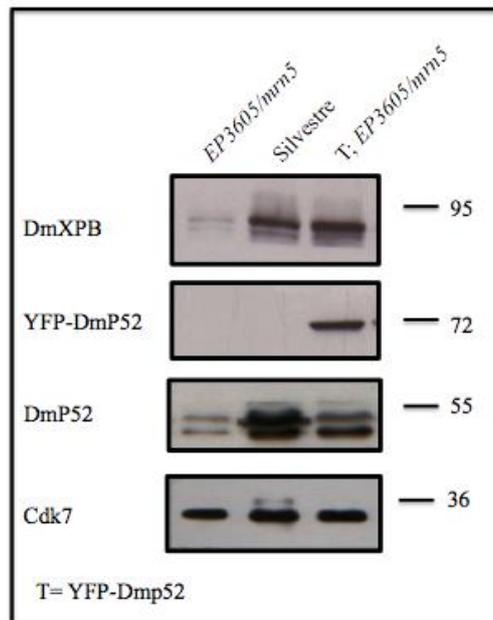
En la tabla 3 se muestran los porcentajes de supervivencia de organismos heteroalélicos rescatados con el transgen y los datos muestran que en presencia de este los organismos son 100% viables.

**Tabla 3. Porcentajes de supervivencia de organismos heteroalélicos rescatados de la cruce *YFP-DmP52; EP3605/TM6B* x *YFP-DmP52; mnr5/TM6B*.** El transgen YFP-DmP52 es capaz de rescatar el fenotipo de semi-viabilidad de los organismos heteroalélicos (*EP3605/mnr5*) de un 57% a un 100%. El porcentaje de supervivencia de los organismos heterocigos se ve disminuido de un 100% a un 51% en los organismos con la inserción *EP3605* y de un 85% a un 38% en los organismos con el alelo *mnr5*. Esto se debe a una interacción desfavorable entre el transgén YFP-DmP52 y el cromosoma balanceador *TM6B*. SP= Esternopleural (quetas laterales

extras) *Cy*= Curly (alas rizadas), *Dr*=Drop (ojo pequeño), *Tb*=Tubby (organismos pequeños),  
 Obs/Esp= (observados/esperados).

Genotipo	Porcentaje de Supervivencia (Obs/Esp)
$\frac{\text{YFP-DmP52}}{\text{YFP-DmP52}} ; \frac{\text{DmP52}^{EP3605}}{\text{DmP52}^{mrn5}}$	100% $\pm$ 0 (468/468)
$\frac{\text{YFP-DmP52}}{\text{YFP-DmP52}} ; \frac{\text{DmP52}^{EP3605}}{\text{TM6B}_{Dr,Tb}}$	51% $\pm$ 3 (242/468)
$\frac{\text{YFP-DmP52}}{\text{YFP-DmP52}} ; \frac{\text{DmP52}^{mrn5}}{\text{TM6B}_{Dr,Tb}}$	38% $\pm$ 4 (179/468)

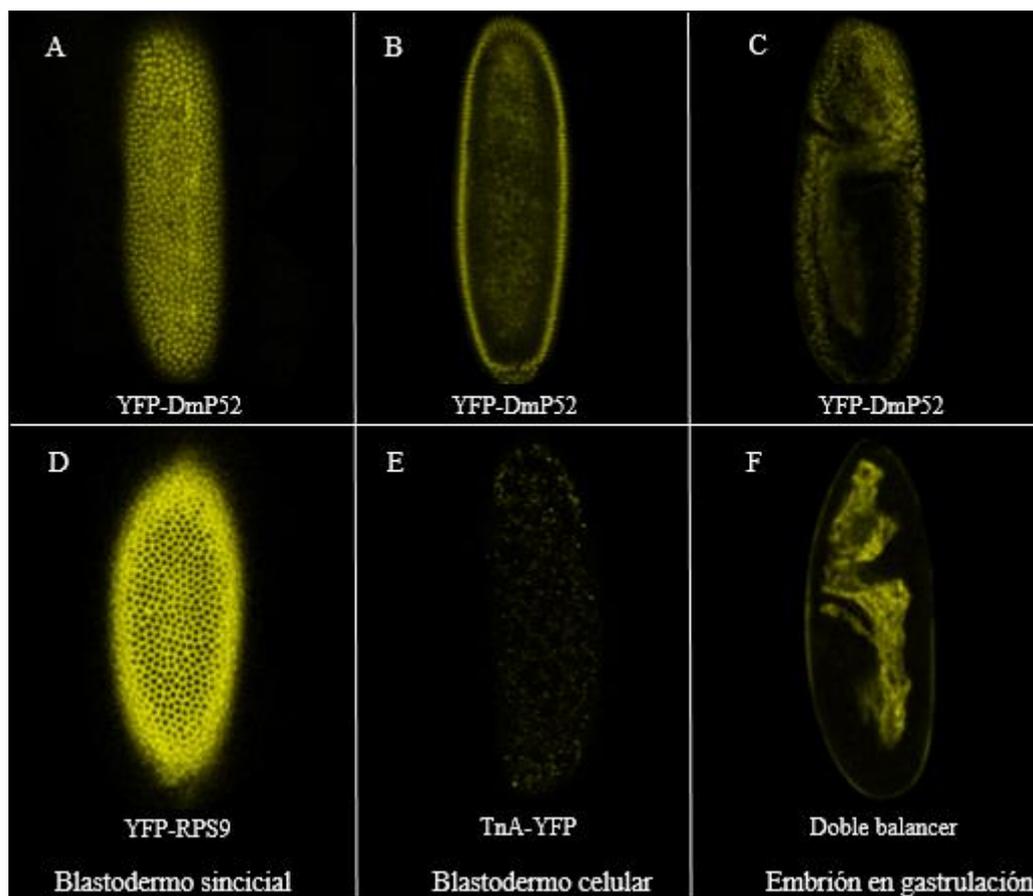
Con la finalidad de verificar que efectivamente los niveles de la proteína DmP52 bajan en el fondo heteroalélico realizamos un ensayo tipo western blot en organismos heteroalélicos, silvestres y heteroalélicos rescatados con el transgen YFP-DmP52. Como se observa en la figura 14, los niveles de la proteína DmP52 bajan en el fondo heteroalélico con respecto a los niveles silvestres y son restablecidos con la presencia del transgen YFP-Dmp52. También se observa que la proteína DmXPB se ve afectada por la ausencia de DmP52. Ambas proteínas restablecen sus niveles normales con la presencia del transgen YFP-DmP52.



**Figura 14. Restablecimiento de los niveles proteicos en un fondo mutante de DmP52 y en un fondo rescatado con el transgen YFP-DmP52.** Western blot de organismos mutantes para DmP52, silvestres y rescatados con el transgen YFP-DmP52. Se observa que además de la proteína DmP52, la proteína Dm XPB baja sus niveles de expresión en un fondo mutante de DmP52. Estas proteínas restablecen sus niveles con el transgen YFP-DmP52. También observamos la presencia de la proteína YFP-DmP52 únicamente en los organismos rescatados con el transgen YFP-DmP52. La proteína Cdk7 fue usada como control de carga para este experimento.

**7.4 La proteína YFP-DmP52 se expresa durante el desarrollo embrionario temprano.** Después de confirmar la presencia y funcionalidad de la proteína de fusión YFP-DmP52, se observaron *in vivo* los embriones que expresan a esta proteína en el estado homócigo, mediante microscopía confocal. En la figura 15 A, B y C se muestran tres embriones en diferentes estadios del desarrollo y se observa que aparentemente la proteína YFP-DmP52 es nuclear en estos estadios. Para este trabajo, es importante demostrar que el patrón de la localización de la proteína YFP-DmP52 se define por la proteína DmP52 y no por la proteína YFP. Para demostrar lo anterior usamos diferentes controles: embriones con el mismo fondo genético que la línea transgénica, denominados doble balancer (*SP/Cyo;TM2/MKRS*), pero que no expresan a la proteína YFP-DmP52; embriones que expresan a la proteína RPS9, que es un constituyente estructural de la subunidad 40S del ribosoma, fusionada a YFP y embriones que

expresan a la proteína TONALLI (TnA), la cual es una proteína que podría estar involucrada en procesos de sumoilación, fusionada a YFP. En la figura 15-D, se observa que la proteína de fusión RPS9-YFP se localiza, como esperábamos, en el citoplasma. En la figura 15-E observamos que la proteína TnA endógena no se expresa en estadios muy tempranos del desarrollo, sin embargo es importante mencionar que la expresión de la proteína de fusión TnA-YFP está regulada por el promotor de *Hsp83*, el cual es un promotor constitutivo débil y es el mismo que el de la proteína YFP-DmP52. En la figura 15-F se observa que los embriones de la mosca doble balancer no expresan a la proteína YFP y sólo es posible detectar la autofluorescencia del “saco vitelino”, el cual se encuentra compuesto principalmente por lípidos y células apoptóticas. Con las observaciones anteriores podemos concluir que la localización de la proteína YFP-DmP52 en el núcleo es debida a la proteína DmP52 y no a la proteína YFP.



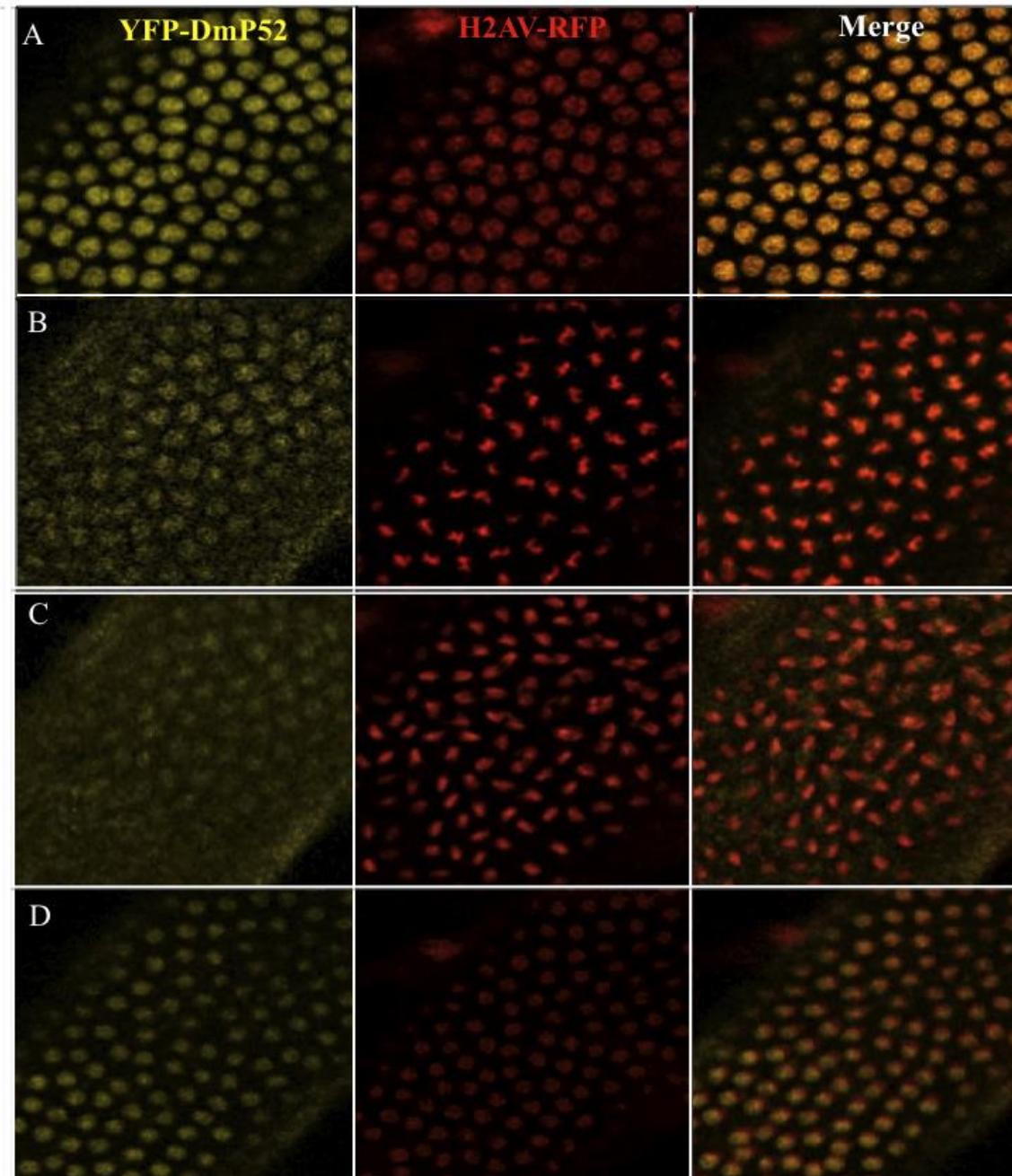
**Figura 15. La localización de la proteína YFP-DmP52 se debe a la proteína DmP52 y no a la proteína YFP. Visualización *in vivo* de embriones que expresan a la proteína YFP-DmP52**

durante los estadios de blastodermo sincical (A), blastodermo celular (B) y durante la gastrulación (C) se observa que la proteína YFP-DmP52 se localiza en lo que podrían ser los núcleos del embrión. En contraste con la localización de la proteína YFP-DmP52 la localización de otras proteínas fusionadas a YFP es diferente. La proteína YFP-RPS9 se localiza en el citoplasma en el estadio de blastodermo sincical (D), la proteína TnA-YFP no se expresa en estadios tempranos del desarrollo y por lo tanto no vemos la presencia de la proteína en el embrión (E), finalmente observamos a un embrión doble balancer que tiene el mismo fondo genético que tienen los embriones YFP-DmP52 y vemos que la autofluorescencia del embrión es muy diferente a la señal emitida por la proteína YFP-DmP52 (F). Microscopía confocal 20X.

### **7.5 La proteína YFP-DmP52 tiene una localización nuclear y citoplásmica durante el desarrollo embrionario temprano.**

Con la finalidad de seguir la dinámica, *in vivo*, de la proteína YFP-DmP52 durante el desarrollo embrionario temprano, se generó una línea de moscas que, además de expresar a YFP-DmP52, también expresa a la proteína H2AV (una variante de la histona H2A) fusionada a RFP. Esta línea nos permitió determinar si la localización de la proteína YFP-DmP52 es nuclear durante las diferentes etapas de las mitosis que ocurren durante el desarrollo. Es importante mencionar que antes de visualizar a ésta línea, que expresa a ambos transgenes, se realizaron los controles correspondientes para verificar que no existiera interferencia de la señal de YFP con la señal de RFP y viceversa, en las líneas que expresan únicamente uno de los transgenes. En todas nuestras construcciones no observamos “sangrado” de ninguna de las señales hacia otra, por lo que todo lo que observamos, *in vivo*, durante este proyecto es producto de la señal de cada proteína fluorescente que se analizó. Encontramos que la proteína YFP-DmP52 se localiza en los núcleos en profase (Figura 16, A). Durante la metafase su localización sigue siendo nuclear pero parece comenzar a desplazarse hacia el citoplasma (B), en la anafase comienza a estar en mayor proporción en el citoplasma y durante la telofase tardía se visualiza en el citoplasma (C). En la interfase, la proteína YFP-DmP52 comienza a localizarse nuevamente en los núcleos (D). Es importante notar que, cuando la señal de la proteína YFP-DmP52 en el núcleo es menor, la señal en el citoplasma aumenta (C) y cuando hay una máxima señal en el núcleo, la señal en el citoplasma casi desaparece (A). Este comportamiento nos podría sugerir que DmP52 podría estar participando de alguna manera, directa o indirectamente, en la mitosis durante el desarrollo embrionario temprano, al igual que

hemos observado mediante inmunotinciones para DmP8 (otra de las subunidades del “core” de TFIIH).

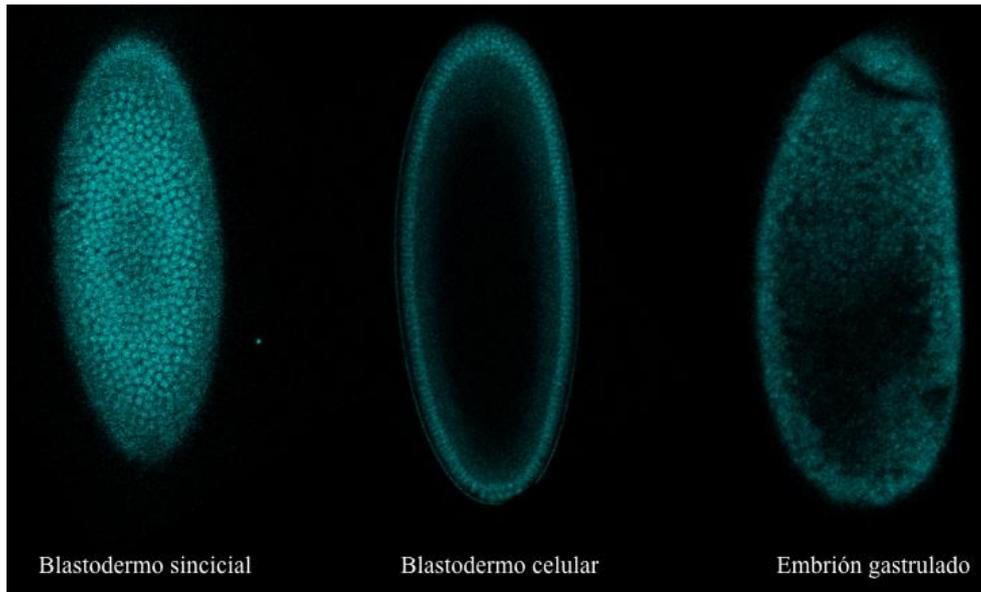


**Figura 16. Localización de la proteína YFP-DmP52 durante el desarrollo embrionario temprano.** Visualización *in vivo* de la proteína YFP-DmP52 y la proteína H2AV-RFP durante las diferentes etapas de la mitosis en un embrión en el estadio de blastodermo sincicial. Durante la profase observamos que la proteína YFP-DmP52 se localiza en los núcleos (A). Durante la metafase también se localiza en los núcleos pero parece comenzar a desplazarse hacia el

citoplasma (B). En la anafase comienza a estar en mayor proporción en el citoplasma (núcleos superiores a la derecha) y durante la telofase tardía se visualiza completamente en el citoplasma (núcleos inferiores a la izquierda) (C). Finalmente en la interfase, la proteína YFP-DmP52 comienza a localizarse nuevamente en los núcleos (D). Microscopia confocal 40X.

**7.6 Inmunotinciones de embriones silvestres para visualizar a la proteína DmP52 endógena.** Para corroborar que la localización de la proteína YFP-DmP52 en el desarrollo embrionario temprano fuera la misma que la proteína DmP52 endógena, se realizaron inmunotinciones de embriones silvestres de 0 a 3 horas usando un anticuerpo contra DmP52 que reconoce el extremo carboxilo terminal (Fregoso *et al.*, 2007) y recientemente con un nuevo anticuerpo de DmP52 que reconoce el extremo amino terminal. Se utilizaron al menos tres protocolos de fijado diferentes para cada anticuerpo: uno de ellos con metanol, otro con paraformaldehído y otro más con metanol y paraformaldehído. Se intentó realizar la inmunotinción devitelinizando a mano y desafortunadamente no logramos, con ningún protocolo, observar en los embriones a la proteína DmP52 endógena.

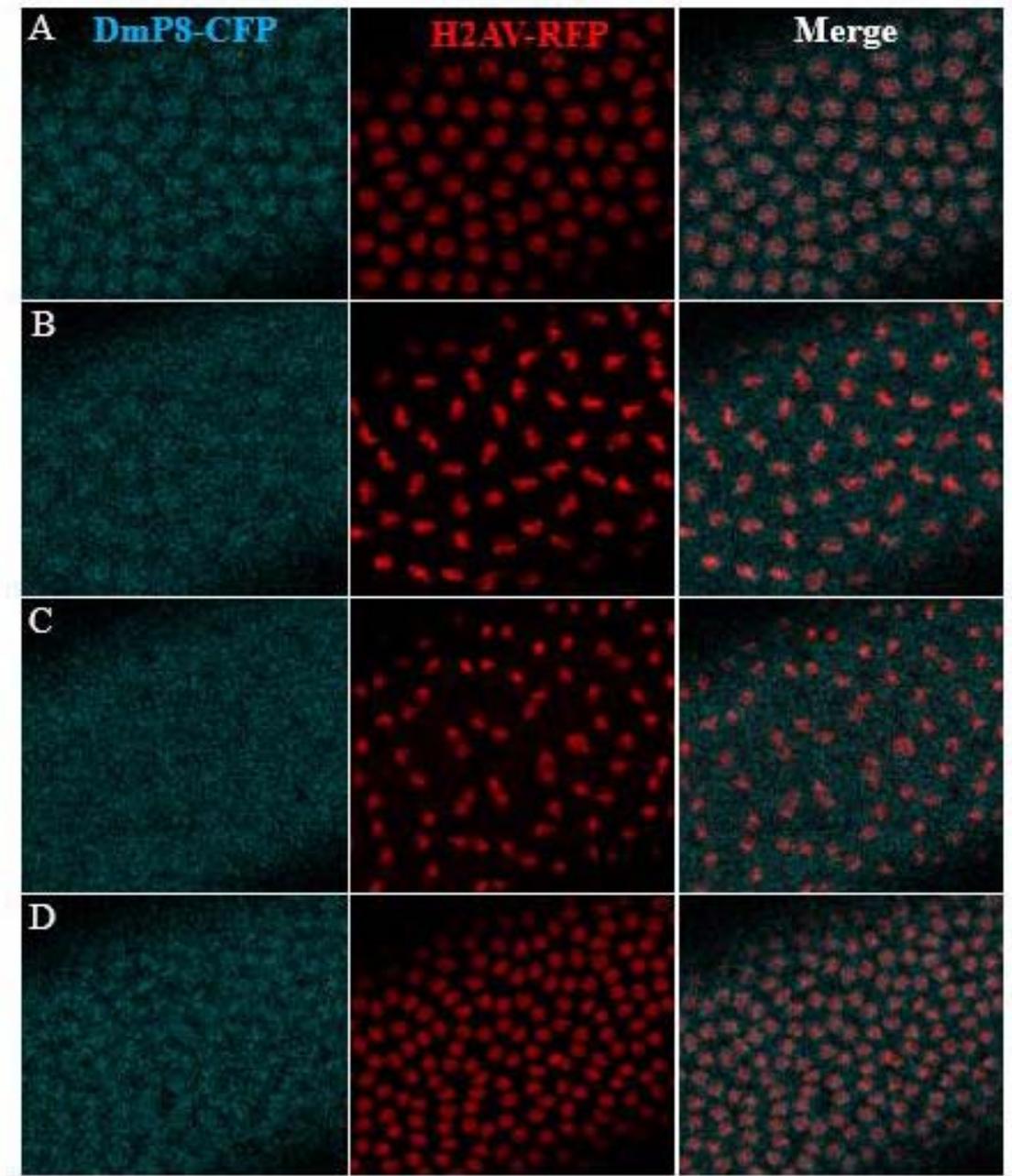
**7.7 La proteína DmP8-CFP se expresa durante el desarrollo embrionario temprano.** Contamos con una línea que contiene una inserción de un elemento P en la región codificante de DmP8 (P{lacW}l(2)SH1279). Estos organismos son heterócigos (DmP8<sup>+/-</sup>) viables y homócigos semi-viables en un 26%; la adición del transgen DmP8-CFP aumenta la viabilidad de los últimos a 93% (Cruz. Datos no publicados). Una vez que se verificó la funcionalidad del transgen, el siguiente paso fue observar la expresión de la proteína en los embriones transgénicos DmP8-CFP en estado homócigo, los cuales se observaron, *in vivo*, mediante microscopía confocal. En la figura 17 se observan tres embriones en diferentes estadios del desarrollo, aparentemente la proteína DmP8-CFP se localiza en los núcleos de los embriones durante estos estadios.



**Figura 17. Patrón de localización de la proteína DmP8-CFP.** Visualización *in vivo* de embriones que expresan a la proteína DmP8-CFP durante los estadios de blastodermo sincicial, blastodermo celular y durante la gastrulación. Se observa que la proteína DmP8-CFP se localiza en lo que podrían ser los núcleos del embrión en estos tres estadios del desarrollo. Microscopía confocal 20X.

**7.8 La proteína DmP8-CFP tiene una localización nuclear y citoplásmica durante el desarrollo embrionario temprano.** Al igual que con los organismos que expresan la proteína YFP-DmP52 generamos una línea que expresa a los transgenes DmP8-CFP y H2AV-RFP, esto con la finalidad de seguir la dinámica de la proteína DmP8-CFP durante el desarrollo embrionario temprano. Lo que observamos fue que DmP8-CFP tiene la misma localización que la proteína YFP-DmP52 durante el desarrollo embrionario temprano. De igual manera, la proteína DmP8-CFP colocaliza con la cromatina durante la profase (Figura 18 A). Durante la metafase se localiza en los núcleos y parece comenzar a desplazarse al citoplasma (B), en la anafase comienza a estar en mayor proporción en el citoplasma y durante la telofase tardía se visualiza en el citoplasma (C). En la interfase, la proteína DmP8-CFP comienza a localizarse nuevamente en los núcleos (D). Los datos que obtuvimos durante la visualización de esta proteína, *in vivo*, coinciden con observaciones previas de la localización de la proteína Dmp8 endógena durante el desarrollo embrionario temprano mediante inmunotinciones (Cruz, datos no publicados). El hecho de que ambas proteínas, YFP-

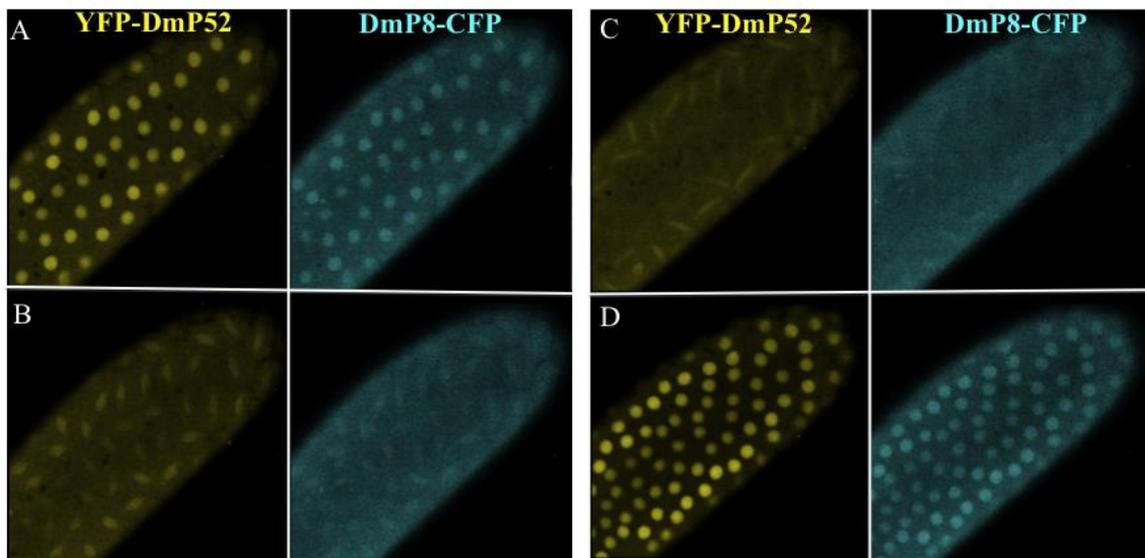
DmP52 y DmP8-CFP, tengan el mismo comportamiento durante las divisiones mitóticas en el embrión temprano podría sugerir que están participando de manera directa o indirecta en la mitosis.



**Figura 18. Localización de la proteína DmP8-CFP durante el desarrollo embrionario temprano.** Visualización *in vivo* de la proteína DmP8-CFP y la proteína H2AV-RFP durante las diferentes etapas de la mitosis en un embrión en el estadio de blastodermo sincicial. Durante la

profase observamos que la proteína DmP8-CFP se localiza en los núcleos (A). Durante la metafase también se localiza en los núcleos pero parece comenzar a desplazarse hacia el citoplasma (B). En la anafase comienza a estar en mayor proporción en el citoplasma (núcleos en el centro) y durante la telofase tardía se visualiza completamente en el citoplasma (núcleos en la periferia) (C). Finalmente en la interfase, la proteína DmP8-CFP comienza a localizarse nuevamente en los núcleos (D). Microscopia confocal 40X.

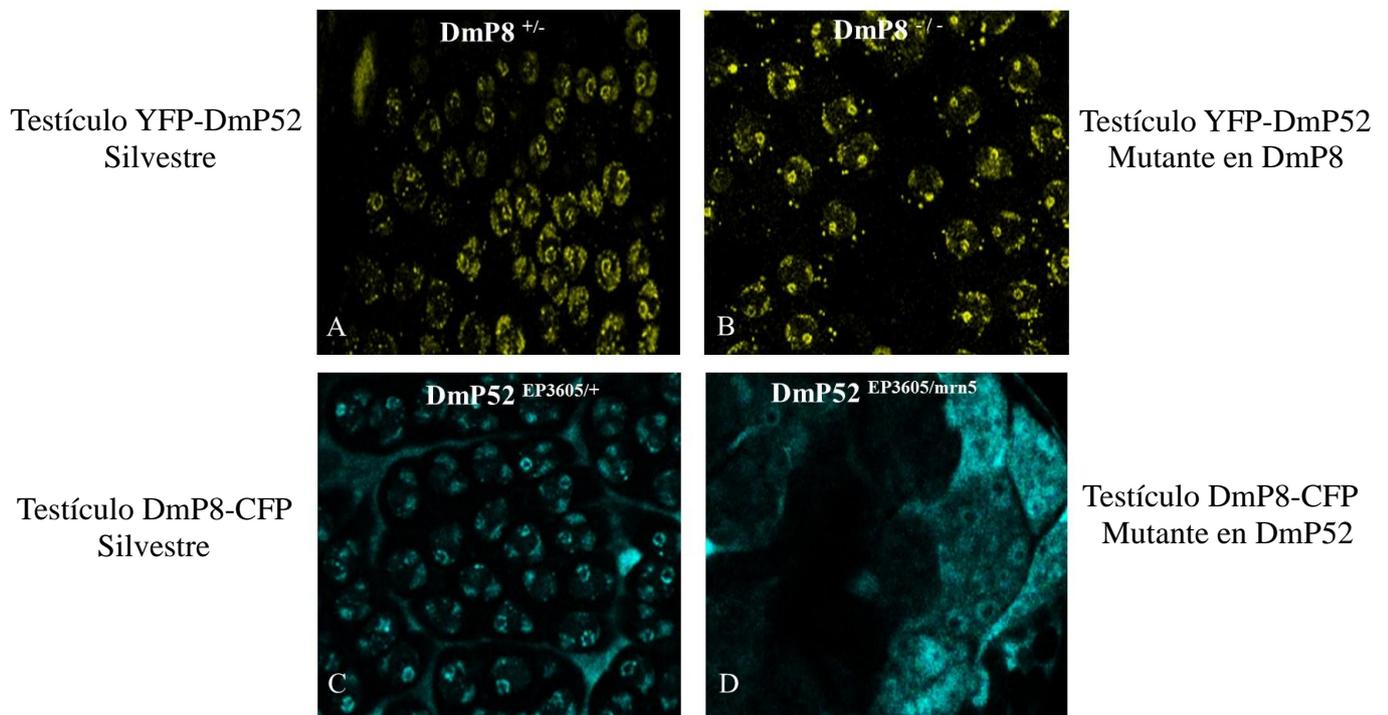
**7.9 Las proteínas YFP-DmP52 y DmP8-CFP tienen la misma localización durante el desarrollo embrionario temprano.** Después de describir la dinámica de ambas proteínas por separado, lo siguiente que hicimos fue generar una línea que expresara a los dos transgenes, con la finalidad de ver a ambas proteínas simultáneamente en el desarrollo. Lo que observamos es que ambas proteínas tienen la misma localización durante el desarrollo embrionario temprano (Figura 19). Estas proteínas se localizan en los núcleos de los embriones, en las etapas en donde el material genético se replica y condensa (interfase y profase) (A); en las etapas donde el material genético se alinea y divide (metafase, anafase y telofase) ambas proteínas se dirigen hacia el citoplasma (B-C) y finalmente se reincorporan a los núcleos cuando el ADN comienza a replicarse nuevamente (D). Esta dinámica nos podría sugerir que DmP52 y DmP8 podrían estar participando de alguna manera directa o indirectamente en la mitosis durante el desarrollo embrionario temprano.



**Figura 19. Dinámica de las proteínas YFP-DmP52 y DmP8-CFP durante el desarrollo embrionario temprano.** Visualización *in vivo* de las proteínas YFP-DmP52 y DmP8-CFP

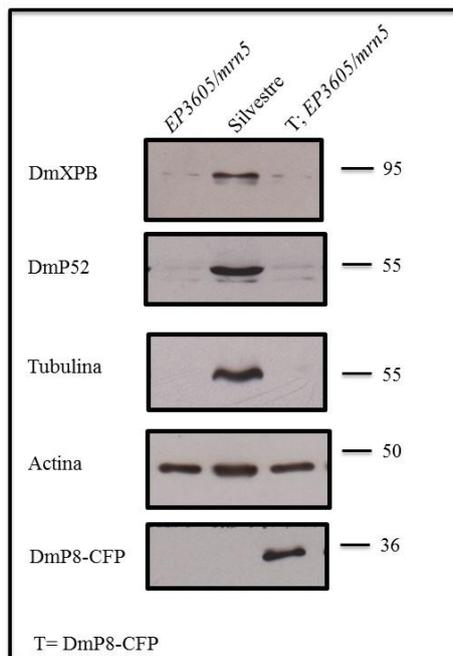
durante las primeras divisiones mitóticas de un embrión en el estadio de blastodermo sincicial. Ambas proteínas se localizan en los núcleos de los embriones en las etapas en donde el material genético se replica y condensa (interfase y profase) (A). En las etapas donde el material genético se alinea y divide (metafase, anafase y telofase) ambas proteínas se dirigen hacia el citoplasma (B-C). Finalmente se reincorporan a los núcleos cuando el ADN comienza a replicarse nuevamente (D). Microscopía confocal 60X.

**7.10 La proteína DmP8-CFP pierde su localización particular en los espermatoцитos primarios en un fondo mutante de DmP52.** Mediante datos previos del laboratorio sabemos que organismos mutantes en las proteínas DmP8 y DmP52 presentan defectos muy similares en la espermatogénesis. Específicamente, la diferenciación se detiene en el estadio de espermatoцитos primarios y los testículos son más pequeños que los silvestres (Figura 9 y 10). Sabemos también que las proteínas Dmp8-CFP y YFP-DmP52 tienen una localización muy particular en los espermatoцитos primarios: se encuentran en el núcleo, en la periferia del nucléolo y en los cromosomas bivalentes. Con estos datos quisimos saber si la localización, en los espermatoцитos primarios, de las proteínas Dmp8-CFP y YFP-DmP52 se ve afectada en organismos mutantes para DmP52 y DmP8 respectivamente. Un experimento previo realizado en el laboratorio (Cruz, datos no publicados) demuestra que la localización de la proteína YFP-DmP52 no se ve afectada por la ausencia de la proteína DmP8 (Figura 20-A, B). En cambio, observamos una completa deslocalización de la proteína DmP8-CFP en un fondo mutante de DmP52 (Figura 20- C,D).



**Figura 20. Localización de las proteínas YFP-DmP52 y DmP8-CFP, en testículos, con fondos mutantes para DmP8 y DmP52.** Las proteínas YFP-DmP52 y DmP8-CFP se localizan en el núcleo, en la periferia del nucléolo y en los cromosomas bivalentes de los espermatocitos primarios de testículos silvestres (A, C). La proteína YFP-DmP52 mantiene esta misma localización en ausencia de la proteína DmP8 (B). De manera contraria la proteína DmP8-CFP pierde su localización cuando la proteína DmP52 está mutada. (Las imágenes A y B pertenecen a Cruz, datos no publicados) .Microscopía confocal 40X.

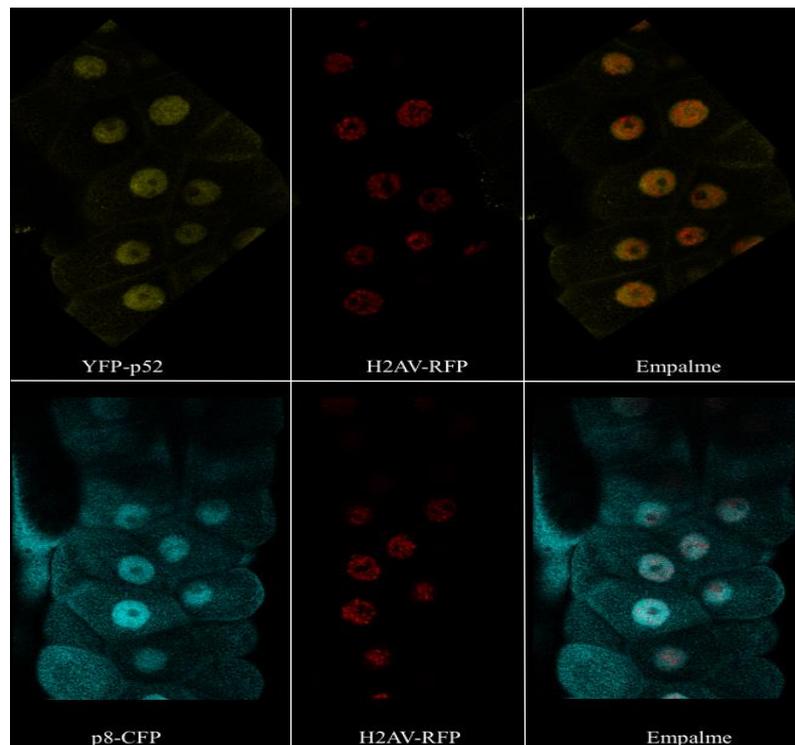
Para verificar que la proteína se estuviera deslocalizando y no se estuviera degradando se realizó un ensayo tipo Western blot de los testículos mutantes para la proteína DmP52, silvestres y mutantes para la proteína DmP52 con el transgen DmP8-CFP y lo que observamos es que la proteína DmP8-CFP no se está degradando, lo cual confirma que ésta proteína se deslocaliza de los espermatocitos primarios cuando falta Dmp52 (Figura 21).



**Figura 21. La proteína DmP8-CFP no se degrada en testículos mutantes para DmP52.** Western blot de testículos mutantes para la proteína DmP52, testículos silvestres y testículos mutantes para DmP52 con el transgén DmP8CFP. Se observa que con niveles bajos de la proteína DmP52, los niveles de XPB también disminuyen, no hay tubulina en estos testículos por la ausencia de flagelos y el transgén DmP8CFP no rescata estas condiciones. También observamos la presencia de la proteína DmP8-CFP, lo cual nos indica que la proteína no se está degradando sino deslocalizando en los testículos mutantes. Como control de carga se usó la proteína actina.

**7.11 Las proteínas YFP-DmP52 y DmP8-CFP se localizan en los núcleos de glándulas salivales de larvas de tercer instar.** Las glándulas salivales de las larvas de tercer instar poseen células en las que los cromosomas se replicaron muchas veces sin separación de los centrómeros, el proceso de endoreplicación da lugar a los cromosomas politénicos. Las larvas de *D. melanogaster* usan esta estrategia para tener las proteínas suficientes que requieren para pasar al estadio de pupa, los cromosomas tienen la particularidad de ser de gran tamaño, ya que están constituidos por varios cientos o miles de hebras de ADN. Poseen un patrón de bandeado producido por regiones de alta y baja compactación de la cromatina; las interbandas corresponden a regiones de eucromatina, donde la cromatina se encuentra relajada. Por otra parte, las bandas son regiones de heterocromatina con un alto grado de compactación de la cromatina. Uno de

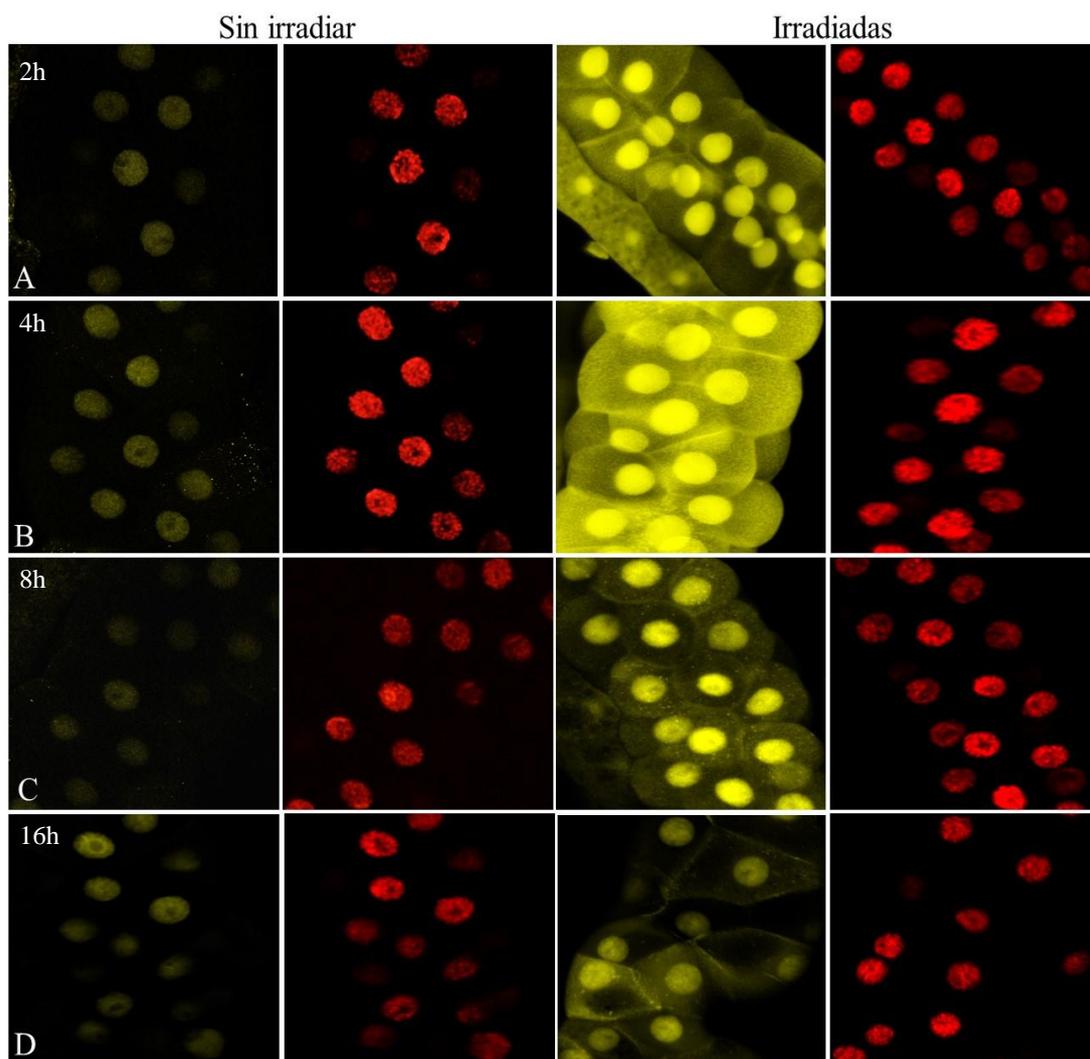
los objetivos de este proyecto fue seguir la dinámica *in vivo* de las proteínas YFP-DmP52 y DmP8-CFP en respuesta al daño al ADN causado por luz UV y dadas las características mencionadas anteriormente las glándulas salivales son un buen modelo para. Lo primero que se realizó fue verificar la expresión de las proteínas de interés en las glándulas salivales. Para definir mejor la localización de las proteínas YFP-DmP52 y DmP8-CFP, se generaron dos líneas de mosca que expresan dichas proteínas, junto con la proteína H2AV fusionada a RFP. En la figura 22 se muestra que las proteínas YFP-DmP52 y DmP8-CFP se localizan en el núcleo de las células de glándulas salivales de larvas de tercer instar y parecieran excluirse del nucléolo. De esta manera, tenemos las herramientas para visualizar cómo se comportan las proteínas YFP-DmP52 y DmP8-CFP después de causar daño al ADN al irradiar a las larvas con luz UV.



**Figura 22.** Las proteínas de fusión YFP-DmP52 y DmP8-CFP se localiza en los núcleos de glándulas salivales de larvas de tercer instar. Visualización *in vivo* de las proteínas YFP-DmP52 y DmP8-CFP mediante microscopía confocal 40X. En el panel de arriba observamos que la proteína YFP-DmP52 se localiza en los núcleos de las glándulas salivales. En el panel de abajo observamos que la proteína DmP8-CFP se localiza en el núcleo y en el citoplasma de las glándulas salivales de larvas de tercer instar. Ambas proteína parecen excluirse del nucléolo.

**7.12 Dinámica de las proteínas YFP-DmP52 y DmP8-CFP en respuesta a daño al DNA por luz UV.** La propuesta inicial para abordar este objetivo fue determinar si las proteínas YFP-DmP52 y DmP8-CFP interaccionan en el núcleo de las glándulas salivales cuando hay daño por luz UV mediante una técnica de microscopía conocida como FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer). El mecanismo de FRET es un fenómeno que ocurre sólo a una distancia muy corta, menos de 10 nm, entre dos estados de excitación electrónica de dos moléculas fluorescentes en la que la longitud de onda de emisión de una de ellas coincide con la de excitación de la otra. El espectro de emisión de un fluoróforo donador debe de sobrelapar con el espectro de excitación del fluoróforo aceptor, pero los dos espectros de excitación deben de estar separados para permitir la excitación independiente. La longitud de excitación de la proteína donadora Cyan Fluorescent Protein (CFP) es de 440 nm y la longitud de emisión de la proteína aceptora Yellow Fluorescent Protein (YFP) es 527nm, por lo que usando estas dos proteínas podríamos saber si las proteínas DmP8 y DmP52 están interaccionando. (Pitson and Kremers., 2007). Sin embargo, no tuvimos éxito con estos experimentos ya que no logramos estandarizar las condiciones adecuadas para poder observar el fenómeno de FRET y finalmente decidimos seguir otra estrategia experimental.

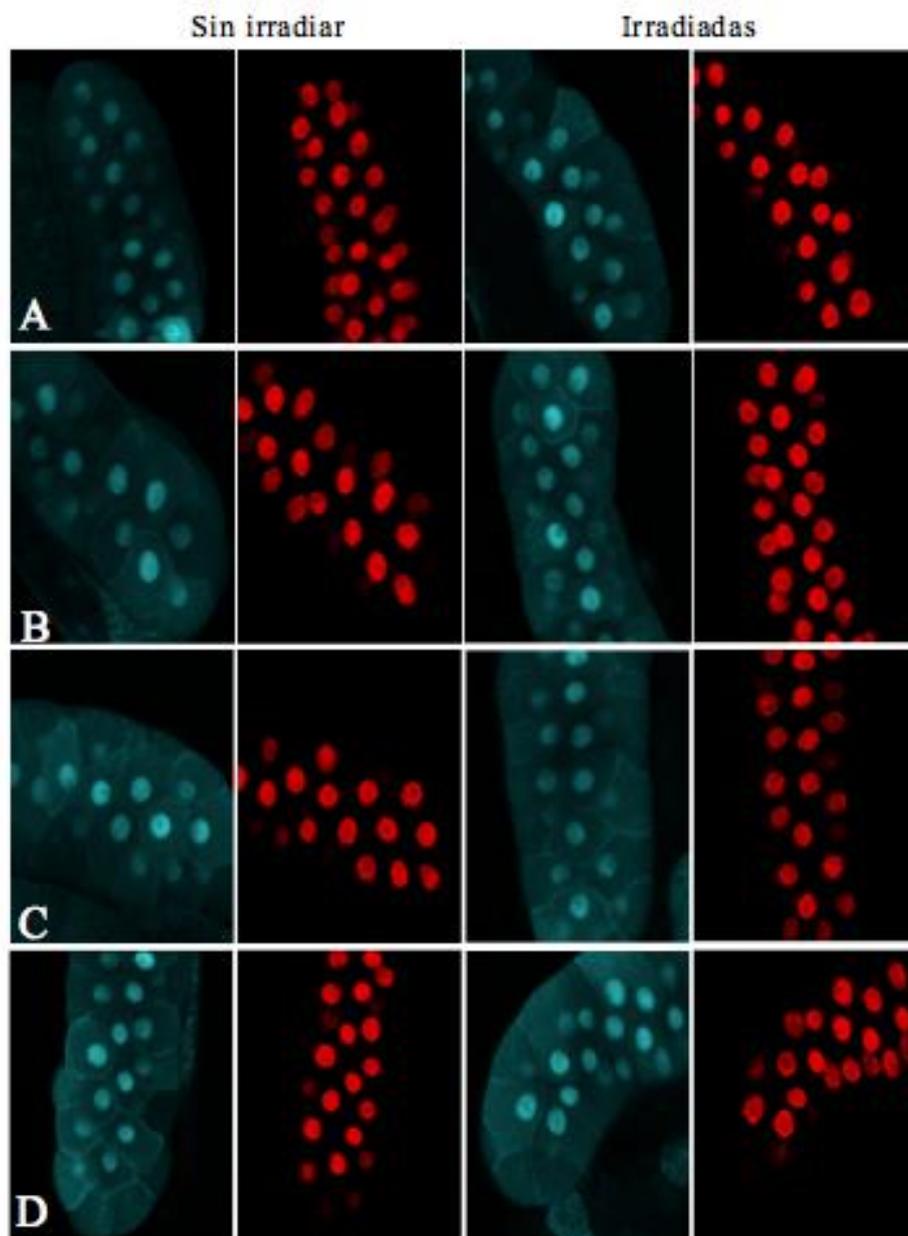
Lo siguiente que se realizó fue seguir la dinámica de estas proteínas, por separado, en las líneas que expresan conjuntamente a los transgenes de interés y a la proteína H2AV-RFP. Se siguió la dinámica de estas proteínas a las 2hrs, 4hrs, 8hrs y 16 hrs después de haber irradiado con luz UV a  $150 \text{ J/m}^2$ , la cual es la dosis letal media en donde sobreviven la mitad de nuestros organismos (Rothwell and Sullivan,1976) . Lo que observamos en el caso de la proteína YFP-DmP52 fue que la señal incrementó significativamente a las 2hrs y continuó aumentando a las 4 hrs, comenzó a disminuir a las 8 hrs y la observamos con menor intensidad a las 16 hrs (Figura 23). Estos datos son muy interesantes porque de acuerdo a experimentos anteriores en el laboratorio, sabemos que a las 2 horas después de haber irradiado con luz UV hay presencia de daño en el ADN, específicamente dímeros de pirimidina ciclobutano y 6-4 fotoproductos. El daño se mantiene en el ADN hasta las 4 hrs después haber irradiado y comienza a disminuir a las 8hrs y para la 16hrs las lesiones en el ADN han sido reparadas casi en su totalidad (Juárez, datos no publicados).



**Figura 23. Dinámica de la proteína YFP-DmP52 en respuesta a daño al ADN por luz UV.**

Visualización *in vivo* de las proteínas YFP-DmP52 (amarillo) y H2AV-RFP (rojo) en glándulas salivales de larvas de tercer instar después de irradiarlas con luz UV a  $150 \text{ J/m}^2$ . Dos horas después de haber irradiado se observa un incremento en la señal de la proteína YFP-DmP52 con respecto al control negativo de las glándulas sin irradiar (A). Cuatro horas después la señal continuó aumentando en los núcleos como en el citoplasma (B). Ocho horas después, la intensidad de la señal de la proteína YFP-DmP52 comenzó a disminuir (C). Finalmente, a las dieciséis horas la señal se observa con menor intensidad (D). Los diferentes lapsos de tiempos que se usaron para este experimento fueron sincronizados de tal manera que se pudieran tomar todas las imágenes en un lapso de tres horas y todas las imágenes fueron tomadas con las mismas condiciones mediante microscopía confocal 40X.

En el caso de la proteína DmP8-CFP los resultados no fueron los mismos. Contrario a lo que esperábamos, la intensidad de la proteína fue siempre igual a la del control sin irradiar, incluso en los diferentes tiempos en los que monitoreamos su intensidad (Figura 24). Para este experimento esperábamos observar, al igual que con la proteína YFP-DmP52, un incremento significativo en la intensidad de la señal durante las 2 y 4 hrs después de haber irradiado, y un descenso en la intensidad de la señal a las 8 y 16 hrs, cuando el daño ya ha sido reparado. Esto lo esperábamos así porque se sabe que la proteína DmP8 tiene un “pool” citoplasmático, el cual es reclutado al núcleo cuando hay daño al ADN por luz UV y regresa al citoplasma cuando el daño ha sido reparado.



## **Figura 24. Dinámica DmP8-CFP en respuesta al daño al ADN por luz UV.**

Visualización *in vivo* de las proteínas DmP8-CFP (cyan) y H2AV-RFP (rojo) en glándulas salivales de larvas de tercer instar después de irradiarlas con luz UV a 150 J/m<sup>2</sup>. Dos horas después de haber irradiado no se observa un incremento en la señal de la proteína DmP8-CFP con respecto al control negativo de las glándulas sin irradiar (A). Lo mismo observamos a las 4, 8 y 16 horas después de irradiar (B-C) respectivamente. Los diferentes lapsos de tiempos que se usaron para este experimentos fueron sincronizados de tal manera que se pudieran tomar todas las imágenes en un lapso de tres horas y todas las imágenes fueron tomadas con las mismas condiciones mediante microscopía confocal 40X.

## **8. DISCUSIÓN**

**8.1 Los transgenes YFP-DmP52 y DmP8-CFP son completamente funcionales.** Un aspecto fundamental para este proyecto fue determinar si los transgenes YFP-DmP52 y DmP8-CFP son funcionales, es decir, si se están comportando como las proteínas DmP52 y DmP8 endógenas. Una de las ventajas tiene *Drosophila melanogaster* como modelo de estudio es que se pueden realizar ensayos de rescate para saber si el transgen con el que trabajamos complementa la falta de nuestra proteína de interés. En este caso verificamos que los transgenes YFP-DmP52 y DmP8-CFP complementen la falta de las proteínas DmP52 y DmP8, respectivamente. Para el caso del transgen YFP-DmP52 se realizaron dos ensayos de rescate. El primero de ellos en un fondo hipomorfo de DmP52 el cual tiene la inserción *EP3605* la cual es homóciga letal, y en presencia del transgen el porcentaje de supervivencia es de 79% y 57% con una copia y dos copias del transgen respectivamente (Tabla 1). Al comprobar la presencia del transgen mediante un ensayo tipo western blot, observamos que en los organismos rescatados que tienen la inserción *EP3605* homóciga no disminuyen los niveles de DmP52. Incluso se observa un incremento en la proteína DmP52 endógena (Figura 13). Una posible explicación de este resultado es que la proteína YFP-DmP52 sufriera un corte proteolítico, provocando que DmP52 se libere de la proteína YFP. Sin embargo, al realizar un western blot en una membrana completa no observamos a la proteína YFP libre.

Posteriormente se realizó un segundo ensayo de rescate cambiando el fondo hipomorfo de DmP52 a un fondo heteroalélico que tiene la inserción *EP3605* y el alelo *mrn5*. En este ensayo la semi-viabilidad de los organismos heteroalélicos va de un 57% (Tabla 2) hasta un 100% con dos copias del transgen (Tabla 3). Es importante mencionar que debido al diseño de las cruzas en el segundo rescate sólo obtuvimos organismos homocigos para el transgen y por lo tanto el porcentaje de supervivencia es del 100% con dos copias del transgen. De haber tenido organismos con una sola copia del transgen el porcentaje de supervivencia de los organismos homocigos hubiera sido menor, como sucedió en el primer rescate. Con estos datos nosotros creemos que existe una interacción desfavorable entre el transgen YFP-DmP52 y el cromosoma blanaceador y por esta razón los organismos heterocigos tienen mayor porcentaje de supervivencia que los homocigos. De igual manera que con el rescate anterior, se realizó un ensayo tipo western blot y observamos que en los organismos heteroalélicos sin rescatar los niveles de la proteína DmP52 bajan con respecto a los organismos silvestres. Sin embargo en los organismos heteroalélicos rescatados con el transgen YFP-DmP52 se observa, nuevamente, la presencia de la proteína DmP52 (Figura 14). Este incremento en la proteína DmP52 puede deberse a que al estabilizarse el complejo de TFIID con el transgen, se comience a transcribir la proteína DmP52 endógena.

En el caso del transgen DmP8-CFP en el laboratorio ya se habían realizado los ensayos de rescate en una línea que contiene una inserción de un elemento P en la región codificante de DmP8 ( $P_{\{lacW\}l(2)SH1279}$ ). Estos organismos son heterocigos (DmP8 $+/$ -) viables y homocigos semi-viables en un 26% y sabemos que este transgen rescata el fenotipo de semi-viabilidad de los organismos en un 93% con una copia del transgén y 58% con dos copias del transgen. Estos datos nos dan la certeza de que los transgenes YFP-DmP52 y DmP8-CFP están funcionando como lo hacen normalmente las proteínas DmP52 y DmP8 endógenas. Además de los resultados que obtuvimos de la dinámica que tienen los transgenes YFP-DmP52 y DmP8-CFP *in vivo*, comparándolos con la localización que tiene la proteína DmP8 obtenida mediante inmunotinciones (Figura 8) son una prueba más de que estos transgenes son funcionales y se están localizando donde las proteínas endógenas lo hacen.

**8.2 Las proteínas YFP-DmP52 y DmP8-CFP tienen una localización nuclear y citoplásmica durante el desarrollo embrionario temprano.** Una vez que comprobamos la funcionalidad de los transgenes y verificamos su expresión en los organismos transgénicos, lo siguiente que se realizó fue seguir la dinámica de ambos transgenes durante las primeras dos horas y media del desarrollo embrionario. Los resultados que obtuvimos, en los cuales observamos que las proteínas YFP-DmP52 y DmP8-CFP tienen la misma dinámica durante el desarrollo embrionario temprano son muy interesantes por varias razones. Primero, DmP52 y DmP8 son parte del subcomplejo “core” de TFIID, el cual está involucrado en la regulación de la transcripción y en la reparación del ADN. La transcripción global cigótica se activa tres horas después de la fertilización, lo cual quiere decir que durante el tiempo en que seguimos la dinámica de las proteínas YFP-DmP52 y DmP8-CFP, (de 0 a 2.5 horas) no hay transcripción (Foe *et al.*, 1993), y al encontrarse estas dos proteínas, con su patrón de localización particular sugiere que “algo” deben de estar haciendo durante las divisiones mitóticas. Segundo, los organismos DmP8 nulos presentan defectos en la mitosis, mientras que organismos DmP52 nulos ni siquiera llegan a nacer (Cruz, datos no publicados) y en combinaciones heteroalélicas provocan aberraciones cromosomales en los neuroblastos larvares de la mosca (Fregoso *et al.*, 2007). Tercero, sabemos que las subunidades XPD y XPB, que también son componentes del subcomplejo “core” de TFIID tienen una localización diferente a la que observamos con las proteínas YFP-DmP52 y DmP8-CFP, ya que se localizan en el citoplasma en la primera hora y media del desarrollo y posteriormente migran a los núcleos interfásicos (Aguilar *et al.*, 2006). Sin embargo, desconocemos cual es la dinámica de XPD y XPB en los núcleos mitóticos.

Además de estos datos, hay evidencias de que la proteína XPD forma parte del complejo MMXD, el cual está involucrado en la segregación de los cromosomas durante la mitosis en células humanas. Este complejo también incluye a las proteínas MMS19 y MIP18 y se sabe que en el “knockdown” de alguna de estas proteínas, incluida XPD, los cromosomas no se segregan correctamente y hay una acumulación de cromosomas anormales (Ito *et al.*, 2010). También se sabe que la proteína XPB se asocia a los centrosomas durante la mitosis por medio de la interacción con la proteína  $\gamma$ -tubulina (Weber *et al.*, 2010). Todos estos datos sugieren que el complejo “core”, o al menos algunas de sus subunidades, tienen una función independiente a la transcripción

y a la reparación, que puede ser en la mitosis, sin embargo, hacen falta más experimentos para comprobarlo.

**8.3 La localización de la proteína DmP8-CFP en los espermatoцитos primarios es dependiente de DmP52.** Se ha reportado que la proteína DmP8 le confiere estabilidad a TFIIH en células de humanos (Cleaver, 2005). Sin embargo, por lo datos que hemos obtenido, parece ser que en *D. melanogaster* DmP8 no confiere dicha estabilidad. Sabemos que las proteínas YFP-Dmp52 y DmP8-CFP se localizan en el núcleo, en la periferia del nucléolo y en los cromosomas bivalentes de los espermatoцитos primarios. Con anterioridad en el laboratorio se había descrito que la localización de la proteína YFP-Dmp52 no se ve afectada por la falta de la proteína DmP8 (Figura 20-B) (Cruz. Datos no publicados). De manera contraria, la proteína DmP8-CFP cambia su localización en un fondo mutante de DmP52 (Figura 21-D). Nosotros esperábamos que el fenotipo de detención de la espermatogénesis en el estadio de espermatoцитos primarios que presentan los organismos mutantes para DmP52 se rescatara con el transgen DmP8-CFP, ya que previamente se reportó que la sobreexpresión de la proteína DmP8 rescata fenotipos mutantes en DmP52 (Aguilar *et al.*, 2008), pero no esperábamos que su localización se viera afectada por la ausencia de DmP52. Además sabemos que cuando no está presente la proteína DmP52, los niveles de otros componentes de TFIIH bajan, como XPB, y no sucede lo mismo en organismos mutantes para DmP8. Estos datos nos sugieren que la proteína que es importante para mantener la estabilidad del complejo de TFIIH, en la mosca, es DmP52.

**8.4 Las proteínas YFP-DmP52 y DmP8-CFP tienen una dinámica distinta durante la reparación de ADN.** El subcomplejo “core” de TFIIH participa en la reparación del ADN, por ese motivo decidimos ver cómo se comportan *in vivo* las proteínas YFP-DmP52 y DmP8-CFP. Inicialmente, nosotros queríamos abordar este objetivo mediante una técnica de microscopía denominada FRET, sin embargo, no logramos estandarizar esta técnica que nos hubiera permitido saber si hay una mayor interacción de las proteínas YFP-DmP52 y DmP8-CFP cuando hay daño por luz UV. Es probable que no lográramos dicho objetivo porque para que exista FRET se requiere que las proteínas se encuentren a una distancia de 10nm. Nosotros sabemos que las proteínas DmP52 y

DmP8 interactúan físicamente, sin embargo, no sabemos en qué orientaciones quedaron las proteínas YFP y CFP y si la distancia era mayor que 10nm nunca íbamos a observar el fenómeno de FRET.

Una segunda estrategia que se siguió fue ver la dinámica de ambas proteínas *in vivo* por separado a diferentes tiempos en condiciones normales y después de haber irradiado con luz UV. Lo que observamos fue un incremento en la señal de la proteína YFP-DmP52 en las glándulas irradiadas. Una vez que el tiempo necesario para reparar el daño transcurrió, la intensidad de la señal bajó. A las 16 hrs después de irradiar se espera que el daño haya sido completamente reparado por la maquinaria de REN en el que participa el subcomplejo "core" de TFIIH (Zurita and Merino, 2003). Sorprendentemente, no observamos cambios en la intensidad de la señal de la proteína DmP8-CFP en las glándulas irradiadas. Nosotros esperábamos que al igual que con la proteína YFP-DmP52 hubiera un incremento considerable en la señal de la proteína DmP8-CFP, ya que se ha reportado que en células humanas hay un "pool" citoplasmático de la proteína DmP8 y cuando hay daño en el ADN esta proteína libre en el citoplasma es reclutada al núcleo (Giglia-Mari *et al.*, 2006).

La explicación del porqué no observamos comportamiento esperado, probablemente, es debido a que no logramos obtener una línea que tuviera dos copias de la proteína DmP8-CFP y dos copias de la proteína H2AV-RFP. En un estado homócigo de ambas proteínas existe una interacción desfavorable entre ambos transgenes que da como consecuencia que los organismos pongan huevos pero éstos no se desarrollan y por lo tanto esta familia no puede ser fundada. La línea con la que trabajamos tiene una copia de cada transgen y en la progenie tenemos una combinación de organismos homócigos y heterócigos para cada transgen. Entonces, cuando se realizó el experimento se tomó una mezcla de organismos homócigos y heterócigos para cada transgen. Es importante mencionar que la expresión del transgen fué mayor en los organismos homócigos que en los organismos heterócigos. Este hecho impide decir con exactitud si es que realmente no hay cambios en la señal del transgen después de haber causado daño o si el comportamiento observado es producto de la mezcla de organismos homócigos y heterócigos que tenemos. Para resolver este problema en el laboratorio se está

trabajando con una nueva línea que lleva el transgen DmP8-CFP en el cromosoma tres, a diferencia de la línea anterior que tiene al transgen en el cromosoma dos, sabemos que tiene el mismo patrón de localización en los testículos y en los embriones que la línea anterior y estamos en la espera de tener la familia homóciga en combinación con la proteína H2AV-RFP para poder repetir este experimento.

## 9. CONCLUSIONES

- 1) El transgen YFP-DmP52 rescata la condición homóciga letal de la inserción *EP3605* y el fenotipo de semi-letalidad en los organismos heteroalélicos (*EP3605/mrn5*) de DmP52. El transgen DmP8-CFP rescata la condición de semi-letalidad en los organismos DmP8 nulos. Estos resultados demuestran que estas proteínas son funcionales.
- 2) La localización de las proteínas YFP-DmP52 y DmP8-CFP tienen la misma dinámica durante la mitosis, se encuentran en los núcleos en interfase, profase y metafase. Durante la anafase comienzan a dirigirse hacia el citoplasma y en la telofase se localizan en el citoplasma y finalmente regresan a los núcleos en la interfase del siguiente ciclo.
- 3) La localización de YFP-P52 en los espermatoцитos primarios es independiente de la presencia de DmP8 en estas células. Por el contrario, la proteína DmP8-CFP se deslocaliza de los núcleos en los espermatoцитos primarios en un fondo mutante de DmP52, lo que sugiere que su localización es dependiente de DmP52.
- 4) Las proteínas YFP-DmP52 y DmP8-CFP se localizan en el núcleo de las células de glándulas salivales de larvas de tercer instar y parecen excluirse del nucléolo.
- 5) La proteína YFP-DmP52 incrementa su expresión en las glándulas salivales que han sido irradiadas con luz UV. Por otra parte pareciera que la proteína DmP8-CFP se mantiene constante en las glándulas irradiadas con luz UV.

## 10. PERSPECTIVAS

- ❖ Determinar si realmente no hay un cambio en la distribución de las proteínas DmP8-CFP y H2AV-RFP en las glándulas salivales después de irradiarlas con luz UV en una nueva línea que sea homóciga viable.
- ❖ Visualizar cuál es la dinámica, *in vivo*, de otras subunidades de TFIIH como XPB y XPD. Así como de otros componentes de la maquinaria basal de transcripción, como la ARNPolIII durante el desarrollo embrionario temprano.
- ❖ Determinar si todo el complejo de TFIIH está ensamblado durante las primeras divisiones mitóticas antes de que comience la transcripción cigótica.
- ❖ Determinar si el complejo de TFIIH co-inmunoprecipita con otros componentes de la maquinaria basal de transcripción antes de comience la transcripción cigótica.
- ❖ Determinar si la ARNPolIII se encuentra activa (fosforilada) en la primeras divisiones mitóticas.
- ❖ Determinar si TFIIH realmente está interaccionando con la cromatina durante las divisiones mitóticas tempranas y analizar sobre que promotores se localiza.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, F.J., Fregoso M., Herrera M., Reynaud E., Braun C., Egly, J.M., and Zurita M. (2008). p8/TTDA overexpression enhances UV-irradiation resistance and suppresses TFIIH mutations in a *Drosophila* trichitiodystrophy model. Plos Genetics. 4(11): e1000253.
- Aguilar, F.J., Valadez, G.V., Reynaud E., Zurita M. (2006). TFIIH trafficking and its nuclear assembly during early *Drosophila* embryo development. J Cell Science. 119: 3866-3875.
- Bergmann E. and Egly J. M. (2001). Trichothiodystrophy, a transcription syndrome. Trends Genet. 17(5):279-86.
- Cleaver J. E. (2005). Splitting hairs –discovery of a new ADN repair and transcription factor for the human disease trichothiodystrophy. ADN Repair. 14 (4):285–287.
- Coleman, R.A., Taggart, A.K.P., Burma, S., Chicca, J.J. and Pugh, B.F. (1999). TFIIA regulates TBP and TFIID dimmers. Mol Cell. 4: 451-457.
- Dahmus, M.E. (1995). Phosphorylation on the C-terminal domain of ARN polymerase II. Biochim Biophys Acta. 1261: 171-182.
- Dvir, A., Conaway. R.C., and Conaway, J.W. (1997). A role for TFIIH in controlling the activity of early ARN polymerase II elongation complexes. Proc Natl Acad Sci USA. 94: 9006-9010.
- Evans E., Moggs J. G., Hwang J. R., Egly J. M. and Wood R. D. (1997). Mechanism of open complex and dual incision formation by human nucleotide excision repair factors. EMBO J. 16(21):6559-73
- Fabrizio JJ, Hime G, Lemmon SK, Bazinet C. (1998) Genetic dissection of sperm individualization in *Drosophila melanogaster*. Development; 125:1833-43
- Fregoso M. Laine, J.P., Aguilar, F.J., Moquet V., Reynaud E., Coin F., Egly, J.M., Zurita M. (2007). ADN repair and transcriptional deficiencies caused by mutations in the *Drosophila* DmP52 subunit of TFIIH generate developmental

defects and chromosome fragility. *Mol Cell Biol.* 27(10): 3640-3650.

- Fuller MT. (1993) Development of *Drosophila melanogaster*. Spermatogenesis. Cold Spring Harbor, NY:71-147.
- Giansanti MG, Sechi S, Frappaolo A, Belloni G, Piergentili R. (2012) Cytokinesis in *Drosophila* male meiosis. *Spermatogenesis*; 2:185-96.
- Giglia-Mari G., Coin F., Ranish J.A., Hoogstraten D., Theil A., Wijgers N., Jaspers N. G., Raams A., Argentini M., van der Spek P. J., Botta E., Stefanini M., Egly J. M., Aebersold R., Hoeijmakers J. H. and Vermeulen W. (2004). A new, tenth subunit of TFIID is responsible for the ADN repair syndrome trichothiodystrophy group A. *Nature Genetics.* 36(7):714-719.
- Hanawalt P. (2002). Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. *Oncogen.* 21(58):8949-8956.
- Imbalzano, A.N., Zaret, K.S., and Kingston, R.E. (1994). Transcription factor (TF) IIB and TFIIA can independently increase the affinity of the TATA-binding protein for ADN. *J Biol Chem.* 269: 8280-8286.
- Kiger AA, Jones DL, Schulz C, Rogers MB, Fuller MT. (2001) Stem cell self-renewal specified by JAK-STAT activation in response to a support cell cue. *Science*; 294:2542-5.
- Kraemer, K.H., Patronas, N.J., Schiffmann, R., Brooks, D.T., DiGiovanna, J.J. 2007. Xeroderma pigmentosum, Trichothiodystrophy and cockayne syndrome: A complex genotype-phenotype relationship. *Neuroscience.* 145(4): 1388–1396.
- Lehmann A.R. (2001). ADN repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *Biochimie.* 85(11):1101-11.
- Lindahl, T., Karran, P. and Wood, R.D. (1997). ADN excision repair pathways. *Genet. Dev.* 7: 158-169.
- Matsuno, M., Kose, H., Okabe, M, and Hiromi, Y. (2007). TFIID controls developmentally-regulated cell cycle progression as a holocomplex. *Molecular Biology Society of Japan.* 12:1289–1300.

- Merino, C., Reynaud, E., Vazquez, M. and Zurita, M. (2002). ADN repair and transcriptional effects of mutations in TFIID in *Drosophila* development. *Mol. Biol. Cell.* 13: 3246-3256.
- Morgan, D.O. (1995). Principles of CDK regulation. *Nature* 374: 131–134.
- Nigg, E.A. (1995). Cyclin-dependent kinases: Key regulators of the eukaryotic cell cycle. *BioEssays* 17: 471–480.
- Le Page, F., Kwoh, E., Avrutskaya, A., Gentil, A., Leadon, S., Sarasin, A. and Cooper P. (2000) Transcription-coupled repair of 8-oxoGuanine: requirement for XPG, TFIID, and CSB and implications for Cockayne syndrome. *Cell* 101,159-171.
- Pitson, D.W. and Kremers, G. (2007) Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. Elsevier. USA. 32, 407-414.
- Rathke C, Baarends WM, Jayaramaiah-Raja S, Bartkuhn M, Renkawitz R, Renkawitz-Pohl R. (2007) Transition from a nucleosome-based to a protamine-based chromatin configuration during spermiogenesis in *Drosophila*. *J Cell Sci*; 120:1689-700
- Reynaud E., Lomelí H., Vázquez M. and Zurita M. (1999). The *Drosophila melanogaster* Homologue of the Xeroderma Pigmentosum D Gene Product Is Located in Euchromatic Regions and Has a Dynamic Response to UV Light-induced Lesions in Polytene Chromosomes. *Mol Bio Cell.* 10:1191–1203.
- Rossignol, M., Kolb-Cheynel, L., and Egly, J.-M. (1997). Substrate specificity of the cdk-activating kinase (CAK) is altered upon association with TFIID. *EMBO J.* 16: 1628-1637.
- Seroz T., Hwang J.R., Moncollin V., Egly, J.M. (1995). TFIID: a link between transcription, ADN repair and cell cycle regulation. *Curr Opin Genet Dev.* 5(2):217-21
- Sijbers, A.M., Spek, P.J., Odijk, H., Berg, J., Duin, M., Westerveld, A., Jaspers, N.G.J., Bootsma, D., and Hoeijmakers, J.H.J. (1996). Mutational analysis of the human nucleotide excision repair gene ERCC1. *Nucleic Acids Res.* 24: 3370-3380.

- Sugasawa, K., Okuda, Y., Saijo, M., Nishi, R., Matsuda, N., Chu, G., Mori, T., Iwai, S., Tanaka, F., Tanaka, K and Hanoka, F. (2005) UV-induced ubiquitylation of XPC protein mediated by UV-DDB-Ubiquitin ligase complex. *Cell* 121, 387-400.
- Takagi Y., Masuda C. A., Chang W. H., Komori H., Wang D., Hunter T., Joazeiro C. A. and Kornberg R. D. (2005). Ubiquitin ligase activity of TFIID and the transcriptional response to ADN damage. *Mol Cell*. 18(2):237-43.
- Tokuyasu KT. (1975) Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. VI. Significance of “onion” nebenkern formation. *J Ultrastruct Res*; 53:93- 112
- Zurita M., and Merino C. (2003). The transcriptional complexity of the TFIID complex. *Trends in Genetics*. 19: 578-584.