



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**DINÁMICA DEL SUB-COMPLEJO CAK DEL FACTOR TFIIH
DURANTE LA ACTIVACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN CIGÓTICA
EN EMBRIONES DE *Drosophila melanogaster***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

SARAI VALERIO CABRERA

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Mario E. Zurita Ortega

Instituto de Biotecnología, UNAM

COMITÉ TUTORAL:

Dr. Christopher Wood

Dr. Enrique Salas Vidal

Instituto de Biotecnología, UNAM

Instituto de Biotecnología, UNAM

Cuernavaca, Morelos. Junio 2017



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.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.La activación de la transcripción cigótica en <i>Drosophila melanogaster</i>.....	1
1.2.Regulación de la activación de la transcripción y la transición a blástula media en embriones de D. melanogaster.....	3
1.3.La maquinaria basal de transcripción: El complejo de Pre-iniciación....	5
1.4.El factor de Transcripción II H.....	7
1.5.Core.....	10
1.6.CAK: Cinasa Activadora de CDKs.....	12
1.6.1. El papel de CAK en la transcripción.....	12
1.6.2. El papel de CAK en el control del ciclo celular.....	13
1.6.3. Efectos de la alteración de las subunidades de CAK en el desarrollo embrionario.....	14
1.7.Antecedentes.....	15
2. JUSTIFICACIÓN.....	19
3. HIPÓTESIS.....	20
4. OBJETIVOS.....	20
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	21
6. MATERIALES Y MÉTODOS	22
6.1.Generación de moscas transgénicas.....	22
6.1.1. Obtención de cDNA.....	22
6.1.2. Obtención de amplicones para las construcciones fluorescentes.....	23
6.1.3. Construcciones fluorescentes de los componentes de CAK.....	25
6.1.4. Micro-inyección de embriones.....	31
6.2.Selección de las líneas de moscas fluorescentes.....	31
6.2.1. Disección de ovarios y testículos.....	31
6.2.2. Ensayo de Western Blot para comprobar la expresión de las proteínas transgénicas.....	33
6.2.3. Balanceo de los cromosomas de las moscas transgénicas y cruza con marcadores nucleares.....	35
6.3.Obtención de la dinámica de localización de los componentes de CAK	37
6.3.1. Amplificación de líneas y tratamiento de embriones.....	37
6.3.2. Adquisición de la dinámica de localización de los componentes de CAK con microscopía confocal.....	39
6.4.Ensayos de rescate.....	42
6.4.1. Líneas mutantes.....	42
6.4.2. Cruzas de rescate.....	43
6.5.Ensayo de interferencia de la expresión de CDK7.....	45

6.5.1. Descripción de líneas de moscas transgénicas utilizadas, cruzas y condiciones.....	46
6.5.2. Western blot de embriones.....	46
6.5.3. Inmunotinción de α -tubulina de embriones.....	47
6.5.4. Inmunotinción de la Serina 5 fosforilada del CTD de la ARN polimerasa II de embriones.....	49
6.5.5. Ensayos de oviposición y supervivencia.....	50
7. RESULTADOS.....	51
7.1. Ensayo de Western Blot para comprobar la expresión de las proteínas recombinantes.....	51
7.2. Dinámica de localización de los componentes de CAK en embriones tempranos.....	53
7.3. Ensayos de rescate de líneas mutantes de <i>Cdk7</i>	58
7.4. Ensayos de rescate de líneas mutantes de <i>MAT1</i>	60
7.5. Ensayo de Western Blot para evaluar la disminución de CDK7 por interferencia de ARN en embriones tempranos.....	62
7.6. Efectos en la mitosis de embriones con CDK7 disminuido.....	64
7.7. Efecto en la oviposición de moscas que expresan el ARN interferente contra CDK7.....	68
7.8. Fosforilación de la Serina 5 del CTD de la ARN polimerasa II en embriones con CDK7 disminuido.....	70
8. DISCUSIÓN.....	71
9. CONCLUSIONES.....	76
10. PERSPECTIVAS.....	77
REFERENCIAS.....	78
ANEXOS.....	83

ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AREs	AU-rich elements, elementos ricos en adenilato-uridilato
ARN	Ácido Ribonucleico
ATC	Activación de la Transcripción Cigótica
BH	Buffer de homogeneizado
BSF	Bicoid Stability Factor (Factor de estabilidad Bicoid)
CAK	CDK-Activating Kinase (Cinasa Activadora de CDKs)
CB	Crosslinking Buffer
CDK	Cyclin Dependent Kinase (Ciclina dependiente de cinasa)
cDNA	Complementary DNA (ADN complementario)
CTD	Del inglés Carboxi-Terminal Domain
DTT	Dithiothreitol
EB	Embryo Buffer
MBT	Mid-Blastula Transition (Transición a Blátula Media)
miRNA	Del inglés para micro ARN
p/v	peso/volumen
PBS	Phosphate Buffered Saline (Tampón Fosfato-Salino)
PIC	Del inglés Pre-Initiation Complex, Complejo de Pre-Iniciación
PNG	Serina/treonina cinasa Pan gu
PTM	Photomultiplier tubes (Detector por tubo fotomultiplicador)
PUM	Pumilio
REN	Reparación por Escisión de Nucleótidos
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
shRNA	Short hairpin RNA
TA	Temperatura ambiente
TAFs	TATA-binding protein (TBP)-associated factors
TB	Testis Buffer
TBE	Tris-Borate-EDTA buffer (Buffer Tri-Borato-EDTA)
TBP	TATA-Binding Protein
TBS	Tris-Buffered Saline (Tampón Tris-Salino)
TFIIH	Transcription Factor II Human
v/v	volume/volumen
XPG	Xeroderma Pigmentosum Complementation Group G
ZLD	Zelda

RESUMEN

En *Drosophila melanogaster* las primeras rondas de transcripción cigótica suceden en el estadio de blastodermo sincicial, conformado por 13 divisiones nucleares que en promedio duran 9 minutos y desde el ciclo 8 se transcriben ya poco más de 100 genes. Una forma de estudiar la transcripción en esta etapa es mediante la observación de la localización y dinámica de elementos de la maquinaria basal de transcripción. Uno de ellos, el factor de transcripción II H (TFIIH), es uno de los factores de transcripción más extensamente estudiados pero poco se sabe de su participación en la activación de la transcripción cigótica. Este trabajo se centró en uno de sus sub-complejos, la Cinasa activadora de CDKs (CAK, por sus siglas en inglés); uno de sus componentes, la cinasa Cdk7, es responsable de la fosforilación del dominio carboxilo terminal (CTD) de la ARN polimerasa II. Para estudiar la distribución y dinámica de CAK se generaron moscas transgénicas que expresan a los componentes de CAK (CDK7, MAT1 y Ciclina H) etiquetados con proteínas fluorescentes y se observó la dinámica *in vivo* de estas proteínas utilizando microscopía confocal. Se encontró que la señal fluorescente de CAK está enriquecida en los núcleos del blastodermo sincicial desde la división nuclear 8, coincidiendo con la primera oleada de transcritos del embrión, y además, se observa un traslape aparente con la señal fluorescente de los cromosomas mitóticos incluso durante anafase, apuntando a una posible función de *Bookmarking* de TFIIH. Por otro lado la disminución de CDK7 en el embrión, utilizando un sistema ARN interferente, genera un incremento en el porcentaje de embriones con defectos mitóticos, afectando severamente la viabilidad de dicha línea de moscas. Estos resultados fueron consistentes con datos obtenidos previamente en nuestro grupo sobre la distribución y dinámica, así como efecto de mutaciones de proteínas del Core.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La activación de la transcripción cigótica en *Drosophila melanogaster*

En animales, el control inicial del desarrollo embrionario depende enteramente de la maquinaria proteica y de los transcritos de origen materno, cargados en el citoplasma durante la oogénesis [1], hasta que ocurre la activación transcripcional del genoma en un evento conocido como transición de control materno a cigótico [2], donde los transcritos maternos son degradados y el cigoto comienza la producción de su propio ARN [3]. Embriones mutantes de *Drosophila melanogaster* que carecen de brazos o cromosomas completos se desarrollan de manera relativamente normal hasta el ciclo 14, donde comienzan a mostrar los defectos característicos de las regiones cromosomales ausentes, una vez que se han degradado los transcritos maternos [4].

Las primeras etapas del desarrollo embrionario de *D. melanogaster*, ocurren en un sincicio formado por 13 ciclos sincrónicos de replicación y división nuclear en la ausencia de citocinesis [5]. A partir del ciclo de división 9 los núcleos migran a la periferia del embrión y es hasta el ciclo 14 que estos son rodeados por una membrana, dando lugar al proceso de celularización [6]. Al finalizar el ciclo 13 ocurre una pausa (conocida como gap) que marca el inicio de la transición a blástula media (MBT, por mid-blastula transition). Esta interrupción de la mitosis permite la invaginación de la membrana plasmática entre los núcleos sinciciales para formar el blastodermo celular y, posteriormente, continuar con la gastrulación (Figura 1) [1]. El embrión logra completar estos 14 ciclos en menos de 1.5 horas, gracias a la omisión de pausas entre replicación y mitosis (Solo fases S y M) y a la replicación sincrónica del genoma completo en menos de 3.4 minutos, los ciclos de división nuclear duran en promedio 9 minutos (hasta ciclo 10) y se extienden hasta 14 minutos en el ciclo 13 [7].

Durante estos rápidos ciclos de división nuclear ocurre la activación de la transcripción cigótica (ATC), donde el embrión incrementa gradualmente la producción de sus propios transcritos gradualmente. Algunos reportes indican que los primeros transcritos pueden detectarse desde el ciclo de división 6 [8,9], y que la total activación del genoma ocurre durante el ciclo 14 [7]. Es ampliamente aceptado que la aparición de transcritos durante la ATC se puede dividir en una ola menor (desde el ciclo 8) a una ola mayor de transcripción (en el ciclo 14) como se puede observar en la Figura 1. [1,3]

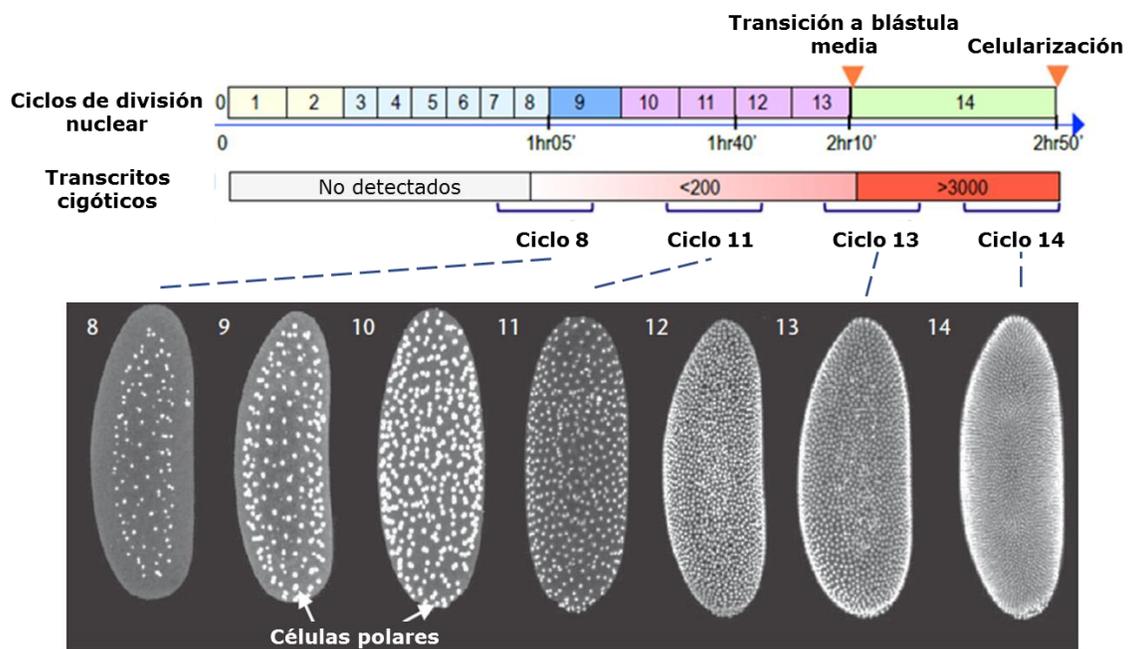


Figura 1. Progresión del desarrollo del embrión temprano de *Drosophila melanogaster* (Modificado de [3,6]). En la etapa conocida como blastodermo sincicial, se observa que menos de 200 transcritos producidos por el embrión son detectados entre los ciclos de división 8 y 13 (ola menor), y es hasta el ciclo 14 que ocurre una activación masiva de la transcripción (ola mayor), con más de 3000 transcritos detectados. En el panel inferior se observa la distribución los núcleos de un embrión entre los ciclos 8 y 14.

Antes de la oleada de transcripción masiva del genoma del embrión durante la MBT ya se comienzan a transcribir genes pequeños, sin intrones, que usan sitios de inicio que resultan en el menor transcrito posible y que aun así, cumplen con importantes funciones en el embrión temprano como el establecimiento de los patrones antero-posterior y dorso-ventral, la diferenciación sexual y la celularización; a estos 117 transcritos identificados hasta la fecha, se les conoce como genes pre-MBT [10].

1.2 Regulación de la activación de la transcripción y la transición a blástula media en embriones de *D. melanogaster*

Son varios los mecanismos que se han propuesto como responsables de la coordinación de la transición a blástula media en *D. melanogaster*. Uno de ellos monitorea la relación núcleo-citoplasma (N:C) y el otro es independiente de N:C y más bien está relacionado con la prolongación consecutiva de cada división nuclear [11]. La relación N:C indica que al incrementar el material nuclear en un mismo volumen citoplásmico los factores maternos que reprimen la transcripción se diluyen y se facilita a transcripción [9]. Otro modelo sugiere que el incremento en la relación N:C retarda el ciclo celular permitiendo la transcripción de factores necesarios para desencadenar la MBT [7]. La dilución de represores de la transcripción (así como su posterior degradación), prolongación del tiempo disponible para producir transcritos así como el incremento de ADN templado disponible para transcribir contribuyen al inicio de la MBT [9]. Se ha señalado que la ganancia de accesibilidad a promotores es el factor limitante para el inicio de la oleada mayor de transcripción, aunque falta determinar qué proteínas controlan este proceso [11].

En *D.melanogaster*, se ha planteado que el incremento de la relación N:C promueve la degradación de Twine (una fosfatasa de tirosina encargada de defosforilar a Cdk1) durante el ciclo 14 mediante (aunque el mecanismo que lo regula no se ha descrito), la fosforilación inhibitoria de Cdk1 se mantiene, los núcleos no entran a mitosis y gracias a esta pausa la transcripción generalizada puede llevarse a cabo [7], tal como se observa en la Figura 2a.

Poco se conoce sobre los factores transcripcionales que median el inicio de la activación del genoma cigótico, aunque dos factores, el Factor de estabilidad Bicoid (BSF, Bicoid Stability Factor) y Zelda (ZLD) se unen a elementos cis llamados TAGteam que se encuentran a 500pb de los transcritos de la primera ola de transcripción [1]. En el blastodermo celular, además de BSF y ZLD, numerosos factores de transcripción, polimerasas (principalmente ARN polimerasa II) y otras proteínas que median su actividad, están unidas a las regiones cromosómicas transcripcionalmente activas [3,10].

Una característica de la MBT es que la mayoría de transcritos maternos ya fueron degradados en esta etapa. En *D. melanogaster*, posterior a la activación del huevo, la serina/treonina cinasa Pan gu (PNG) promueve la traducción de una proteína de unión a RNA, Smaug (SMG) que se une a transcritos maternos que contienen las secuencias de reconocimiento para SMG. Smaug recluta al complejo de deadenilación CCR4/POP2/NOT que remueve la cola poli A de los transcritos maternos iniciando su degradación. Esto es de particular importancia para los transcritos maternos inestables. Otras dos proteínas en *D. melanogaster* han sido señaladas como partícipes de la desestabilización de transcritos maternos: Pumilio (PUM) y las proteínas de unión a AREs (AU-rich elements, elementos ricos en adenilato-uridilato), pero aún no se confirma su papel en este proceso. Se sabe también que los miRNAs de la familia miR-309 participan en la desestabilización de cientos de mRNAs maternos en *D. melanogaster* [1], y como se puede observar en la Figura 2b, su regulación está bajo el control de Smaug, aunque se desconoce a los componentes de esta vía.

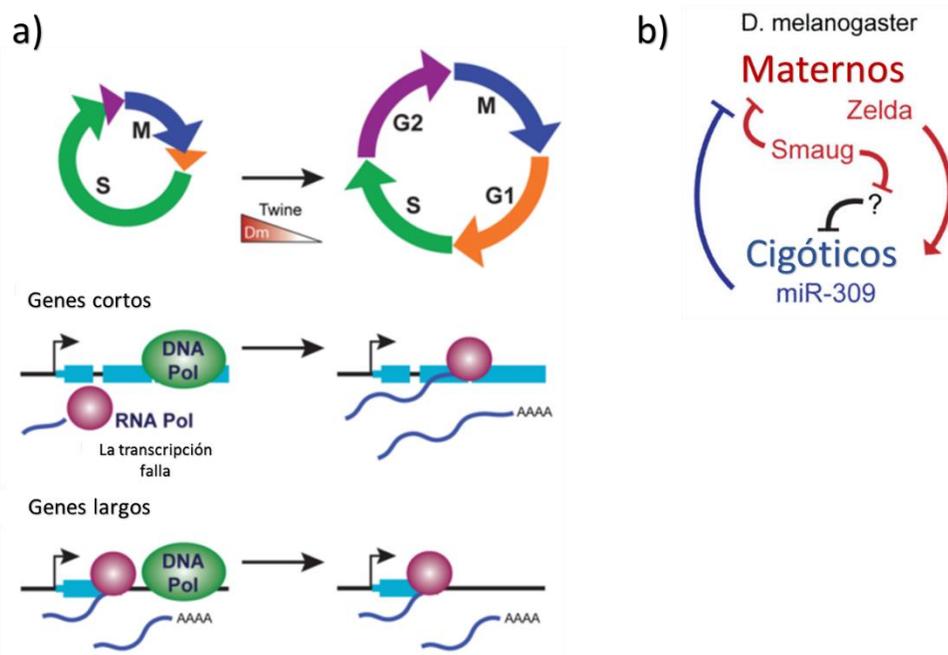


Figura 2. La regulación de la entrada a la MBT depende de la activación de la transcripción y la degradación de transcritos maternos. a) Prolongación de la mitosis permite transcribir genes más largos y obtener más transcritos. b) Destrucción de transcritos maternos: en *D. melanogaster*, Zelda propicia la expresión del genoma del cigoto y activa a miR-309, lo que provoca la destrucción de los transcritos maternos. Smaug tiene la misma función y activa a miR-309, muy posiblemente, a través de la degradación de factores que afectan su estabilidad y/o síntesis, aunque dichos blancos no han sido completamente identificados (Modificado de [9]).

1.3 La maquinaria basal de transcripción: El complejo de Pre-iniciación

Para que la transcripción pueda llevarse a cabo requiere del ensamble previo y ordenado de los factores generales de la transcripción en una estructura de aproximadamente 2 MDa llamada Complejo de Pre-iniciación (PIC) que asegura el posicionamiento correcto de la RNA polimerasa II (Figura 3a). Los estudios para reconstruir el proceso de ensamblaje del PIC se han llevado a cabo *in vitro*, basándose en datos de cristalografía, crio-microscopía electrónica y datos

bioquímicos de cada proteína involucrada [12], por lo que los modelos como el mostrado en la Figura 3b son el resultados de la combinación de varias técnicas.

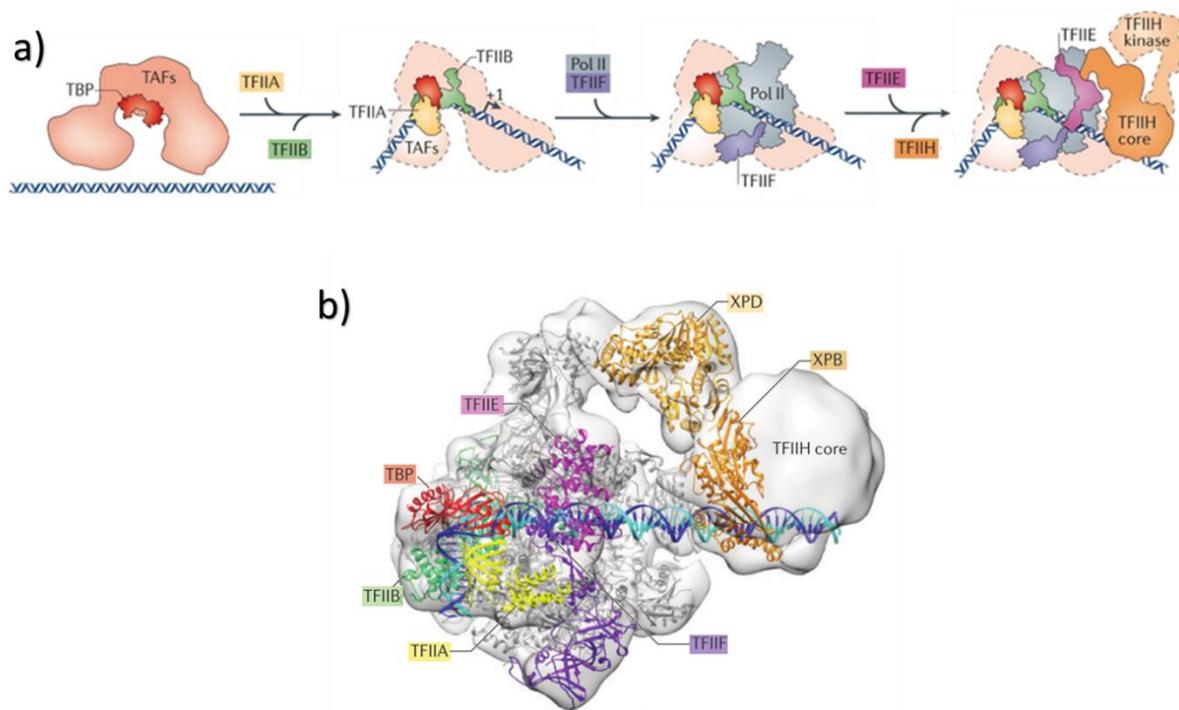


Figura 3. El complejo de pre-iniciación de la ARN polimerasa II. a) Secuencia del ensamblaje ordenado de los factores de transcripción basales, la ARN polimerasa II no se muestra pero es llevada al sitio del promotor por TBP y las TAFs, en un complejo llamado TFIID. b) Modelo de PIC Humano, obtenido con criomicroscopía electrónica (transparente) y modelado molecular (diagrama de cintas) donde se muestra a la RNA polimerasa II en cintas grises (Tomado de [14]).

Todos los PICs en eucariontes requieren de una ARN polimerasa, TBP (TATA binding protein) y los factores de transcripción basales TFIIB, TFIIE y TFIIF (en el caso de la polimerasa II) o proteínas funcional o estructuralmente relacionadas (en el caso de las polimerasas I y III [13]).

Como se ilustra en la figura 3a, el primer complejo en unirse al DNA es Pol II-TFIIB-TBP; TBP es parte del factor TFIID, que además contiene factores asociados a TBP (TAFs, por sus siglas en inglés). Mientras que TBP se requiere en la unión a la mayoría de los promotores, las TAFs poseen funciones específicas

de promotor, por lo que su participación en el PIC es variable. Posteriormente se unen TFIIA (estabiliza el complejo aunque no es esencial para la transcripción basal), TFIIF (previene interacciones inespecíficas de la polimerasa con el ADN), TFIIE y TFIIH. Los factores generales de la transcripción poseen dominios estructurales que llevan a cabo su función una vez en el complejo (Figura 3b) [14].

Aunque TFIIH es el último en unirse a PIC (Figura 3a), su actividad helicasa y translocasa es esencial para la apertura de la horquilla de transcripción; por una parte abriendo el ADN y por otro lado acomodando la hebra con la secuencia promotora en la ranura de la polimerasa [15]. La subunidad CAK de TFIIH posee la capacidad de fosforilar la serina 5 del dominio carboxilo terminal (CTD) de la ARN polimerasa II [16]. El CTD en *Drosophila melanogaster* consiste en un tándem de 44 repeticiones del heptapéptido $Y_1S_2P_3T_4S_5P_6S_7$ [78] y la fosforilación de los residuos de serina 5, junto con la fosforilación de la serina 2 (por Cdk9), permiten la salida de la polimerasa de la burbuja para dar inicio a la transcripción [16]. Aún queda por determinar si la fosforilación de serina 2 y serina 5 ocurre simultáneamente en el mismo repetido de heptapéptido del CTD [17]. Se ha sugerido que combinaciones de fosforilaciones en las serinas 2 (por Cdk9), 5 (por Cdk7, Cdk8 y Cdk9) y 7 (por Cdk7), así como la isomerización de prolinas **constituyen el "Código del CTD", que coordina la transcripción con el procesamiento del pre-mRNA, modificación de histonas y arreglos de las sub-unidades del spliceosoma** [17].

1.4 El factor de Transcripción II H

TFIIH (Transcription Factor II H) es uno de los factores de transcripción más extensamente caracterizado y hasta la fecha se sabe que, como complejo o sus sub-unidades, está implicado en transcripción, reparación del ADN, regulación del ciclo celular y segregación de los cromosomas (Figura 4) [18,19]. Este complejo proteico de 500kD está formado por 10 sub-unidades que en conjunto resultan tan grandes como la ARN Polimerasa II [19,20,21] y, aunque inicialmente fue identificado como un factor transcripcional específico de esta última, actualmente se sabe que también media la transcripción de ADN

ribosomal por la RNA polimerasa I, donde funciona como un factor de elongación [22,23]. Adicionalmente, TFIIH participa en el sistema de reparación por escisión de nucleótidos (REN) [19,24,25].

TFIIH se subdivide en dos complejos (Figura 4): El Core, formado por 7 proteínas (p8, p34, p44, p52, p62, XPD y XPB) y la cinasa activadora de CDKs o CAK (por Cdk activating kinase) formado por 3 proteínas (CDK7, Ciclina H y MAT1) [20,26,27]; De manera interesante, la proteína XPD se puede encontrar en ambos complejos y funciona como un puente entre el Core y CAK [28,29]. Incluso se ha sugerido a XPG (una endonucleasa del sistema de reparación del ADN por escisión de nucleótidos) como la unidad número 11 de TFIIH [30], aunque en el presente trabajo solo se consideran las 10 sub-unidades canónicas.

TFIIH posee múltiples actividades enzimáticas (Tabla 1); XPB y XPD son ATPasas/helicadas de DNA, CDK7 es una cinasa y la unidad p44 es una ubiquitin-ligasa [15]. Mutaciones en tres subunidades de TFIIH (XPD, XPB y p8/TTD) llevan al desarrollo de tres distintos desórdenes genéticos: xeroderma pigmentoso (XP), Síndrome de Cockayne (CS) y Tricotiodistrofia (TTD) [19,30]. Ya que la actividad de CAK puede ser modulada por TFIIE (recluta a TFIIH al PIC y modula su actividad cinasa), CDK8 (fosforila a ciclina H interrumpiendo el ensamblaje de CAK), y mutaciones de XPD que afecten su anclaje al Core, no se descarta que mutaciones en TFIIE o en el Complejo Mediador (del cuál es parte CDK8) afecten la actividad de CAK [31].

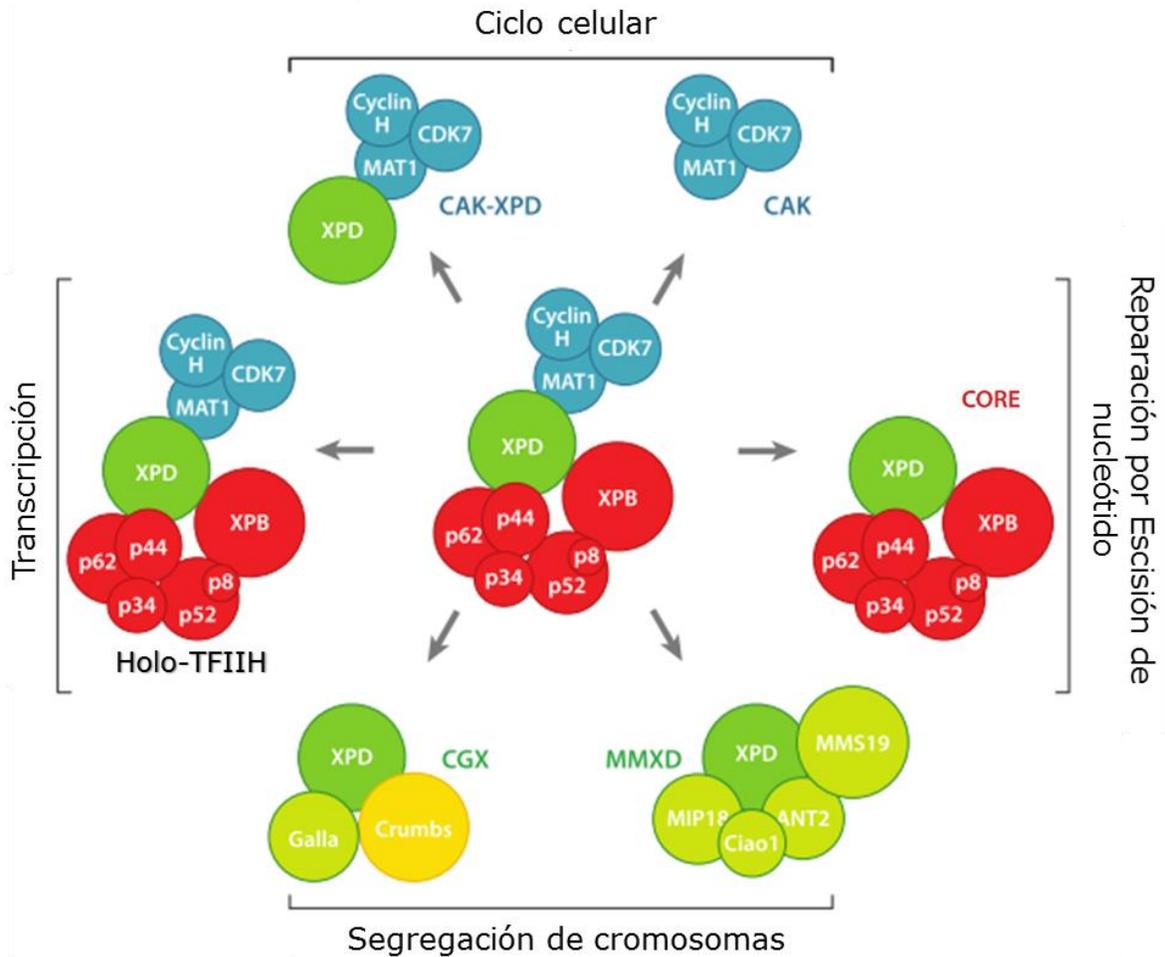


Figura 4. TFIIH: funciones del complejo y sus sub-unidades. El complejo TFIIH es altamente dinámico y sus subunidades pueden disociarse para cumplir funciones esenciales para el desarrollo. El complejo de 10 unidades participa en la transcripción, donde XPB y XPD abren la cadena de ADN mientras CDK7 fosforila al CTD. La actividad cinasa no es requerida en REN y el CAK es separado del Core, donde este puede desenrollar al DNA dañado y permitir la reparación. Por otro lado, CAK es la cinasa activadora de CDKs que junto con las ciclinas correspondientes regulan la progresión del ciclo celular. XPD regula negativamente a CAK, y separado de cualquier otra subunidad de TFIIH, se une a los complejos CGX y MMXD para controlar la segregación de cromosomas. Imagen modificada de [31].

Sub-Complejo	Humano	Mosca	Función
Core	XPB	haywire	Helicasa dependiente de ATP con actividad 3´ a 5´. En levadura (Ssl2) actividad translocasa.
	p62		Estructura. Interacciona con factores de transcripción y REN
	p52	marionette	Regula la actividad ATPasa de XPB
	p44		En levadura (Ssl1) Ubiquitin ligasa de E3
	p34		Estructura. Interacciona con p44
	p8	TFB5	Regula la actividad ATPasa de XPB
XPD	XPD	XPD	Helicasa dependiente de ATP con actividad 5´ a 3´, forma un puente entre Core y CAK. Participa en segregación de cromosomas
CAK	CDK7	CDK7	Cinasa de residuos de serina y treonina
	Ciclina H		Modula la actividad cinasa de CDK7
	MAT1	MAT1	Estabiliza a CAK. En levadura (Tfb3) regula la nedilación de culina

Tabla 1. Nombre y función de las proteínas que componen a TFIIH. Mosca=*Drosophila melanogaster*. CAK=Cinasa Activadora de CDKs. Se menciona la función en levadura cuando no se conoce su función en Humano o en mosca (Modificado de [26]).

1.5 Core

El sub-complejo Core depende de su unión a CAK a través de XPD para integrar a TFIIH y así participar en la transcripción. En la Figura 4 se aprecia que el Core forma una especie de estructura de anillo, que le permite acomodar al ADN dentro de ella [20]. Las subunidades XPD y XPB son helicasas/ATPasas que participan en la apertura del ADN para iniciar la transcripción y la reparación [15,32,33]. Experimentos en levadura han demostrado que Ssl2 (XPB) tiene una actividad translocasa y no helicasa convencional y su procesividad es de una vuelta de ADN, consistente con la longitud de la apertura de la cadena durante el inicio de la transcripción [15]. Interesantemente, XPD posee un papel independiente de TFIIH, pues se ha identificado en los complejos MMXD

(MMS19-MIP18-XPB) y CGX (Crumbs-Galla-XPB) implicados en segregación de los cromosomas [34,35].

El sub-complejo Core no siempre requiere estar unido al CAK; por ejemplo durante el mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos (REN), CAK interfiere y debe ser removido para dar inicio a la reparación [24]. En REN, una vez que se ha dado el reconocimiento del daño en el ADN (por XPC y la ARN polimerasa II) se recluta a XPA, RPA, XPG y TFIIH. Es hasta que CAK se separa de Core que XPB con su polaridad 3´-5´ y XPD con su polaridad 5´-3´ abren una horquilla de alrededor de 27 nucleótidos que flanquea el daño para permitir la incisión de la hebra dañada y su posterior reparación (Figura 5) [24,33].

Se considera que no hay un sistema REN en funcionamiento durante los rápidos ciclos de división nuclear en el embrión temprano de *D. melanogaster*, y de hecho es hasta después de la MBT que los puntos de control de replicación y daño al ADN del ciclo celular son eficientes [36].

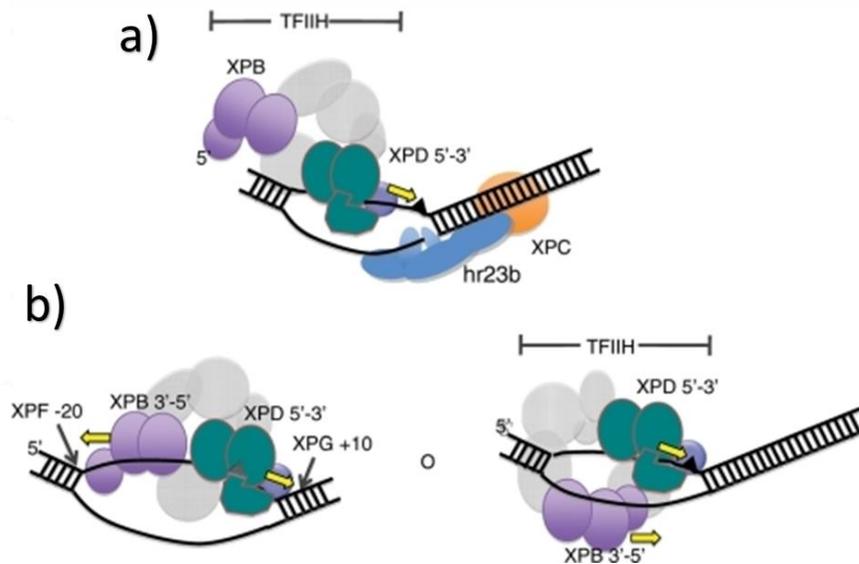


Figura 5. Modelo de apertura del ADN de doble cadena en REN. a) Cuando TFIIH se une, XPD se acomoda en una apertura de al menos 10 pb corriente abajo del sitio de daño (reconocido por hr23b-XPC). b) XPB se une hasta que existe DNA de cadena sencilla y XPD entonces puede abrir la burbuja sobre la lesión mientras XPB la extiende, esto podría suceder en direcciones opuestas o en la misma dirección. Modificado de [37].

1.6 CAK: Cinasa Activadora de CDKs.

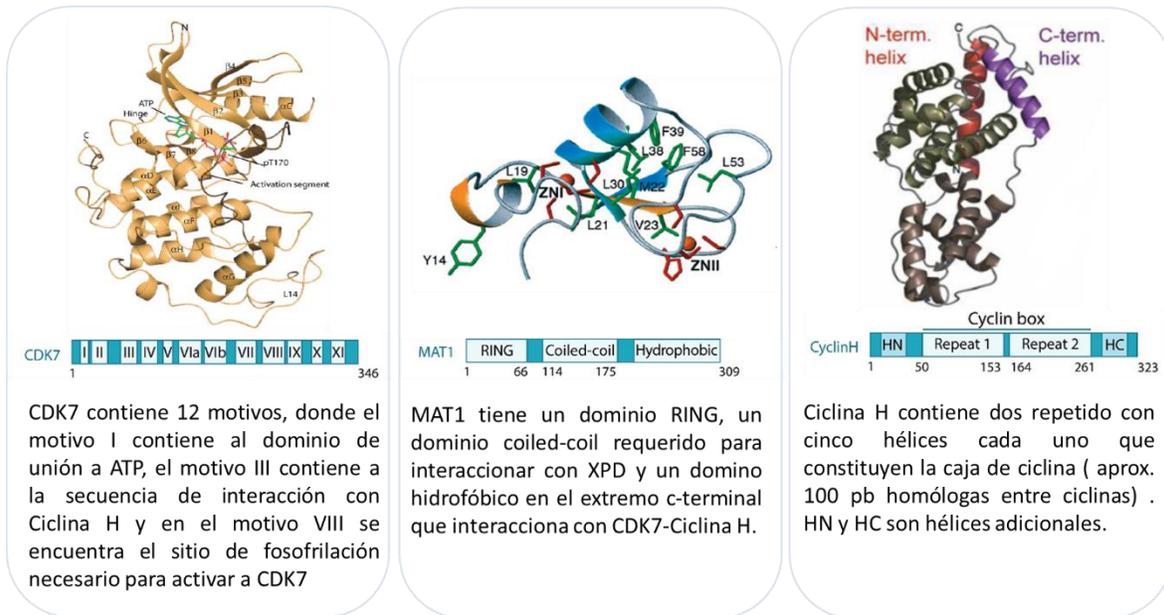


Figura 6. Sub-unidades de CAK y su estructura. Hasta la fecha no existe una estructura cristalizada de CAK ensamblado. Las estructuras mostradas corresponden a las proteínas de humano. Las estructuras de CDK7 y Ciclina H corresponden a datos de cristalografía acompañados de espectrometría de masas. El dominio N-terminal de MAT1 se obtuvo con espectroscopía de resonancia magnética nuclear. Imagen ensamblada a partir de [31,38,39,40].

1.6.1 El papel de CAK en la transcripción

Cuando CAK está unido al Core de TFIIH, la actividad cinasa de CDK7 le permite fosforilar al CTD de la ARN polimerasa II en el residuo de serina 5 para iniciar la transcripción [16,19] y se ha demostrado que también puede fosforilar a la serina 7 del CTD [17,41]. Ambas modificaciones se han relacionado con la transcripción de ARNs pequeños nucleares (snRNA) (el Complejo Integrador reconoce a la marca de serina 7 fosforilada; este complejo participa en el procesamiento de los snRNA) [42], y el reclutamiento de la maquinaria del *capping* [43]. p-TEFb (positive transcription elongation factor), que media la transición de Iniciación a Elongación de pre-mRNAs, tiene preferencia por heptapéptidos pre-fosforilados en serina 7 [17]. La actividad de CDK7 y de otras cinasas del CTD establece un patrón de fosforilación que influencia la asociación

de numerosos factores nucleares con RNA Pol II, y por lo tanto, regulan la transcripción en distintos contextos celulares [44].

CDK7 también es capaz de regular la pausa de la ARN pol II modulando el desplazamiento de TFIIE y el reclutamiento a DSIF (DRB sensitivity-inducing factor) en el sitio de pausa de la ARN Polimerasa II, próximo al promotor, lo que podría explicar por qué la inhibición de CDK7 *in vivo* (en células de colon humano) lleva a la disminución de la pausa que hace la ARN Polimerasa II. Por otro lado, CDK7 fosforila el T-loop de Cdk9 en cromatina *in vivo*, con lo que también puede liberar a la RNA Pol II de su pausa, ya que Cdk9 fosforila a la serina 2 del CTD, marcando así la etapa de elongación [45]. CDK7 es capaz de fosforilar a la serina 515 del receptor de andrógenos, promover su poliubiquitinación y su consecuente proteólisis y afectar así el proceso de transactivación del promotor de PSA (prostate-specific antigene) uno de los genes responsivos a andrógenos más estudiado [46].

Los ejemplos anteriores demuestran la gran relevancia de la sub-unidad CAK durante la transcripción.

1.6.2 El papel de CAK en el control del ciclo celular

Separado de Core, CAK está involucrado en la regulación de la progresión del ciclo celular; fosforila residuos específicos de treonina de las cinasas dependientes de Ciclina Cdk1, Cdk2, Cdk4 y Cdk6, y esta modificación determina la unión a sus respectivas ciclinas [47,48]. En metazoarios CAK, es la única cinasa activadora de CDKs que se ha identificado [49], mientras que en levadura no es capaz de llevar a cabo esta función, donde el papel le corresponde a Cdk1 [50]. La actividad de CAK es regulada negativamente al unirse a XPD, y la degradación de esta proteína se ha planteado como un mecanismo de liberación de Cdk7 para la progresión de la mitosis. XPD parece mediar la capacidad de CAK para intervenir en el ciclo celular o de integrarse para formar TFIIH en la transcripción. Los niveles de XPD disminuyen en la mitosis, lo que incrementa la actividad de CAK y promueve la progresión del ciclo celular. Por otro lado, la

sobreexpresión de XPD puede secuestrar a CAK generando un retraso en la entrada a la mitosis y según lo observado en embriones en el ciclo 13, causa un menor número de divisiones [52].

La deficiencia en CDK7 tiene como resultado severos defectos mitóticos en *C. elegans* y *D. melanogaster*, sin embargo estos datos son controversiales. En el caso de ratones, la deficiencia de cualquiera de estas tres proteínas (CDK7, MAT1 y Ciclina H) deriva en letalidad durante etapas embrionarias tempranas [49]. En levaduras, mutaciones en *mcs6* y *pmh1* (homólogos de *Cdk7* y *MAT1*) impiden completar la división celular a temperaturas restrictivas y entran en arresto, acompañado de fosforilación disminuida del CTD [53].

La participación de CAK en la regulación de la transcripción por RNA polimerasa II y su papel en la activación de las Cdks apunta a la existencia de un sistema que coordina simultáneamente a los ciclos de división celular y a la expresión de genes [48].

1.6.3 Efectos de la alteración de las subunidades de CAK en el desarrollo embrionario

Larochelle y Leclerc publicaron en 1998 y 2000, respectivamente, trabajos sobre la relevancia de CDK7, identificándola como la cinasa responsable de la activación de los complejos Cdc2/Ciclina A y Cdc2/Ciclina B en *Drosophila* y mostraron que la disminución de su expresión [54], así como la expresión de alelos dominantes negativos [55], repercuten de manera importante en la progresión del ciclo celular [54] y la activación de la transcripción cigótica [55].

En un trabajo de Qing Yun Liu (2007), la expresión de una forma dominante negativa de la Ciclina H retrasó la activación de la transcripción cigótica en embriones de pez cebra, con lo que la apoptosis sucedió 5 horas después de la fertilización, y llevó a severos defectos en tejidos que normalmente expresan altos niveles de ciclina H. El 48% de los embriones inyectados con la forma dominante negativa de la Ciclina H mostraron retraso en el desarrollo y severos defectos. El 36% de los embriones detuvieron su desarrollo en la etapa de

blástula media. La supervivencia observada parece deberse a que la Ciclina A también puede activar a CDK7, pero este estudio representa una importante evidencia de la relevancia de la Ciclina H para el correcto inicio de la transcripción [56].

Por otra parte, la alteración del gen *MAT1* en ratones lleva a letalidad antes de la implantación, coincidiendo con la depleción de MAT1 materno (tanto de las proteínas como el ARN mensajero). En un modelo de células trofoblásticas gigantes de ratón las células *MAT1*^{-/-} son incapaces de entrar a la fase S, tienen niveles de CDK7 notablemente disminuidos (no así de los elementos de Core) y presentan defectos en la fosforilación del CTD (Tanto ser5 como ser2 del repetido heptapéptido); sin embargo los niveles de transcripción no parecen disminuirse en estas células. Esto se comprobó evaluando la transcripción de novo con un plásmido reportero microinyectado y adicionalmente se monitorearon los niveles de varias proteínas (incluso ciclinas) [57].

De manera consistente, la remoción del gen *MAT1* en células de Schwann de ratón no causa problemas fisiológicos o morfológicos durante el desarrollo ni la juventud, pero comienzan a degenerar apenas alcanzan los tres meses de edad, con lo que se evidencia el carácter regulatorio, mas no esencial de *MAT1* [58].

1.7 Antecedentes

Queda claro que al abatir las funciones de cada elemento de CAK se afecta el desarrollo temprano, siempre con características que apuntan a fallas en el ciclo celular y transcripción, por lo que se vuelve necesario discernir su influencia en dichos aspectos del desarrollo embrionario temprano. El embrión temprano de *D. melanogaster*, presenta varias ventajas sobre otros modelos animales como un modelo de activación de la transcripción cigótica, principalmente la rapidez con la que se desarrollan, la facilidad de su manejo y las múltiples técnicas disponibles para estudiar eventos de su desarrollo temprano. Por estas razones ha sido el modelo de estudio predilecto de este laboratorio.

En un trabajo de Javier Aguilar Fuentes (2006) se observó, utilizando técnicas de inmunotinción, que componentes de TFIIH tienen una distribución muy distinta durante el establecimiento de la transcripción embrionaria: las unidades del Core se encuentran en el citoplasma del embrión sincicial, y desde la división 10 hasta la etapa de blastodermo celular se encuentra preferentemente nuclear, excluyéndose de los núcleos en mitosis durante la gastrulación. CAK es principalmente citoplasmático durante la celularización y la gastrulación pero en etapas posteriores del desarrollo se localiza en el núcleo junto con los otros componentes de TFIIH [59].

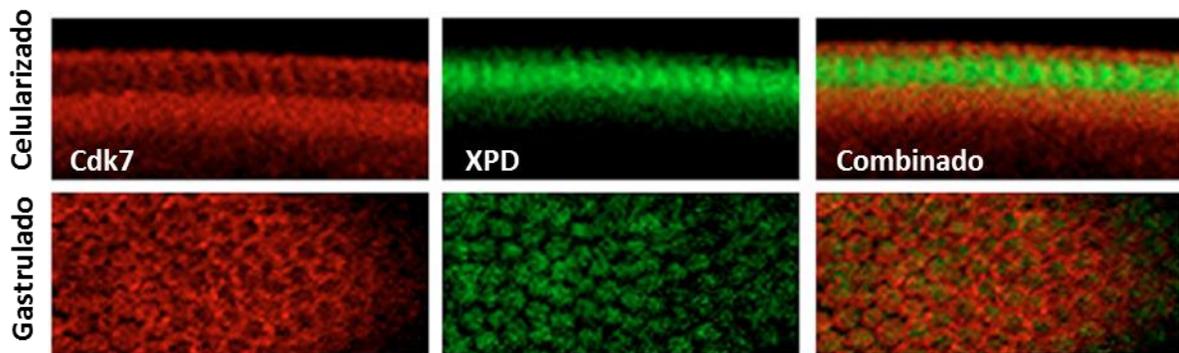


Figura 7. La distribución de Cdk7 y XPD es distinta en el blastodermo celular. Co-inmunotinción de Cdk7 (rojo) y XPD (verde). Panel superior: periferia de un embrión celularizado, donde XPD (verde) se encuentra mayoritariamente localizado en la región nuclear y Cdk7 (rojo) en el citoplasma. Panel inferior: superficie de un embrión gastrulado, se observa que la localización de las proteínas no se traslapa notablemente, con XPD en la región nuclear y Cdk7 en el citoplasma. Tomado de [59].

Interesantemente, en experimentos de inmunoprecipitación se observó que tanto el CAK como el Core se encuentran posicionados en promotores de genes que se activan en el inicio de la transcripción cigótica (*hunchback (hb)* y la histona H3); esto indica que bajo las condiciones utilizadas para preparar y observar las inmunotinciones, no es posible observar la presencia de CAK en el núcleo pero si se encuentra ahí junto con el Core de TFIIH. Co-inmunoprecipitaciones con anticuerpo anti-XPB y anti-CDK7 demostraron que CDK7 y MAT1 se encuentran en fracciones nucleares junto con XPD y XPB, pero

no co-inmunoprecipitan en fracciones del citoplasma, donde solo se observa a XPD con XPB, lo que sugiere que el ensamblaje de TFIIH sucede en el núcleo cuando se encuentran en la transición de blástula media, durante el inicio de la transcripción de los genes cigóticos [59].

En el año 2010, Xiaoming Li et al publicaron un artículo en el que plantean la existencia de CAK como un tetrámero que incluye a XPD; este último encargado de regular la presencia del complejo en compartimentos sub-celulares específicos durante el ciclo celular. En este trabajo indican que la localización de CAK lejos de los cromosomas y de Cdk1 es lo que permite la salida sincrónica de la mitosis en el blastodermo sincicial. En sus inmunotinciones de embriones de entre 10 y 14 ciclos de divisiones nucleares se observa que la señal de CDK7 se pierde cíclicamente durante la mitosis, aunque se acumula en el núcleo durante la interfase, específicamente en la eucromatina, y excluido de la heterocromatina. En su trabajo indican que este resultado difiere con lo descrito por Aguilar-Fuentes (2006) debido a diferencias de afinidad del anticuerpo. Observan que cuando el embrión carece de XPD, CDK7 incrementa su localización en los cromosomas durante la anafase, cuando en los embriones silvestres la señal de CDK7 es mucho menor que la del citoplasma que rodea al núcleo [60].

Como antecedente más reciente a este proyecto está el trabajo realizado por Grisel L. Cruz Becerra en su proyecto de doctorado [61], en el cual demostró que la localización de las subunidades del Core de TFIIH p8, p52 y XPB durante la embriogénesis temprana es altamente dinámica. Estas proteínas se mantienen principalmente nucleares durante la fase de síntesis y la profase y una fracción continúa en los cromosomas durante la metafase, anafase y telofase, enriqueciéndose nuevamente en núcleo en el ciclo siguiente. Aunque el trabajo de Cruz se centró en componentes del Core, un ensayo de inmunotinción de embriones demostró que Ciclina H tiene un patrón de localización similar al Core durante la mitosis, específicamente entre los ciclos 10 y 11 correspondientes al inicio de la transcripción cigótica (Figura 8), lo que contrasta

con los resultados obtenidos por Aguilar-Fuentes en el 2006 y por Li en el 2010. No se conocen funciones de la Ciclina H independientes de CAK, por lo que debería tener una localización y dinámica semejante a CDK7 y MAT1.

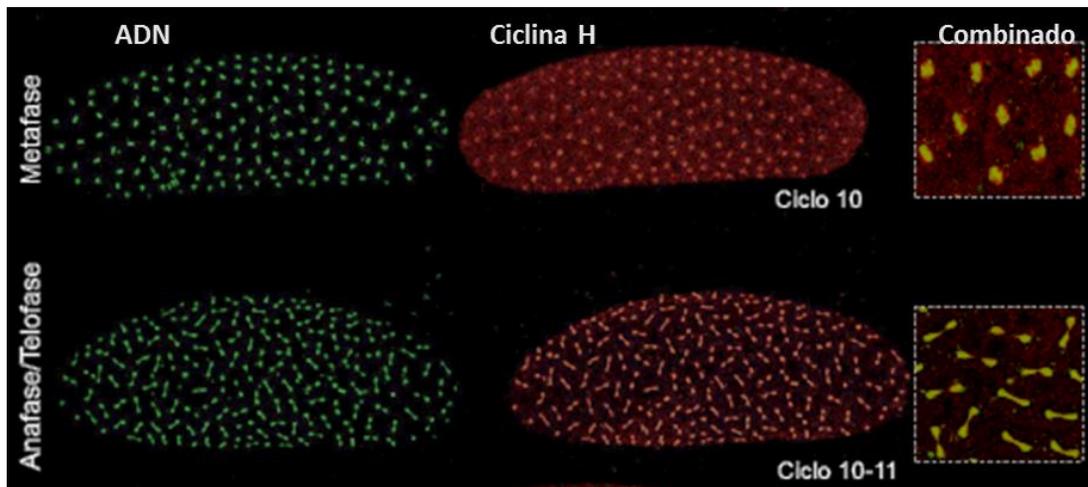


Figura 8. Ciclina H (en rojo) muestra un patrón de localización similar al ADN (en verde) durante la mitosis en embriones tempranos. Inmunotinción de embriones fijados. En la amplificación de ambas fases (recuadros) se observa que en metafase, anafase, y telofase la señal de ciclina H se traslapa con la del ADN (semejante a lo que se había observado previamente con componentes del Core, pero no para CDK7 o MAT1). Imagen cortesía de Grisel Cruz Becerra, dato sin publicar.

2. JUSTIFICACIÓN

La maquinaria basal de la transcripción se ha estudiado ampliamente y aún así, poco se sabe sobre su funcionamiento y composición durante la activación de la transcripción cigótica. Los embriones de mosca *Drosophila melanogaster* resultan un interesante modelo de estudio debido a que las primeras rondas de transcripción ocurren entre ciclos de división nuclear de entre 9 y 10 minutos, en lugar de horas como en las células de adultos. Estudiar la distribución de los componentes de dicha maquinaria durante el desarrollo temprano ayudará a comprender parte de los complejos mecanismos que orquestan la activación de la transcripción cigótica, paso esencial en el desarrollo embrionario. Los reportes previos sobre la localización de estas proteínas en el embrión temprano vienen de ensayos de inmunotinción de muestras fijadas, por lo que obtener un modelo que permita observar a CAK (como un complejo independiente y como parte de TFIIH) *in vivo* permitirá obtener datos más confiables respecto a su distribución y dinámica.

3. HIPÓTESIS

Ya que la participación del CAK es importante durante las primeras rondas de transcripción del embrión, se requerirá que al menos una pequeña porción permanezca unida a la cromatina mitótica, y por lo tanto, cambios en la cantidad de este complejo impactarán en la viabilidad del embrión temprano.

4. OBJETIVOS

Objetivo General:

Conocer la dinámica así como el impacto de la disminución del sub-complejo CAK del factor de transcripción TFIIH durante la activación de la transcripción embrionaria *in vivo*.

Objetivos Particulares:

- 1) Obtener la dinámica de los tres componentes del sub-complejo CAK utilizando microscopía confocal de embriones vivos.
- 2) Evaluar los efectos de la disminución de los componentes del sub-complejo CAK en el desarrollo del embrión temprano.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

- Para determinar la dinámica del CAK durante la activación de la transcripción cigótica usando microscopía confocal, se generaron líneas de moscas transgénicas que expresan a las proteínas CDK7, MAT1 y Ciclina H fusionadas a proteínas fluorescentes.
- Para determinar si las proteínas recombinantes pueden cumplir la función biológica de las proteínas silvestres, se realizaron ensayos de rescate de fenotipo con líneas mutantes de CDK7 y MAT1.
- Para evaluar el papel de CDK7 en el desarrollo embrionario se expresó RNA interferente durante la ovogénesis con un sistema UAS-GAL4. Se comprobó la disminución de CDK7 en embriones tempranos mediante ensayos de western blot, y se evaluó el efecto de dicha disminución en la mitosis mediante inmunotinciones. Adicionalmente, se realizaron ensayos de oviposición y supervivencia.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Generación de moscas transgénicas

Debido a que se desconoce la estructura de CAK y por lo tanto la posible interferencia de las proteínas fluorescentes, se generaron proteínas recombinantes marcadas en el extremo carboxilo o amino terminal. En la Figura 9 se muestran las 6 posibles proteínas recombinantes de CAK.

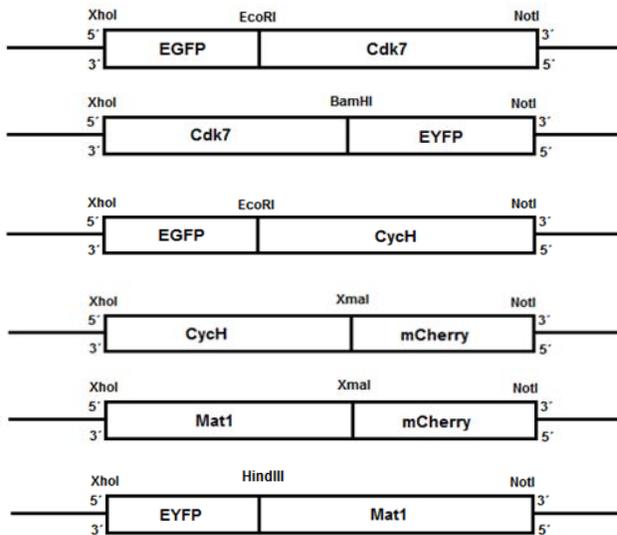


Figura 9. Construcciones de las proteínas recombinantes generadas para su posterior expresión en *Drosophila melanogaster*. En este esquema se muestran las 6 líneas de proteínas transgénicas tal como quedaron insertadas en el vector pCaSper-Hsp83.

6.1.1 Obtención de cDNA

La extracción de ARN se realizó utilizando el protocolo descrito en el instructivo de TRIzol® Reagent: Se homogenizaron 100 mg de moscas de menos de 24 horas de edad, de fenotipo silvestre (Oregon-R) en 1mL de trizol seguido de centrifugación a 12000 x g por 10 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se dejó incubar por 5 min a temperatura ambiente (TA). Se agregaron 0.2 mL de cloroformo y se agitó a mano por 15 s, incubando después durante 3 min a TA. Se centrifugó a 12000 x g por 15 min a 4°C. Se recuperó la fase acuosa (superior, incolora) y se le agregaron 0.5 mL de isopropanol, se dejó incubar por 10 min a TA y se centrifugó de nuevo a 12000 x g por 10 min a 4°C. Después de eliminar el sobrenadante se agregó 1 mL de etanol al 75%, se agitó en vórtex brevemente y se centrifugó a 7500 x g por 5 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar para luego resuspender en 100 µL de agua libre

RNAsas, seguido de 15 min de incubación a 60°C. El RNA se cuantificó por NanoDrop, se corrió un gel para comprobar que no estuviera degradado y se almacenó a -70°C.

Se generó el cDNA utilizando el Kit M-MLV Reverse Transcriptase (200 U/μL) de Invitrogen™, con el siguiente protocolo: Se mezclaron 1 μg de RNA, 1 μl de dNTPs a 10 mM, 0.5 μL de Oligo-dT, 0.5 μL de Random primers y se llevó a 13 μL con agua libre de RNAsas, se calentó a 65°C por 5 min, seguido de un paso por hielo, para agregar 4 μL de buffer 5X, 2 μL de DTT 0.1 M y 0.5 μL de RNase Out, después de mezclar se incubó a 37°C por 2 min para agregar finalmente 1 μL de transcriptasa reversa e incubar 1 h a 37°C seguido de un paso de desactivación de 15 min a 65°C. Se realizó una PCR de punto final con oligonucleótidos para amplificar Rp49, usando ADN genómico como control (Rp49 es 100pb más grande en gADN) y el cDNA resultó libre de gDNA.

6.1.2 Obtención de amplicones para las construcciones fluorescentes

Con dicho stock de cDNA se amplificaron las secuencias complementarias de ARN mensajero de los genes CDK7, MAT1 y Cych, a las cuales se agregaron sitios de restricción en ambos extremos, como se indica en la Figura 9, con el fin de poder introducirlos a los vectores de amplificación. Los oligonucleótidos utilizados para dichas amplificaciones se muestran en la Tabla 2.

Adicionalmente se diseñaron oligonucleótidos para amplificar EYFP y mCherry (Tabla 3), con los sitios de restricción indicados en la Figura 9. y se amplificaron a partir de vectores disponibles en el laboratorio.

Oligo	Clave	Secuencia (5' -> 3')
181	EcoRI-Cdk7	AGA CTT GAA TTC CTG CCC AAT GCG AAT GAC AAA
182	Cdk7-NotI	GAT TCA GCG GCC GCC TAG AAC TGC AGC CGC TTC
183	EcoRI-CycH	AGA CTT GAA TTC TAT CCT GTG AGC TCG CAA AAG
184	CycH-NotI	GAT TCA GCG GCC GCC TAT TGG CTG ATG TTC ATA
185	XhoI-CycH	AGA CTT CTC GAG ATG TAT CCT GTG AGC TCG CAA
186	CycH-XmaI	AGA CTT CCC GGG TTG GCT GAT GTT CAT AGC AGA
187	XhoI-MAT1	AGA CTT CTC GAG ATG GAC GAC CAG GCG TGC CCG
188	MAT1-XmaI	AGA CTT CCC GGG GGT GCC AGA TAC CAC ACC CGT
189	XhoI-Cdk7	AGA CTT CTC GAG ATG CTG CCC AAT GCG AAT GAC
190	Cdk7-BamHI	AGA CTT GGA TCC CGG AAC TGC AGC CGC TTC TTC
193	HindIII-MAT1	GAT TCA AAG CTT GAC GAC CAG GCG TGC CCG CGG
194	MAT1-NotI	GAT TCA GCG GCC GCC TAG GTG CCA GAT ACC ACA

Tabla 2. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para amplificar a los componentes del CAK con secuencias para enzimas de restricción en los extremos, al indicar el año 2015 más el No. de Oligo, se puede acceder a los datos de síntesis desde el buscador de oligos del IBt.

Oligo	Clave	Secuencia (5' -> 3')
191	XhoI-EYFP	AGA CTT CTC GAG ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG
192	EYFP-HindIII	GAT TCA AAG CTT CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC
4424	XmaI-mCherry	AGA CTT CCC GGG GTG AGC AAG GGC GAG GAG GAT
6023	3' mCherry-Not I	AGT TCA GCG GCC GCT TAC TTG TAC AGC TCG TC

Tabla 3. Oligonucleótidos específicos para las proteínas fluorescentes. El Oligonucleótido número 6023 fue sintetizado en 2012, a diferencia de todos los demás, que fueron sintetizados en 2015.

Se utilizaron dos protocolos para generar los amplicones, y tres enzimas polimerasa distintas (Tabla 4). Los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa al 0.8% disuelta en TBE 0.5X (Preparación en Anexo V) con 0.1 μ L/mL de bromuro de etidio 5 mg/mL, en TBE 0.5X a 80-100 V. Se utilizó el marcador de peso O´Gene Ruler de Thermo Scientific y se cortó la banda del tamaño esperado para cada amplicón (Aprox. 1Kb para componentes de CAK y 750pb para las proteínas fluorescentes) para luego realizar la extracción de ADN con el

Kit QIAEX II Gel Extraction de QIAGEN. En promedio utilizamos el producto de 5 reacciones de cada juego de oligonucleótidos para reunir la cantidad suficiente de amplicón para llevar a cabo las digestiones. Para una revisión detallada de las reacciones de amplificación realizadas, ver Anexo I.

Reactivo	Taq Pol dNTPack ^a /Expand High Fidelity ^b	Taq DNA Polymerase ^c
Agua	17.5	15.5
Buffer 10X	2.5	2.5
MgCl ₂ (25mM)	NA	2
dNTP´s (10mM)	0.5	0.5
Oligonucleótido 5´ (10µM)	1.5	1.5
Oligonucleótido 3´ (10µM)	1.5	1.5
Enzima (1 U/µL)	0.5	0.5
ADN (100 ng/µL)	1	1
Volumen final (µL)	25	25

Tabla 4. Volúmenes de reactivo necesarios para una reacción de PCR. Las condiciones del termociclador fueron: inicio 94°C x 3 min, desnaturalización 94°C x 30 s, alineamiento 55°C x 30 s, elongación 72°C x 1 min y terminación de 72°C X 7 min, por 35 ciclos. a) Roche, Taq Pol dNTPack Prod. No. 04728866001 (Lote 14398221), b) Roche, Expand High Fidelity Enzyme Mix Prod. No. 04738250001 (Lote 11075538 y 13434020), c) Thermo Scientific, Taq DNA polymerase EP0404 (Lote 00197145).

6.1.3 Construcciones fluorescentes de los componentes de CAK

La generación de las líneas transgénicas en *Drosophila* requiere transformación por elemento P, que consiste en inyectar embriones en pre-blastodermo con una construcción basada en un elemento transponible no autónomo, que se integrará en las células germinales del embrión gracias a la co-inyección con otro plásmido que codifica a la transposasa, la cual no se integra al genoma. La especificidad se logra inyectando el polo posterior del blastodermo sincicial, donde se encuentran las células polares que darán lugar a las células germinales en la

mosca adulta [63]. El vector elegido para introducir las construcciones, pCaSpeR Hsp83, contiene un elemento P y al gen *white* como reportero, permite la expresión constitutiva pero moderada del gen introducido, gracias a su promotor de Heat Shock Protein 83. En contraste a la mayoría de las proteínas Heat Shock, esta también se expresa a temperaturas normales de crecimiento, durante el desarrollo y la ovogénesis (<http://www.uniprot.org/uniprot/P02828>).

pCaSper Hsp83 no es un vector comercial y no conocemos todos sus sitios de restricción. Debido a esto, la introducción de los amplicones no siempre pudo ser directa y requerimos de clonación en vectores auxiliares. La purificación de ADN plasmídico a partir de cultivos de *E. coli* (DH5a) se realizó con el Kit QIAprep Miniprep de QIAGEN y se cuantificó utilizando NanoDrop. En la Figura 10 se muestran los pasos a seguir para lograr introducir los amplicones en la construcción final.

a) Restricción.

Las enzimas de restricción son endonucleasas que cortan el ADN en secuencias específicas cortas de entre 4 y 8 pares de bases, casi siempre palindrómicas, dejando extremos que pueden ser romos o escalonados, estos últimos también llamados extremos cohesivos [62]. Las enzimas utilizadas en este trabajo solo dejan extremos cohesivos. Los productos de PCR de *Cdk7*, *MAT1*, *CycH*, *EYFP* y *mCherry* fueron amplificados con oligonucleótidos que añaden los sitios de restricción pero también 6 pares de bases adicionales a los extremos, que facilitan la unión de las enzimas de restricción y son eliminados al realizar la digestión de los productos.

Para una reacción de restricción de amplicones se mezcló el buffer especial para la enzima (3 μ L de un stock 10X), de 5 a 10 unidades de la enzima, BSA (si así lo requiere la enzima), 1 μ g de producto de PCR purificado y se llevó a 30 μ L con agua estéril. Se incubó a 37°C por 12 h y después se inactivó la reacción a 65°C por 20 min.

Los plásmidos comerciales usados fueron pBluescript II SK+ (2.9Kb) y pEYFP-N1 (4.7Kb) y los plásmidos ya previamente modificados (por Grisel Cruz) fueron pHsp83 con el inserto *EGFP-XPD* (11.6Kb), y pEGFP-N1 con el inserto *XPB-*

mCherry (6.9Kb). Para cada reacción de digestión se mezcló el buffer especial para la enzima (4 μ L de un stock 10X), de 5 a 10 unidades de enzima, BSA (si así lo requiere la enzima), 2 μ g de plásmido purificado y se llevó a 40 μ L con agua estéril. Se incubó a 37°C por 12 h y después se inactivó la reacción a 65°C por 20 min.

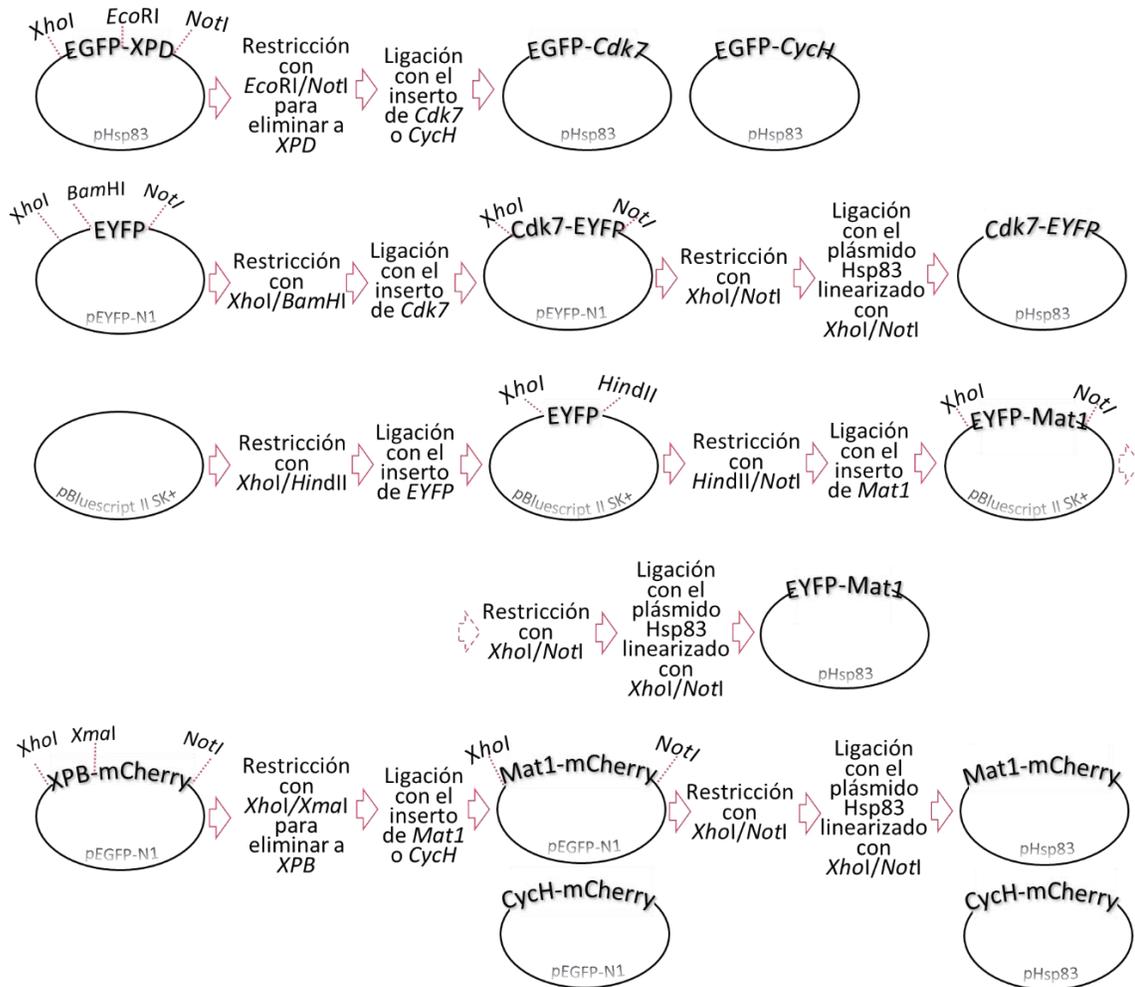


Figura 10. Esquema de la estrategia utilizada para la construcción de los genes recombinantes. Los insertos tienen sitios para enzimas de restricción en los extremos que deben ser digeridos también con las respectivas enzimas, antes de poder realizar una reacción de ligación.

Tanto las digestiones de los productos de PCR como de los plásmidos se corrieron en geles de agarosa al 0.8% con 0.1 μ L/mL de bromuro de etidio a una

concentración de 5 mg/mL, en TBE 0.5X, a 80-100 V. Se utilizó el marcador de peso O´Gene Ruler de Thermo-Scientific y se cortó la banda del tamaño indicado, para luego realizar extracción de ADN con el Kit QIAEX II Gel Extraction de QIAGEN. Los productos purificados se cuantificaron por NanoDrop.

b) Ligación.

Una ligasa del fago T4 cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre un grupo hidroxilo libre en el extremo 3´ y un grupo fosforilo en el extremo 5´ entre cadenas de ADN con extremos discontinuos, utilizando ATP como cofactor [62], tal como los extremos dejados por las enzimas de restricción. Para una reacción de ligación se utilizaron 100 ng del vector, inserto (cuanto fuera necesario según la ecuación de abajo), 2 µL de buffer 10X, 1 µL de la enzima T4 DNA ligase 1 U/µL de Thermo Scientific, y agua estéril suficiente para 20 µL totales. Para determinar la cantidad de inserto necesario calculamos con:

$$\frac{(ng\ de\ vector)(Tamaño\ del\ inserto)}{(Tamaño\ del\ vector)} \times 3 = ng\ de\ inserto$$

Se incubó a 22°C por 30 min, seguido de 18°C por toda la noche, y nuevamente a 22°C por 30 min, finalmente se desactivó la reacción a 65°C por 10 min. Se almacenaron a -20°C.

c) Purificación.

Antes de transformar por electroporación, es muy importante purificar las reacciones de ligación para eliminar las sales. La muestra se llevó a 100 µL con agua inyectable. Se agregaron 100 µL de butanol, se agitó en vórtex por 5 s y se centrifugó a 15000 xg por 1 min. Se eliminó la fase superior (butanol) y se repitió la extracción con butanol 2 o 3 veces más, la fase inferior es agua y su volumen disminuyó consecutivamente hasta desaparecer y permitir observar un pellet. Se eliminó el butanol sin perturbar el pellet y se agregaron 200 µL de etanol absoluto frío, se agitó en vórtex por 5 s y se centrifugó a 15000 xg por 3 min. Se repitió el lavado pero con etanol al 70% frío. El pellet se dejó secando por 10-15 min y se resuspendió en 10 µL de agua inyectable. Estas alícuotas se almacenan a -20°C.

d) Transformación.

La electroporación permite introducir ADN foráneo en bacterias (como *E. coli*) al formar poros microscópicos transitorios en la membrana externa de las células, mediante la aplicación de campos eléctricos intensos por tiempos cortos [64]. Se descongelaron células electrocompetentes (aproximadamente 40 μ L), se mezclaron con 10-30 ng de ADN plasmídico purificado y se colocaron en una celda de electroporación fría (evitar formar burbujas). Se electroporaron a 1.8 mV durante 5 ms (predeterminado en el aparato) y se resuspendieron las células en medio de recuperación (840 μ L de medio SOB, 30 μ L de glucosa 2M, 30 μ L de $MgCl_2$ 2M), se pasaron a un tubo de ensaye y se incubaron a 37°C, en agitación a 250 rpm durante 1 h. Después de la recuperación se sembraron 25, 50 y 100 μ L del cultivo en placas de agar Luria Bertani (LB) con antibiótico (pBluescript II SK+ y pHsp83 en ampicilina 100 μ g/mL, pEYFP-N1 y pEGFP-N1 en kanamicina 30 μ g/mL). Se esparció con perlas de vidrio. Las placas se incubaron a 37°C por un máximo de 16 h y se eligió a las colonias transformadas por PCR de colonia.

e) PCR de colonia.

Se eligieron entre 10 y 12 colonias de cada construcción, se utilizó la enzima Taq DNA polymerase EP0404 de Thermo Scientific, con las condiciones descritas en Tabla 4, y los oligonucleótidos necesarios, según cada construcción. Cada muestra se tomó con una punta de pipeta estéril, tocando ligeramente la superficie de la colonia, y se resuspendió en la mezcla para la reacción. Esta misma colonia se resembró por separado y en caso de resultar positiva para el inserto, se amplificó en 5mL de medio LB líquido con el antibiótico correspondiente para extraer el plásmido con el Kit QIAprep Miniprep de QIAGEN y se cuantificó utilizando NanoDrop.

f) Secuenciación.

Después de cada paso de inserción en un nuevo plásmido y de la selección de las colonias positivas, las muestras de plásmido purificado se enviaron a la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología, con las condiciones

indicadas en su manual. Los oligonucleótidos utilizados para secuenciar fueron tanto aquellos mencionados en la Tabla 2 como los de la Tabla 5, dependiendo de la región que queríamos observar. Las secuencias resultantes se analizaron con el programa FinchTV, alineando contra las secuencias obtenidas en la base de datos de NCBI y en la hoja técnica de los plásmidos comerciales. Se eligió una colonia libre de mutaciones de cada construcción para extraer ADN plasmídico.

Oligo	Clave	Secuencia (5'->3')	Región observable
5007	3' XFPseq	GAC GTT GTG GCT GTT GTA	Primeras 400 pares de bases de EGFP y EYFP
2367	Fwrđ EGFP-Cdk7	TAT ATT AAC GCA GGC GAA	Cdk7, segunda mitad del gen (Aprox. 650pb)
2368	Rvso EGFP-Cdk7	CGC CAA TCT TTA GGA TGC	Cdk7, primera mitad del gen (Aprox. 400pb).
2369	Fwrđ EGFP-CycH	GTT CTA TCT GAA CAA CTC	CycH, segunda mitad del gen (Aprox. 650pb)
2370	Rvso EGFP-CycH	ACT ATG TCG GTG GCC TTG	CycH, primera mitad del gen (Aprox. 350pb).
2371	Fwrđ mCherry	GGG ATG GTG AGC AAG GGC	mCherry, casi todo el gen (Aprox. 650pb), excepto por los primeros 70-80pb.
2372	F MAT1-mCherry	ATC GAG ACA AAC AAG CGT	MAT1, segunda mitad del gen (Aprox. 580pb)
2374	Fwrđ EYFP	TTG GCC CAG AAG AAG CGG	Cdk7, toda la secuencia del gen EYFP (720pb) Su secuencia es complementaria a las últimas bases de Cdk7.
2906	IntF CycH	AGA TCG TCT GCG GCC ACA	CycH, segunda mitad del gen (Aprox. 400pb)

Tabla 5. Oligonucleótidos para secuenciar construcciones de proteínas fluorescentes. 3' XFPseq es del año 2009, mientras que los demás fueron sintetizados en 2015. Para más detalles ir a la Tabla 1 del Anexo I.

6.1.4 Micro-inyección de embriones

Se utilizó el servicio de microinyección de embriones de *Drosophila*, BestGene, para el cual requerimos enviar por correo al menos 50 µg de plásmido purificado. Se realizó la extracción de ADN plasmídico con el kit Midiprep de QIAGEN y se envió por correo disuelto en agua, a una concentración de entre 0.5 y 0.8 µg/µL. Después de aproximadamente 3 meses, BestGene nos envió las moscas transgénicas, entre 4 y 9 líneas, dependiendo del inserto.

6.2 Selección de las líneas de moscas fluorescentes

Las líneas de moscas transgénicas enviadas por BestGene eran positivas para la inserción de la construcción en el genoma, mas no para la producción de la proteína recombinante, por lo que se seleccionaron líneas de moscas fluorescentes y posteriormente se realizó western blot para comprobar que dicha fluorescencia se debiera a las proteínas recombinantes.

6.2.1 Disección de ovarios y testículos

Para la disección de ovarios se seleccionaron moscas de entre 3 y 5 días de edad, la cuales fueron sedadas con CO₂ y colocadas en pozos de disección con PBS 1X (Preparación en Anexo V) frío, sobre una cama de hielo. Utilizando pinzas de disección de punta delgada y un microscopio estereoscópico se extrajeron los ovarios como se indica en la Figura 11 (a-d). Las cámaras de huevos se colocaron en una gota de PBS 1X entre dos cubreobjetos y se comprobó su fluorescencia utilizando un microscopio de fluorescencia convencional, comparando con la línea mutante *W¹¹¹⁸* como control (Figura 11 e-f). Se seleccionaron aquellas líneas que presentaron mayor fluorescencia para su amplificación. Se evaluaron las líneas con construcciones para *EGFP-Cdk7*, *EYFP-MAT1*, *MAT1-mCherry*, *EGFP-CycH* y *CycH-mCherry*.

En el caso de los testículos se siguió prácticamente el mismo protocolo, con las diferencias que los machos deben tener una edad de entre 0 y 24 horas y en lugar de PBS se utilizó Testis Buffer (TB, Preparación en Anexo V). Los testículos son mucho más pequeños que los ovarios pero tienen una forma de espiral característica.

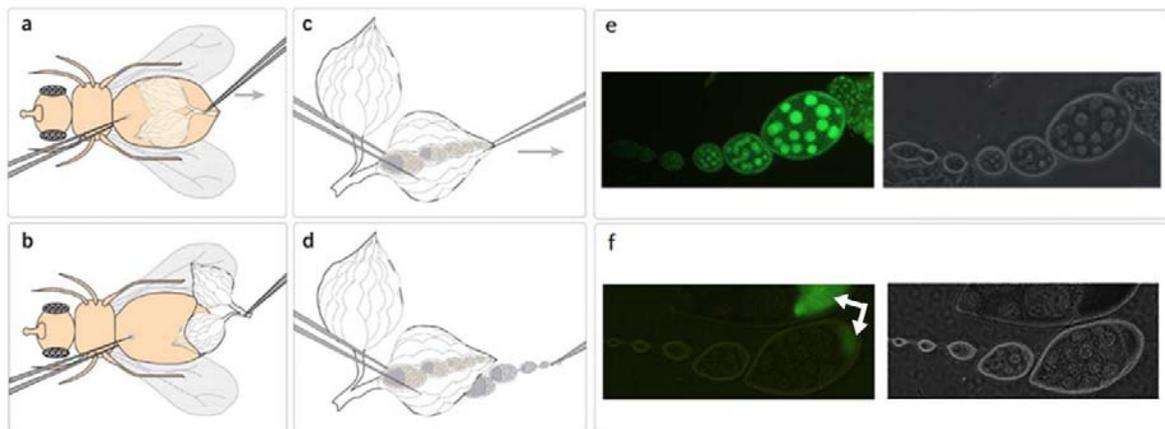


Figura 11. a-d) Técnica de extracción de ovarios (imagen tomada de [79]) las moscas y ovarios se mantienen sumergidos en PBS. En a-b) los ovarios se sacan pinchando el último segmento abdominal y halando con un único movimiento, en c) se muestran ambos ovarios y resaltado en gris, una ovariola. d) Las ovariolas se separan para su observación. e) Micrografía de una ovariola fluorescente de una mosca transgénica *EGFP-Cdk7* vista bajo iluminación para epifluorescencia; la señal se observa principalmente en los núcleos de las células nodriza; a la derecha, morfología de la ovariola, en campo claro. f) Control de fenotipo silvestre con la línea *w¹¹¹⁸*, no hay núcleos fluorescentes y solo se observa auto-fluorescencia esperada para las células del folículo (flecha blanca); a la derecha, morfología de la ovariola, en campo claro. Objetivo 20X, Microscopio Nikon E600.

6.2.2 Ensayo de Western Blot para comprobar la expresión de las proteínas transgénicas

a) Extracto total de proteína

Se realizó un extracto de proteínas totales a partir de moscas de 1 a 2 días de edad. Se homogeneizaron 100 mg de moscas completas en tubos de microcentrífuga con 500 μ L buffer de homogeneizado (BH, preparación en Anexo V) adicionado con inhibidor de proteasas Complete™ (Sigma-Aldrich), al cual se agregó SDS hasta obtener una concentración final de 1% y se centrifugó a 10000 **xg** durante 20 min a 4°C de 3 a 4 veces (hasta obtener un sobrenadante clarificado).

b) Cuantificación de proteínas mediante Bradford

Se preparó una curva estándar con 0, 4, 8, 12 y 16 μ L de un stock de 1 μ g/ μ L de BSA en 800 μ L finales de agua, para las muestras se usó 1 μ L de extracto en 800 μ L finales. Se mezclaron en vórtex y se agregaron 200 μ L de reactivo de Bradford, seguido de 15 min de incubación a TA. Se cuantificó en un espectrofotómetro en celdillas de 1 mL en espectrofotómetro.

c) Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para la separación de las proteínas por gel desnaturizante se requiere preparar dos capas de gel. El primero es un gel separador al 10%, se mezclaron 2.334 mL de agua, 3.28 mL de Tris 1M pH 8.8, 87.5 μ L de SDS al 10%, 2.917 mL de acrilamida-bisacrilamida al 30% (Preparación en Anexo V), 35 μ L de persulfato de amonio (PSA) al 10% y 7.3 μ L de TEMED. El segundo, un gel concentrador al 5%, se preparó mezclando 1.7 mL de agua, 315 μ L de Tris 1M pH 6.8, 25 μ L de SDS al 10%, 415 μ L de acrilamida-bisacrilamida al 30%, 25 μ L de PSA al 10% y 2.5 μ L de TEMED. Se utilizaron vidrios para geles de 1.5 mm y peines para 10 pozos para la cámara Mini PROTEAN 3 Cell de Bio-Rad. Para preparar las

muestras se mezcló un volumen de Laemli 2X (Preparación en Anexo V) por un volumen de muestra de 50 µg de proteína por carril y se puso a hervir en baño María por 10 min. Las muestras se corrieron a 80V en el buffer de corrida (Preparación en Anexo V) hasta que las muestras entraron al gel separador y se subió a 120V. Se utilizó 1.5 µL del marcador de peso Precision Plus Protein Dual Color Standards de Bio-Rad.

d) Transferencia

El gel se colocó en un *sándwich* de transferencia como se indica a continuación: reja, esponja, tres láminas de papel filtro, membrana de nitrocelulosa (previamente hidratada en agua por 5 min y buffer de transferencia por 5 min más), gel, tres láminas de papel filtro, esponja y reja, manteniendo todo en buffer de transferencia (Preparación en Anexo V) frío. Se colocó en un mini tanque de transferencia TE 22 de Amersham Biosciences y se transfirió por 12 h a 80 mA y luego 2 h a 200 mA. Una vez listo la membrana se enjuagó con agua, se tiñó con Ponceau por 10-15 min y se enjuagó con agua hasta eliminar el exceso de colorante. Se dejó secar para cortar las bandas deseadas.

e) Western Blot

Los fragmentos de membrana se rehidrataron con agua y posteriormente PBST (PBS 1X y Tween 20 al 0.1%). Se bloqueó la membrana con PBST con leche al 10% por 2 h a TA. El anticuerpo primario se agregó a PBST con leche al 5% y se dejó en agitación muy suave por toda la noche a 4°C (o 3 h a TA) y posteriormente se realizaron 6 enjuagues de 10 min cada uno con PBST. Las diluciones variaron para cada anticuerpo (Tabla 6). El anticuerpo secundario correspondiente se diluyó también en PBST con leche al 5% y se dejó en agitación suave por 3 h a TA, seguido de 6 enjuagues de 10 min cada uno con PBST. Al final se realizó un enjuague con PBS y se reveló por quimioluminiscencia.

Anticuerpos primarios			
Anticuerpo	Origen	Marca	Dilución
α -CDK7 ds-17	Cabra	Santa Cruz	1: 1000
α -MAT1 FL-309	Conejo	Santa Cruz	1: 1000
α -GFP A01704	Conejo	Genscript	1: 3000
α -Actina JLA20	Ratón	DSHB	1: 4000
α -Tubulina E7	Ratón	DSHB	1: 3000
Anticuerpos secundarios			
Anticuerpo	Origen	Marca	Dilución
α -Cabra-HRP	Conejo	Invitrogen	1: 3000
α -Conejo-HRP 656120	Cabra	Invitrogen	1: 3000
α -Ratón-HRP A10668	Cabra	Life Technologies	1: 3000

Tabla 6. Anticuerpos y diluciones utilizadas en los ensayos de Western Blot. α -Tubulina E7 y α -CDK7 ds-17 también se utilizaron en los ensayos de ARN interferente.

6.2.3 Balanceo de los cromosomas de las moscas transgénicas y cruza con marcadores nucleares

Un cromosoma balanceador tiene secuencias invertidas que no le permiten aparearse con su homólogo durante la profase meiótica. Su presencia se identifica por la expresión de marcadores (mutaciones dominantes) y se puede rastrear su segregación a lo largo de las generaciones, así que si la progenie no presenta el marcador distintivo del cromosoma balanceador, sabemos que tenemos un organismo homocigoto para el cromosoma homólogo [65]. Por lo tanto la presencia o ausencia de un cromosoma balanceador nos permite elegir genotipos intermedios durante las cruza. Esto es de particular relevancia ya que para comprobar que los componentes de CAK se encuentran en el núcleo, es necesario obtener una línea de moscas que exprese tanto proteínas de CAK fluorescentes como un marcador nuclear *in vivo*. Los marcadores elegidos fueron:

H2Av-RFP. *Drosophila* tiene una única variante de H2A que cumple las funciones de H2A.Z en humano y tiene un motivo c-terminal como H2A.X. Comparte un 55% de semejanza con H2A y funciona en la forma activa de algunos promotores, como base de heterocromatina y como sensor de daño al DNA [66], además de ser depositada en el embrión de forma materna y se encuentra en niveles casi constantes en todos los estadios evaluados [67].

Jupiter-GFP. Jupiter es una proteína de *Drosophila* que se asocia a los microtúbulos y fusionada a GFP constituye un excelente marcador de la dinámica de los microtúbulos *in vivo*. La proteína transgénica Jupiter-GFP se encuentra en concentraciones particularmente altas en el embrión temprano, el sistema nervioso larvario, precursores de los fotorreceptores del ojo y en los ovarios de adultos [68].

Balancear un cromosoma es una expresión que se utiliza para indicar que se ha agregado un cromosoma balanceador para evitar perder un genotipo deseado a lo largo de varias generaciones, mantener viable una línea con una mutación letal, o bien, en el contexto de estas cruzas, marcar los cromosomas que deseamos intercambiar por aquellos que contienen los genes de las proteínas recombinantes. En el laboratorio existe una línea que utiliza tres cromosomas balanceadores (a la que llamamos doble balanceador, ya que permite balancear a los cromosomas 2 y 3):

$$w^{1118}; \frac{Sp}{CyO}; \frac{MKRS}{TM6}; \frac{+}{+}$$

Estas moscas tienen ojos blancos (por la mutación w^{1118}), alas curvadas en lugar de planas (por el marcador del cromosoma *CyO*), pelos cortos y gruesos (por el marcador de *MKRS*) y son más pequeñas que una mosca silvestre (por el marcador de *TM6*). *Sp* no es un cromosoma balanceador, es un alelo letal recesivo cuyo fenotipo es la presencia de quetas (o cerdas) extras en el área esternopleural a 25°C (<http://flybase.org/reports/FBaI0015984.html>). La planeación de las cruzas para obtener una línea transgénica balanceada requiere únicamente hacer un cuadro de Punnett y tener en mente el fenotipo final deseado:

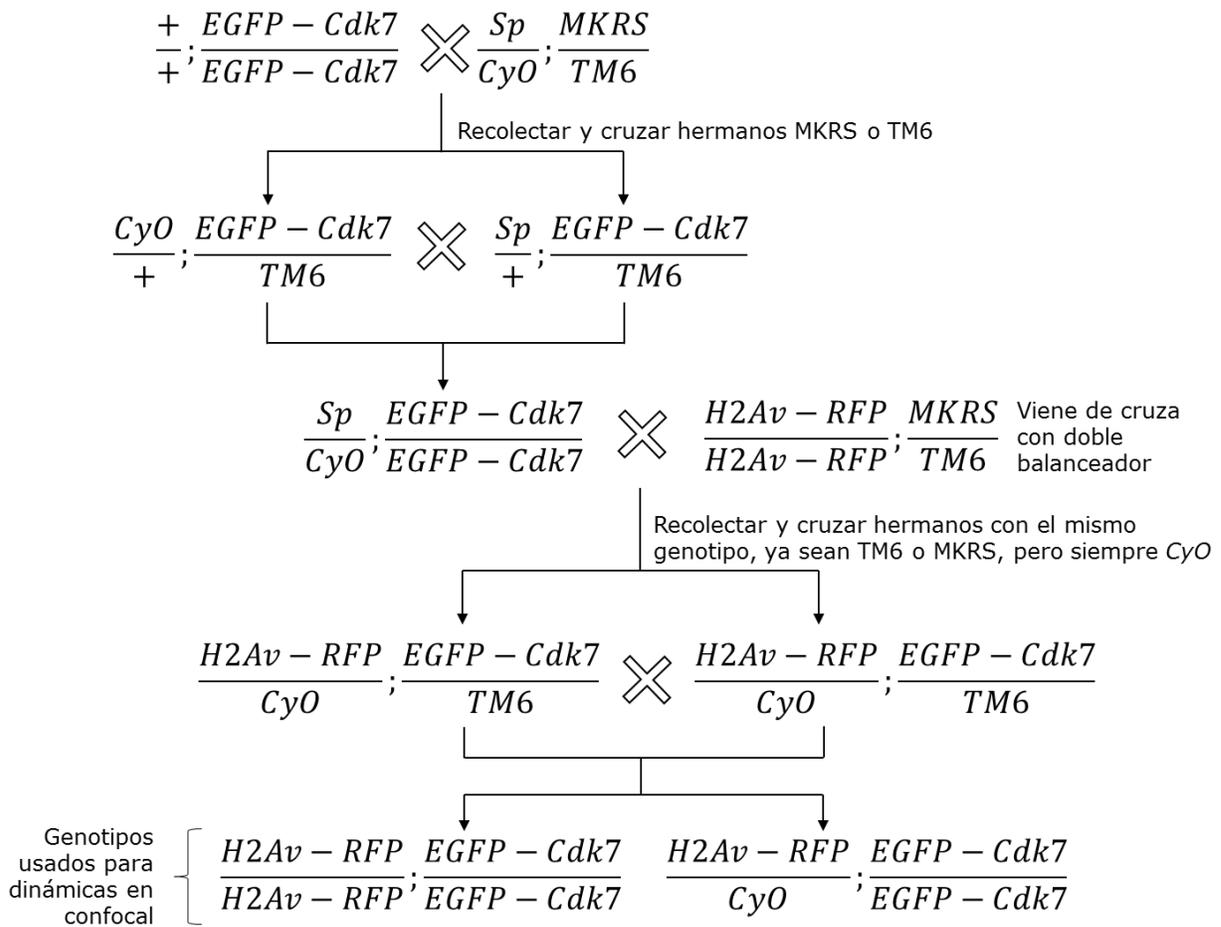


Figura 12. Diagrama general que ejemplifica las cruzas necesarias para obtener una línea que expresa ambas proteínas fluorescentes. Se siguió este esquema para lograr las cruzas de *EYFP-MAT1* con *H2Av-RFP* y *Jupiter-GFP* con *MAT1-mCherry* y *Cych-mCherry*.

6.3 Obtención de la dinámica de localización de los componentes de CAK

6.3.1 Amplificación de líneas y tratamiento de embriones

Una vez elegidas las líneas de moscas transgénicas que expresan a un componente de CAK fluorescente y un marcador nuclear, se amplificó la población de estas moscas realizando pases de adultos en botellas con medio de maíz y pasaron alrededor de 12 días para la eclosión de las nuevas generaciones. Los adultos jóvenes (aproximadamente 500 individuos de entre 3 y 5 días de edad) se colocaron en contenedores especiales (Figura 13) a los que llamamos

"cages". La tapa contiene medio de agar con jugo de manzana (Preparación en Anexo V) y se cubre con un poco de levadura disuelta en agua para alimentar a las moscas y promover que ovipositen en el medio. Se dejaron comiendo levadura al menos un día previo a la colecta y posteriormente se realizaron cambios de medio cada dos horas para promover la sincronización de las oviposiciones.

Para coleccionar, dejamos que las moscas ovipositaran en el medio con levadura durante 1 h 30 min y transferimos los embriones a un filtro de tela (nytex) (Figura 13, bordes naranja), removiendo los embriones del medio con suficiente agua y un pincel suave. Se lavaron con agua destilada hasta eliminar cualquier residuo de levadura. Para decorionar a los embriones, se colocó el filtro dentro de un contenedor con hipoclorito de sodio al 2.5% suficiente para cubrir los embriones y se incubó por 90 s a TA. Los embriones se lavaron con suficiente agua, hasta eliminar el olor a cloro, y se secaron ligeramente (es importante mantenerlos húmedos). Con ayuda de un pincel de punta fina, los embriones decorionados se colocaron sobre portaobjetos de 24x60 mm (Corning) previamente tratados con heptaglue (sobrenadante de 6 cm de cinta adhesiva agitada toda la noche en 2 mL de heptano) y finalmente se agregó una pequeña gota de aceite de halocarbono 700 (Sigma-Aldrich) sobre cada uno.

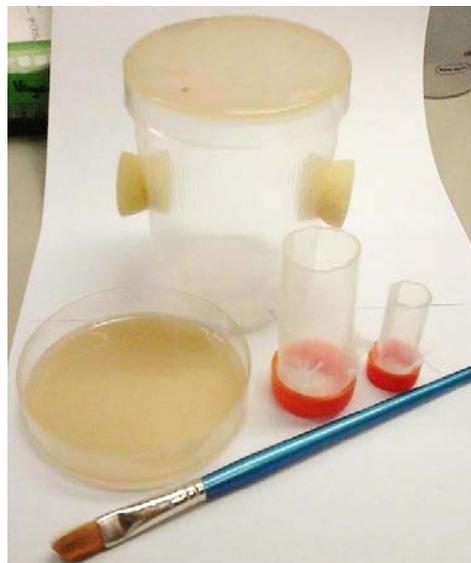


Figura 13. **"Cage"** utilizado para recolectar embriones. Los filtros con tela nytex se fabrican cortando tubos de centrifuga.

6.3.2 Adquisición de la dinámica de localización de los componentes de CAK con microscopía confocal

Las laminillas montadas como se describe en la sección 6.3.1 fueron llevadas al Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (LNMA) del Instituto de Biotecnología de la UNAM para ser observadas utilizando microscopía confocal con las condiciones descritas en la Tabla No. 7. Para el Microscopio Confocal de disco giratorio 3I Marianas el programa de adquisición de imágenes fue SlideBook 6 mientras que para el Microscopio confocal Olympus FV1000 Multi-fotónico fue FV10-ASW Viewer Software. El análisis de imágenes se realizó utilizando el programa Fiji. Como resultado se obtuvieron secuencias de imágenes a lo largo del tiempo (time lapse series) de embriones jóvenes (antes de la transición a blástula media) capturando un mismo plano del embrión completo cada 20-30 s durante 15-20 min (Ver Figuras 19 a 23), siguiendo la dinámica de los componentes de CAK durante dos a tres ciclos de división nuclear. En este trabajo se hace referencia como dinámica (o dinámica de localización) a esta serie de imágenes que describen la localización de las proteínas fluorescentes a lo largo del tiempo.

Microscopio confocal Olympus FV1000 Multi-fotónico		
Tipo de microscopio: IX81 Invertido		
Condición #	Fluoróforo(s)	Descripción
1	EGFP	<ul style="list-style-type: none"> • Objetivo UPLSAPO 20X NA: 0.75, aire • Excitación a una longitud de onda de 488 nm, con un láser Multi-line Ar • Espejos dicróicos DM405/488/543 y SDM560 • Filtro pasa bandas BA505-525 • Detector: PTM (Tubo Fotomultiplicador) • Tamaño del pixel: 0.397x0.397x1 μm • Tamaño de la imagen 800x800 pixeles • Usado para Figura 19
2	EGFP/GFP con RFP/mCherry	<ul style="list-style-type: none"> • Objetivo UPLSAPO 20X NA: 0.75, aire • Excitación a una longitud de onda de 488 nm con un láser Multi-line Ar para

		<p>EGFP y 543 nm con un láser HeNeG para RFP</p> <ul style="list-style-type: none"> • Espejos dicróicos DM405/488/543 y SDM560 • Filtro pasa bandas BA505-525 y BA560-660 • Detector: PTM (Tubo Fotomultiplicador) • Tamaño del pixel: 0.397x0.397x1 μm • Tamaño de la imagen 800x800 pixeles • Usado para Figuras 20 y 22
3	EGFP con RFP	<ul style="list-style-type: none"> • Objetivo UPLFL 40X NA: 0.75, aire • Excitación a una longitud de onda de 488 nm con un láser Multi-line Ar para EGFP y 543 nm con un láser HeNeG para RFP • Espejos dicróicos DM405/488/543 y SDM560 • Filtro pasa bandas BA505-525 y BA560-660 • Detector: PTM (Tubo Fotomultiplicador) • Tamaño del pixel: 0.397x0.397x1 μm • Tamaño de la imagen 800x800 pixeles • Usado para figura 23
Microscopio Confocal de disco giratorio 3I Marianas		
Tipo: Zeiss Observer Z.1 Invertido		
Condición #	Fluoróforo(s)	Descripción
4	EYFP con RFP	<ul style="list-style-type: none"> • Objetivo 20X NA: 0.8, aire • Excitación a una longitud de onda de 488 nm para EYFP y 543 nm para RFP • Detector: Cámara EMCCD Andor Ixon • Tamaño del pixel 0.8x0.8x3 μm • Tamaño de la imagen 512x512 pixeles • Usado para Figura 21

Tabla 7. Microscopios y condiciones de adquisición para visualizar la dinámica de los componentes de CAK. Las muestras se observaron a la temperatura de la habitación (18°C-22°C).

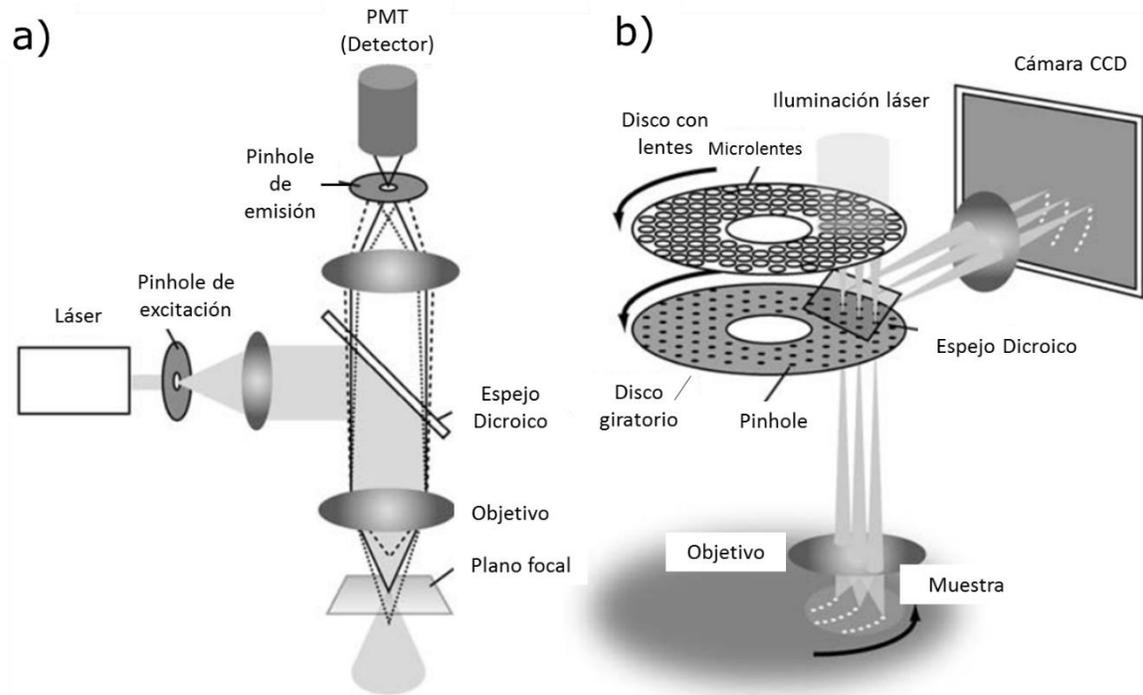


Figura 14. Esquema en el que se muestra el funcionamiento básico de dos tipos de microscopios confocales. El principio básico es el mismo en ambos microscopios; la luz del láser de la longitud de onda adecuada pasa primero por un filtro de excitación, después por un espejo dicroico y llega a la muestra, donde la luz emitida por el fluoróforo excitado pasa de nuevo por el espejo dicroico hacia un filtro de emisión y un pinhole para finalmente ser detectado.

Solo luz proveniente del plano focal puede pasar por el pinhole. En un a) Microscopio confocal de barrido láser (como el Olympus FV1000) la señal es detectada por un fotomultiplicador y la imagen se genera conforme el láser recorre la muestra una línea a la vez. En b) Microscopio confocal de disco giratorio (Como el 3I Marianas), existen múltiples pinholes así que varios puntos de la muestra son escaneados al mismo tiempo, y dicha señal es detectada por una cámara CCD (Charge Couple Device).

La microscopía confocal (Figura 14) permite eliminar la luz desenfocada proveniente de un determinado plano, ya que la luz fluorescente proveniente de la muestra debe pasar por un pinhole (en español, colimador de orificio delimitante), que discrimina la luz fuera de foco, y el tamaño ajustable de este permite determinar el grosor de la sección de la cual se está obteniendo una imagen [69]. Gracias a la eliminación de la luz fuera de foco, la resolución de las imágenes (es decir, la capacidad de discernir a dos objetos) es mejorada con

respecto a la obtenida con un microscopio de fluorescencia de campo amplio [80]. La resolución depende únicamente de la longitud de onda emitida por un objeto y la apertura numérica del objetivo (NA), y en el caso de las condiciones utilizadas (Tabla 7), podemos distinguir (idealmente) dos puntos que se encuentren a ~ 400 nm; esto resulta importante ya que el núcleo de un embrión temprano de *Drosophila melanogaster* mide más de $4 \mu\text{m}$ [81]. En microscopía, para que una imagen digital represente fielmente lo que se está observando en el microscopio el tamaño del pixel necesita ser al menos 2.3 veces más pequeño que el objeto que está siendo observado, a esto se le conoce como criterio de Nyquist [80], y ya que el tamaño de pixel de los microscopios utilizados es entre 0.4 a $1 \mu\text{m}$, podemos decir que se cumple esta condición.

Una gran limitante de esta técnica es que solo funciona bien para muestras delgadas y transparentes y aunque el límite de penetración en tejidos es normalmente de 100 a $150 \mu\text{m}$ esta cifra se reduce de manera importante con factores como el fluoróforo usado, el objetivo, la intensidad de láser, el grosor del cubreobjetos y el tipo de muestra, entre otros. Aunque un embrión de *D. melanogaster* mide poco más de $150 \mu\text{m}$, en la práctica no obtuvimos buenas imágenes de la región central de un embrión.

6.4 Ensayos de rescate

Para comprobar que las proteínas transgénicas cumplen con la función biológica de las proteínas endógenas realizamos ensayos de rescate de tres líneas con mutaciones letales.

6.4.1 Líneas mutantes

Las líneas mutantes utilizadas para los rescates (Tabla 8) fueron monitoreadas durante varias generaciones desde junio de 2015 a julio de 2016, en búsqueda de individuos homocigotos y nunca se encontraron. Las líneas fueron

balanceadas y tampoco se encontraron individuos homocigotos para la mutación después de cruzar con la línea doble balanceador.

Nombre	Bloomington Stock No.	Sitio de la mutación	Tipo de mutación	Fenotipo
Cdk7 ^A	57067	X: 5,308,622	Mutación puntual G5308622A	Cambio de un aminoácido E68K, letal
Cdk7 ^B	57068	X: 5,308,225	Mutación puntual G5308225A	Cambio de un aminoácido G200D, letal
MAT1 ^{EY16870}	22334	2R: 10,739,743 [-]	Inserción de 10.908Kb, MAT1 se encuentra en 2R: 10,738,617..10,739,829 [-]	Letalidad y esterilidad
MAT1 ^{MI03948}	36950	2R: 10,738,966 [+]	Inserción de 7.267Kb, MAT1 se encuentra en 2R: 10,738,617..10,739,829 [-]	Letalidad y esterilidad

Tabla 8. Líneas mutantes para Cdk7 y MAT1. Fuentes: Cdk7^A <http://flybase.org/reports/FBAl0298876.html>, Cdk7^B <http://flybase.org/reports/FBAl0298877.html>, MAT1^{EY16870} <http://flybase.org/reports/FBti0075831.html>, y MAT1^{MI03948} <http://flybase.org/reports/FBti0145306.html>.

6.4.2 Cruzas de rescate

a) Para rescates de las mutantes de *cdk7*.

Ambas líneas mutantes fueron cruzadas con dos líneas transgénicas diferentes, la línea 4, con *EGFP-cdk7* en el cromosoma 2, y la línea 8, con *EGFP-cdk7* en el cromosoma 3. En la Figura 15 se ejemplifica solo el caso de la línea 4.

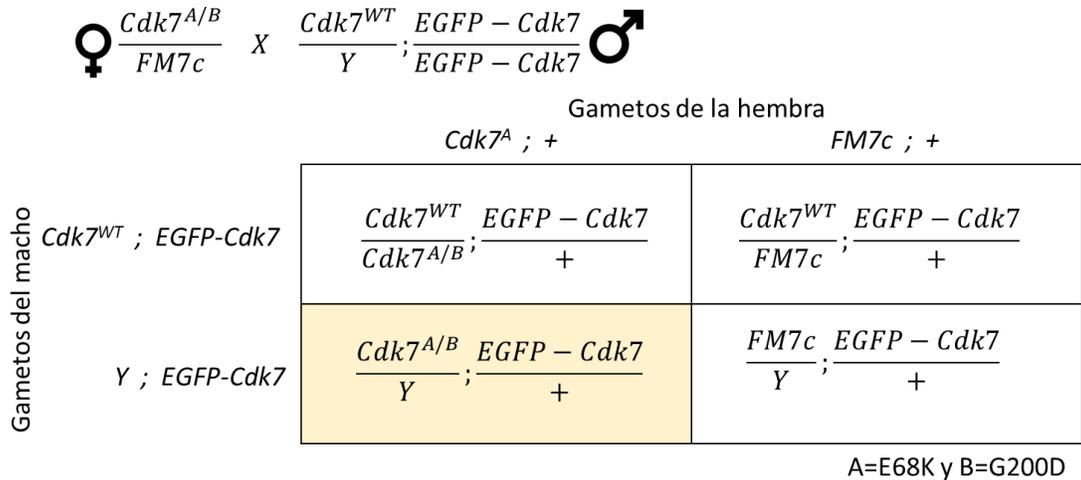


Figura 15. Fenotipos posibles para la cruce de rescate de mutantes de CDK7. Genotipo marcado en naranja indica un rescate por **EGFP-Cdk7**, ya que los machos con la mutación no son viables.

B) Para rescates con mutantes de **MAT1**.

Ambas líneas mutantes fueron cruzadas con dos líneas transgénicas diferentes, la línea 1 de EYFP-MAT1, y la línea 4 de MAT1-mCherry, ambas en el cromosoma 3. En la Figura 16 se ejemplifica solo el caso de la línea EYFP-MAT1 y el rescate de la mutante $MAT1^{EY16870}$, pero se siguió el mismo esquema para las otras cruces.

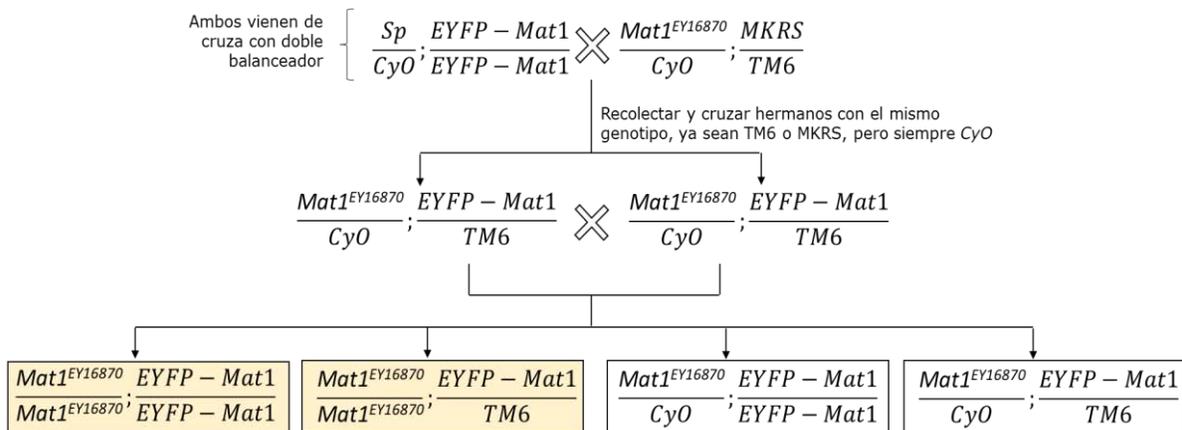


Figura 16. Rescate de mutante de **MAT1**. Genotipo marcado en naranja indica un rescate por **EYFP-MAT1**, ya que los homocigotos para la mutación no son viables.

c) Cálculo del porcentaje de supervivencia.

Para presentar este dato se definen todas las posibles combinaciones de genotipos de la progenie con un cuadro de Punnett y se anota cuántas veces es representada cada combinación (nX). El número de individuos que nacen de cada genotipo se divide entre nX correspondiente y el genotipo con mayor número de individuos se convierte en el 100% (Individuos esperados), a partir del cual se puede determinar el porcentaje de supervivencia (Individuos observados/Individuos esperados).

Cabe resaltar que no se utilizó exactamente el mismo número de hembras y machos en cada experimento, debido a que no todas las hembras de fenotipo deseado eclosionaron al mismo tiempo, aunque siempre se cruzaron entre 10 y 15 hembras con la mitad de machos y se mantuvieron constantes la temperatura y el medio de alimentación.

6.5 Ensayo de interferencia de la expresión de CDK7

Un método para silenciar genes es la interferencia por ARN, donde la expresión de ARN de doble cadena (shRNA, por short hairpin RNA) causa la degradación del ARN mensajero cuando es complementario a una secuencia blanco [65]. En moscas, la interferencia por ARN puede ser acoplada a un sistema GAL4: el gen de este factor de transcripción de levadura se inserta en el genoma de la mosca junto con una secuencia promotora endógena para tener una expresión específica de algún tipo celular o tejido, posteriormente, esta línea se cruza con otra que tiene al gen del shRNA regulado por una secuencia de activación de la transcripción río arriba (UAS, por Upstream Activating Sequence), la cual es reconocida por GAL4. Es así como la progenie de esta cruce transcribirá al shRNA únicamente en las células o tejidos donde se expresa a GAL4 [70].

6.5.1 Descripción de líneas de moscas transgénicas utilizadas, cruzas y condiciones

- Línea UAS-RNAi contra *Cdk7* (abreviado como UAS-*Cdk7i*). La línea v10442 tiene al elemento P{GD4167} en el cromosoma 3 con una construcción que expresa al shRNA dirigido a una región interna del transcrito de *Cdk7* (<http://flybase.org/reports/FBsf0000074319.html>) Este elemento está bajo el control de 10 copias de UAS y con el gen *mini-white* como reportero de expresión [71].
- Línea de expresión de GAL4 (o Driver GAL4). Esta línea contiene al elemento P{mata4-GAL-VP16} en el cromosoma 2, que expresa al activador transcripcional GAL4 bajo el promotor endógeno de α -Tubulina67c, el cual dirige la expresión de la proteína específicamente a los ovarios (incluyendo a las células nodriza, la cámara de huevos y ovocito) (<http://flybase.org/reports/FBtp0009293.html>).

Estas líneas se balancearon y cruzaron para obtener finalmente individuos homocigotos dobles para *Cdk7i* y *Gal4* (en adelante GAL4-UAS-*Cdk7i*), que expresan al RNA interferente en ovarios. Esta línea no es muy fértil y no pudo ser amplificada ni mantenida, por lo que los adultos utilizados en los siguientes experimentos correspondieron exclusivamente a la primera generación.

Como controles utilizamos a las líneas parentales UAS-*Cdk7i*, Driver GAL4 y también a *w¹¹¹⁸*. Las líneas utilizadas en este ensayo se mantuvieron a 25°C en medio de piloncillo, y fueron expuestas el menor tiempo posible a una diferente temperatura.

6.5.2 Western blot de embriones

Se obtuvieron embriones de colectas de 2 h y se decorionaron tal como se describe en la sección 6.3.1, y se siguió el protocolo de Tin Tin Su del 2000 [72]: la membrana vitelina fue removida transfiriendo los embriones a un volumen de heptano suficiente para cubrirlos (500uL en el caso de usar una jaula de reproducción pequeña "cage") y se agregó igual volumen de metanol, seguido de agitación por 5 min. Se dejó reposar y se descartaron los embriones que

permanecieron en la interfase, para después lavar tres veces con metanol frío (estos embriones se pueden mantener en metanol a -20°C por varias semanas). Los embriones se enjuagaron dos veces con Embryo Buffer (EB, Preparación en Anexo V) enfriado en hielo y fueron teñidos con bisbenzamida (Hoechst 33258) 4 ug/mL en EB, por 5min (usar rotador a 4°C), seguido de 2 enjuagues con EB frío. Los embriones se transfirieron a 50% EB/50% Glicerol. Para la selección se colocaron algunos embriones en un portaobjetos y se observaron a 10X y 20X utilizando el canal para DAPI (Excitación a 352nm y Emisión a 461nm), cuidadosamente recolectando aquellos en los ciclos deseados, en este caso, de 7 a 10 ciclos de división nuclear (pre-MBT), con una pipeta.

Después de transferir los embriones de interés a un tubo Eppendorf y adicionar un volumen igual de 2X SDS Sample Buffer (Preparación en Anexo V), fueron hervidos por 10min. Se prosigió con el SDS-PAGE según lo ya descrito en 6.2.2. c.

6.5.3 Inmunotinción de α -tubulina de embriones

Los embriones se recolectaron, decorionaron y devitelinizaron como se describió en la sección correspondiente a la preparación del Western Blot, posteriormente fueron hidratados con TBST (TBS + 0.1% de Tritón X-100, preparación de TBS en Anexo V) en un gradiente con metanol (75%, 50%, 25%) y finalmente se lavaron dos veces con TBST (Todos los lavados se realizaron con un volumen de 1-1.5 mL). Posteriormente, en caso de teñir los embriones con Sytox, estos fueron incubados con una concentración final de 10 ug/mL de RNAsa A en TBST durante 1h, a TA. En caso de teñir los embriones con DAPI se omitió este último paso. Después de la tinción, los embriones se enjuagaron 3 veces por 10min con TBST. El bloqueo se realizó con suero de cabra al 10% en TBST durante 6h a TA, seguido de un lavado de 1min con TBST. Después del bloqueo los embriones se incubaron con el anticuerpo primario AA4.3 de DSHB, dilución 1:600, en TBST con 5% suero de cabra (todos los anticuerpos se diluyeron en 400 μ L), durante toda la noche a 4°C. Al siguiente día se enjuagaron 6 veces por 10 min con TBST para incubar con anticuerpo secundario Alexa Fluor 568, de invitrogen, en una dilución 1:800, en TBST con 5% suero de cabra, durante 3 h a TA, protegidas

de la luz. Posteriormente se lavaron 6 veces por 10 min con TBST y se incubaron con una concentración final de 15nM de Sytox Green (o 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de DAPI) durante 20min a TA. El exceso de Sytox Green o DAPI se lavó 3 veces por 10min con TBST, para finalmente, montar los embriones en CitiFluor™ AF1 en una cámara hecha de cubreobjetos, la cual se cubrió con otro cubreobjetos y se selló con esmalte transparente para uñas.

Los embriones se observaron en un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiovert 200, invertido; se cuantificaron, se determinó el estadio en el que se encontraban y se identificaron los embriones con defectos en la mitosis. Posteriormente, se usó microscopía confocal para tomar imágenes de varios planos de estos embriones y así realizar una proyección en Z (o proyección vertical), con el objetivo de obtener una imagen reconstruida de cada embrión, con una resolución mucho mayor que la obtenida con el microscopio de fluorescencia. La mayor resolución permitió observar más detalladamente los diferentes defectos mitóticos de los embriones con CDK7 disminuida.

En el microscopio confocal de disco giratorio 3I Marianas se observaron embriones teñidos con DAPI (con el láser de excitación de 405 nm) y Alexa 568 (con el láser de excitación de 561 nm), se utilizó el objetivo 20X NA: 0.8 de airey y el detector fue Andor iXon SN: 5078 (tipo CCD). El tamaño del pixel fue de $0.8 \times 0.8 \times 0.63 \mu\text{m}$, y para el embrión mostrado en la Figura 27a, panel inferior, se tomaron 69 imágenes en el plano Z.

En el microscopio confocal Olympus FV1000 Multi-fotónico se observaron embriones teñidos con Sytox y Alexa 568 bajo las mismas condiciones que las descritas en la Tabla 7, condición #2, pero en lugar de captar un solo plano a través de tiempo, se tomaron de 14 a 17 imágenes en el plano Z (27a panel superior y medio, y 27c). El tamaño del pixel fue de $0.397 \times 0.397 \times 2.34 \mu\text{m}$.

6.5.4 Inmunotinción de la Serina 5 fosforilada de embriones

Los embriones de 2 h se recolectaron y se decorionaron, después se transfirieron a tubos de microcentrífuga de 1.5mL con 0.75mL de heptano, 0.2mL de Crosslinking Buffer (CB, preparación en Anexo V) y 2% de formaldehído (135 μ L al 16%) y se dejaron fijar por 15 min agitando en vórtex a velocidad baja. Se detuvo el fijado agregando 100ul de glicina 2.5 M y se centrifugaron a 1000xg por 1 min, a 4°C). Se descartó el sobrenadante y se agregaron 0.5mL de heptano, seguido de 0.5mL de metanol, agitando vigorosamente por 1 min para eliminar la membrana vitelina. Se descartó el sobrenadante junto con los embriones que permanecieron en la interfase, y los embriones que se precipitaron se lavaron dos veces con metanol frío (Se pueden mantener en metanol a -20°C por meses). Para rehidratar los embriones, se hicieron lavados consecutivos de 1 min con gradientes de metanol (90%, 75%, 50%, 25%) para finalmente, lavarlos 2 veces con PBT + 0.1% de Tritón X-100. Los embriones rehidratados se incubaron en una solución bloqueadora o Blocking Buffer (PBT+ 0.1% de Tritón X-100 + 0.1% BSA) por 1 hora a TA. Para la inmunodetección, lo embriones incubaron con el anticuerpo primario H14 de BioLegend, dilución 1: 1000, en Blocking Buffer durante toda la noche a 4°C, con agitación constante. Los embriones se enjuagaron 3 veces por 10 min con Blocking Buffer a TA para después incubar con el anticuerpo secundario Alexafluor 568, dilución 1:1600, por 2 h a TA. Por último, el exceso de anticuerpo se lavó 3 veces por 10 min con PBT, se incubaron con 1 μ g/mL de DAPI, por 20 min, seguido de 3 lavados de 10 min con PBT y finalmente se montaron con CitiFluor™ AF1 en cámaras de portaobjetos.

Los embriones teñidos se observaron en el microscopio confocal Olympus FV1000 Multi-fotónico. Se utilizó el láser de excitación de 405 nm para DAPI y el de 543 para Alexa 568. El objetivo fue UPLSAPO 20X NA 0.75, los filtros pasa bandas BA430-470 y BA560-660, el espejo dicroico DM405/488/543. El detector fue PTM (Tubo Fotomultiplicador). El tamaño del pixel fue de 0.53x0.53x2.34 μ m y se tomaron 14 imágenes en plano Z. El resultado puede observarse en la Figura 30.

6.5.5 Ensayos de oviposición y supervivencia

Estos ensayos se realizaron colectando 10 hembras vírgenes de cada una de las cuatro líneas de interés (UAS-*Cdk7i*, Driver GAL4, *w¹¹¹⁸* y GAL4-UAS-*Cdk7i*), todas menores de 24 h de edad. Posteriormente se agregaron 5 machos de cada genotipo y se cuantificó la cantidad de huevos ovipositados en viales de medio de piloncillo a lo largo de diferentes periodos de tiempo. Después de 48 horas se cuantificaron los embriones que eclosionaron y después de 12 días se cuantificó la cantidad de adultos. Este experimento se realizó tres veces, aunque su carácter fue exploratorio, ya que no se logró replicar las mismas condiciones de tiempo de oviposición y no siempre fue posible cuantificar los embriones que acababan de eclosionar.

7. RESULTADOS

7.1 Ensayo de Western Blot para comprobar la expresión de las proteínas recombinantes

Se realizaron ensayos western Blot de extractos de proteínas totales de moscas adultas que expresan a EGFP-CDK7, EYFP-MAT1 y MAT1-mCherry (fluorescencia observada por disección de ovarios y testículos, ver Figura 11, sección 6.2.1). Sin embargo el anticuerpo contra la Ciclina H disponible no logró identificar a la proteína en western Blot a pesar de realizar varios intentos.

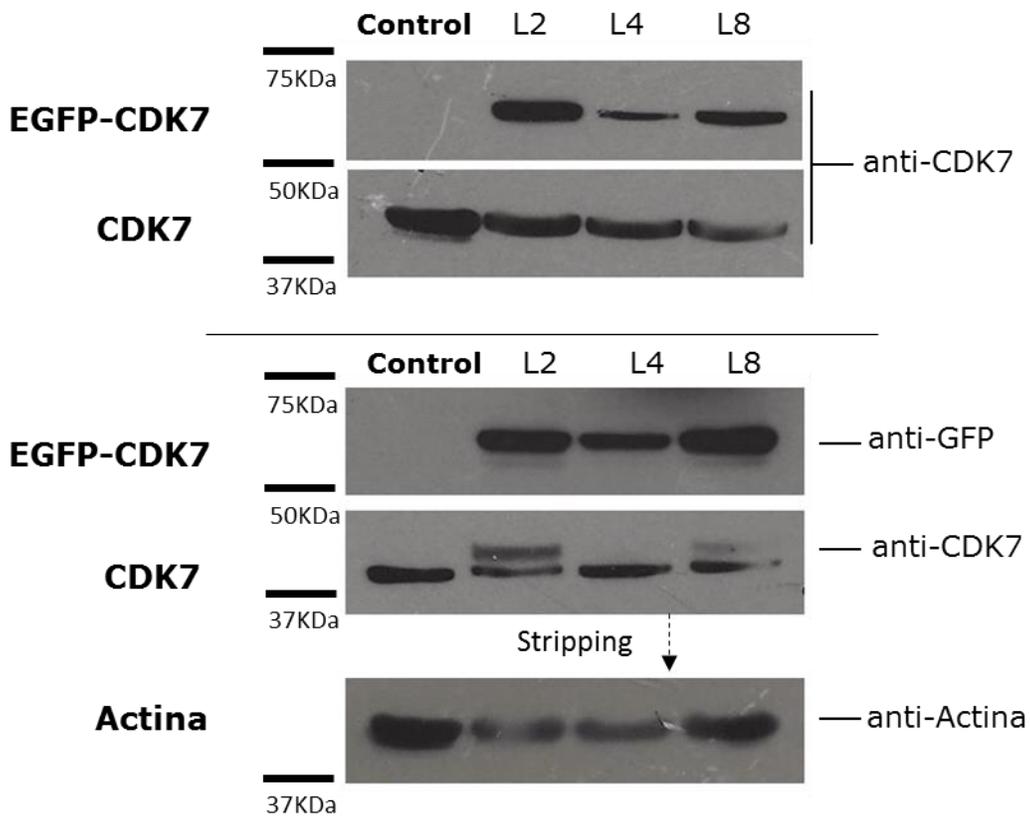


Figura 17. Western blot de extractos de proteínas totales de distintas líneas transgénicas EGFP-CDK7. El control es una línea W^{1118} y L2, 4 y 8 son tres líneas transgénicas de EGFP-CDK7. CDK7 tiene una masa de 39 KDa y actina de 42 KDa, por lo que después de revelar a CDK7, se realizó stripping suave de proteínas de la segunda membrana, para poder observar a actina sin la posible sobreposición de Cdk7. La proteína transgénica EGFP-CDK7 tiene una masa de 66 KDa y es observable con los anticuerpos contra CDK7 y GFP.

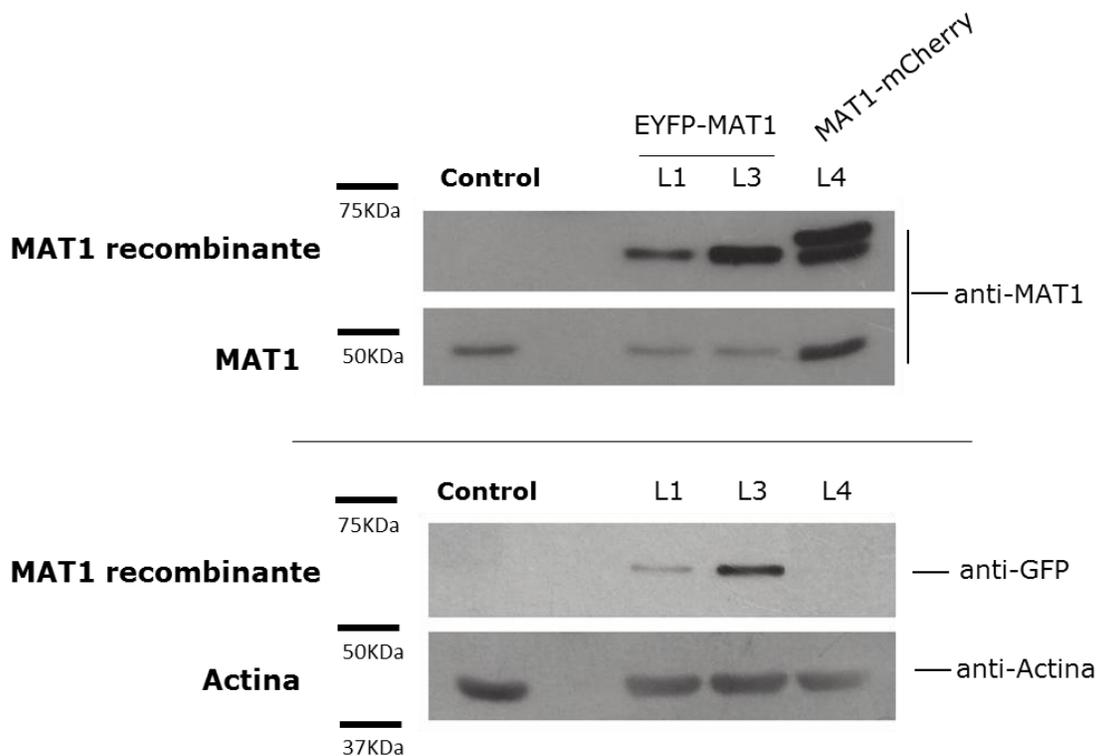


Figura 18. Western blot de extractos de proteínas totales de líneas transgénicas EYFP-MAT1 (L1 y 3) y MAT1-mCherry (L4). El control es una línea W^{1118} . El anticuerpo contra GFP puede identificar a EYFP pero no a mCherry. MAT1 tiene una masa de 36.5 KDa, sin embargo el anticuerpo la detecta cercana a 50 KDa, la proteínas transgénicas no presenta esta inconsistencia y corren según la masa esperada (63.5 KDa).

Los resultados confirman que la fluorescencia de estas líneas (observada al diseccionar ovarios y testículos, Figura 11) se debe a la presencia de proteínas recombinantes, claramente ausentes en el control (mosca w^{1118}). Las proteínas transgénicas también parecen expresarse en diferentes cantidades según la línea. De manera interesante, CDK7 endógeno a veces aparece como un doblete que en otros ensayos parece más un barrido (no se muestra). CDK7 solo puede tener un grupo fosforilo (de dos posibles sitios) [83], y ya que este solo añade

80 daltons podemos descartar su forma fosforilada como la responsable. Otros ensayos en el laboratorio (con extractos de células humanas) han identificado este mismo comportamiento cuando se carga una gran cantidad de proteína.

7.2 Dinámica de localización de los componentes de CAK en embriones tempranos.

Utilizando microscopía confocal se observó la dinámica de la localización de las proteínas recombinantes de CAK a lo largo de las rápidas divisiones nucleares de embriones jóvenes. Esta técnica nos ofreció una capacidad de resolución y una velocidad de adquisición de imágenes suficiente para observar lo que sucede con las proteínas fluorescentes dentro de los núcleos tempranos de un embrión vivo de *D. melanogaster*.

Para documentar la localización de los elementos de CAK, se tomaron secuencias de imágenes a lo largo del tiempo de embriones que expresaban a EGFP-CDK7, EYFP-MAT1, MAT1-mCherry, EGFP-Ciclina H y Ciclina H-mCherry en combinación con marcadores nucleares (H2Av-RFP y Jupiter-GFP). En la Figura 19 se muestran dos divisiones de un embrión joven completo, siguiendo la señal de fluorescencia de EGFP-Cdk7.

Como se puede apreciar en la Figura 19, la señal fluorescente de la proteína EGFP-CDK7 es visible durante todo el ciclo de división, variando su intensidad de forma gradual, pero sin perderse nunca por completo. Esta imagen no tiene un marcador nuclear por lo que no pueden identificarse aún etapas de la mitosis ni el estadio del embrión, pero queda claro que la localización de EGFP-CDK7 es específica y de comportamiento constante. Llama la atención que exista una importante disminución de la señal localizada sin el aparente incremento de la fluorescencia en el fondo. Podría ser que CDK7 esté siendo degradado, aunque probablemente el volumen citoplásmico con relación al nuclear sea suficiente para diluir este efecto, es importante hacer notar que se está tomando una delgada capa del embrión.

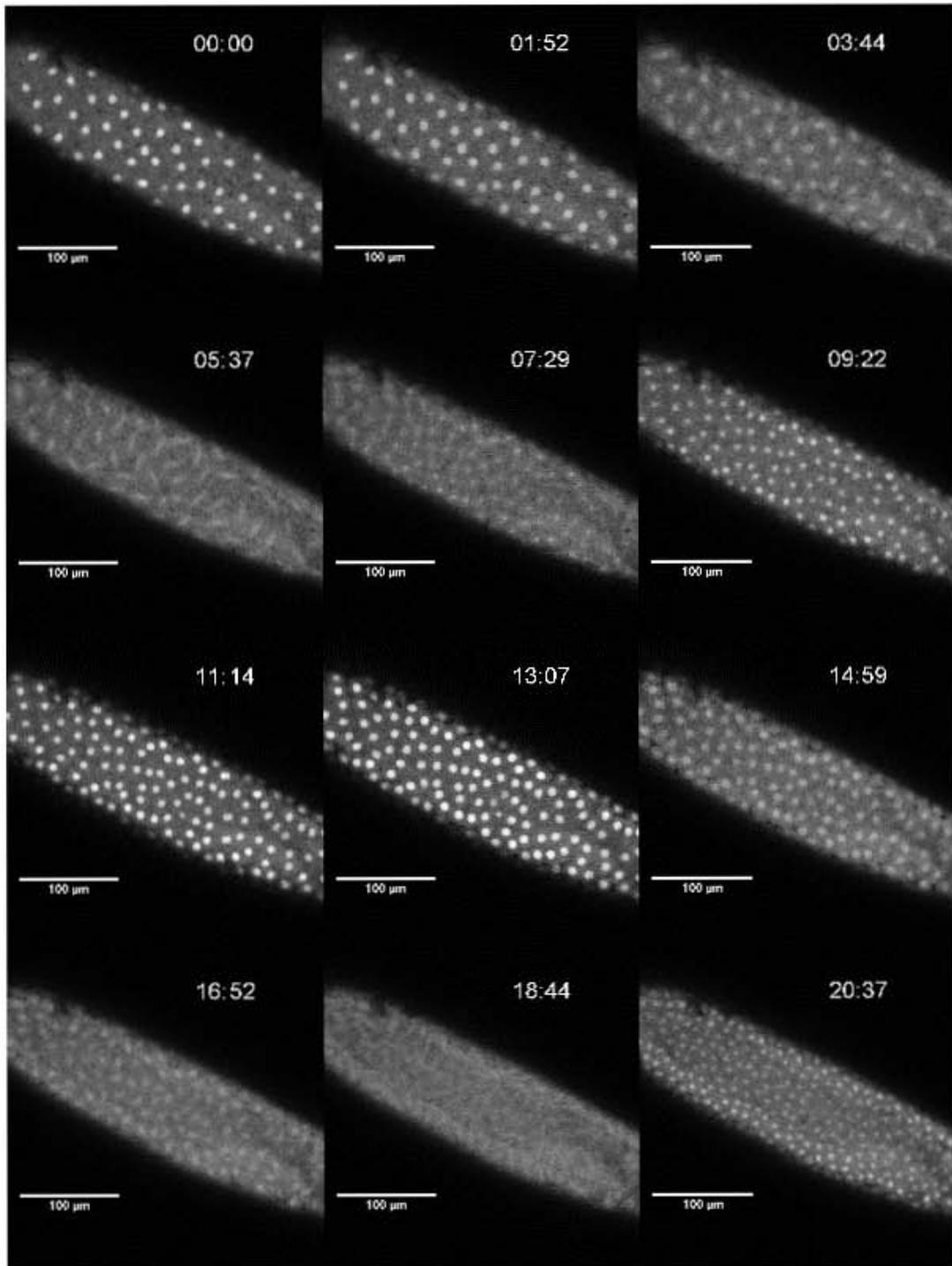


Figura 19. Dinámica de la localización de EGFP-CDK7 en un embrión completo. Se observa la señal fluorescente de la proteína y su localización a lo largo de dos ciclos de división nuclear, en un lapso de 20 minutos. Imágenes tomadas bajo la condición #1 de la Tabla 7, tomando una imagen cada 14.06 s.

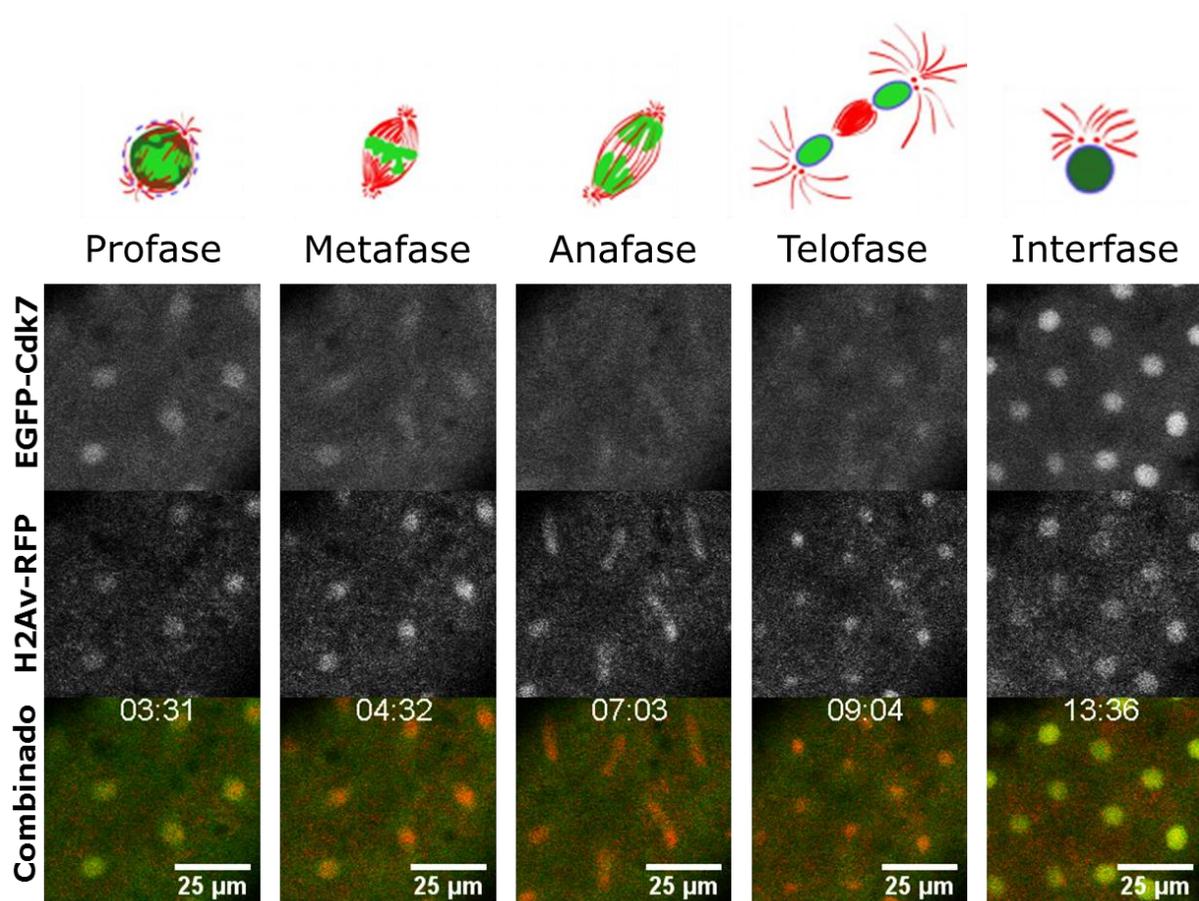


Figura 20. Dinámica de EGFP-Cdk7 (verde) con el marcador nuclear H2Av-RFP (rojo), este último permite observar la dinámica de la cromatina. Se observa una división nuclear de un embrión entre los ciclos 9 y 10. EGFP-Cdk7 sigue la dinámica de la cromatina durante la división nuclear y aunque la señal disminuye mucho, nunca se pierde completamente (Mínimo en anafase, a los 07:03 min). Imágenes tomadas bajo la condición #2, de la Tabla 7, tomando una imagen cada 30.22 s. Caricatura tomada de la figura 1 de [73]. En dicho artículo se muestra en rojo el comportamiento de la tubulina y en verde el de una histona marcada con GFP, para ver la figura completa, ir a Anexo III.

Cuando EGFP-CDK7 y H2Av-RFP (una variante de histona marcada con la proteína fluorescente roja) se expresan simultáneamente (Figura 20) no parece afectar la dinámica de la primera, según lo previamente observado en la Figura 19. Fue confirmado, gracias a la observación de la histona fluorescente, que EGFP-CDK7 sigue la dinámica de la cromatina. Es decir, durante la fase de síntesis, que representa una muy breve interfase (13:36 min, en Figura 20) el

núcleo y la señal de EGFP-CDK7 son intensas y se traslapan a la perfección (la cromatina está relaja); durante metafase (la cromatina se compacta), anafase (los cromosomas condensados se alinean y comienzan a separarse) y telofase (los cromosomas condensados se separan) observamos una disminución gradual de la señal de EGFP-CDK7 (no así para la histona) hasta casi desaparecer durante la telofase, para luego recuperarse durante la siguiente fase S (tal como se observa en la Figura 20 de 09:04 a 13.36 min), sin perder la misma localización que la cromatina. Ya que la histona no disminuye su señal y si EGFP-CDK7, asumimos que una parte del este componente de CAK está saliendo (o siendo degradado) pero esa fracción remanente que acompaña a la cromatina podría estar comportándose como un elemento de *bookmarking* para la transcripción durante la siguiente división nuclear.

MAT1, tanto unido a EYFP o mCherry, y Ciclina H (unida a EGFP) también siguen la dinámica de EGFP-Cdk7 (Figuras 21, 22 y 23). Adicionalmente se observaron las dinámicas de una segunda línea de EGFP-Cdk7 y de Ciclina H con mCherry (CycH-mCherry) (no se muestran resultados), confirmando una dinámica semejante para los tres componentes del CAK.

No es siempre posible presentar las fases de la mitosis en el orden esperado debido a que los embriones se comienzan a capturar a distintos momentos de la división nuclear. También es importante mencionar que los núcleos son altamente dinámicos y al adquirir imágenes de una solo capa del embrión, los núcleos contenidos en un plano inicial pueden quedar fuera de este en la siguiente ronda de división. Exceptuando a la Figura 21, las series temporales son de una sola sección del embrión y generalmente los núcleos salían de foco en la segunda división. Los microscopios de disco giratorio adquieren imágenes con una velocidad superior a un confocal convencional (Figura 14), esto fue lo que permitió tomar una proyección Z en la Figura 21. Las series tomadas en el microscopio Olympus Invertido fueron de un solo plano porque al tomar más de 20 segundos para ser adquiridas dejaban ver un ligero desfasamiento entre los ciclos de la primera a la última capa. No se muestran estos resultados.

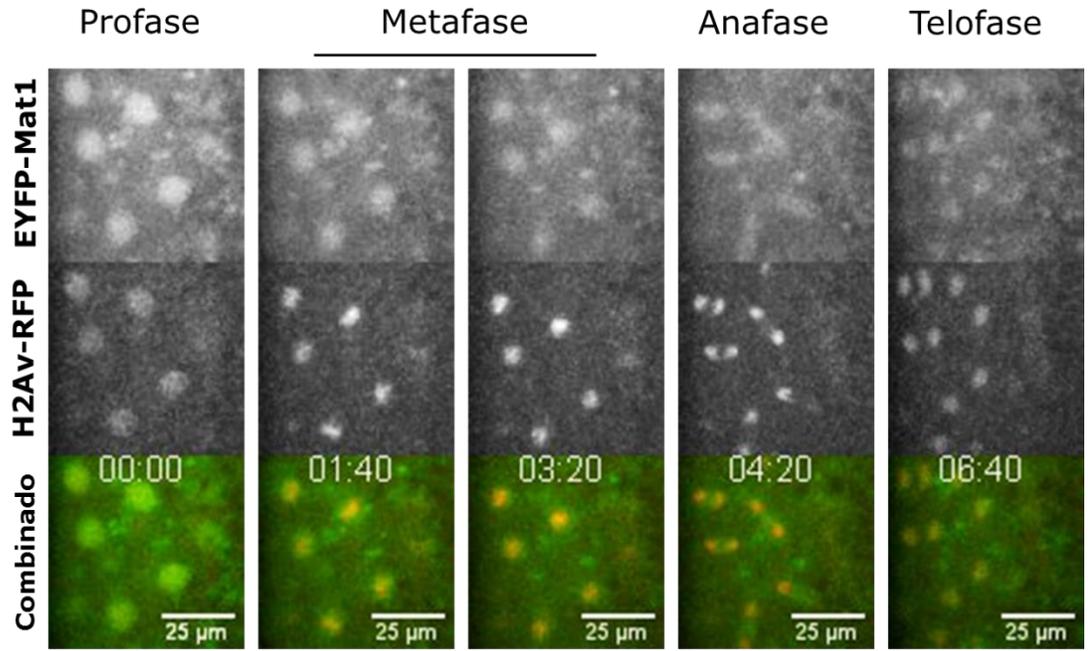


Figura 21. Dinámica de EYFP-MAT1 (falso color verde) con el marcador nuclear H2Av-RFP (rojo), que permite observar a la cromatina. Se observa una división nuclear de un embrión entre los ciclos 10 y 11. EYFP-MAT1 sigue la dinámica de la cromatina y aunque la señal disminuye mucho, nunca se pierde completamente. Imágenes tomadas con la la condición #3 de la Tabla 7, tomando una imagen cada 20.00 s.

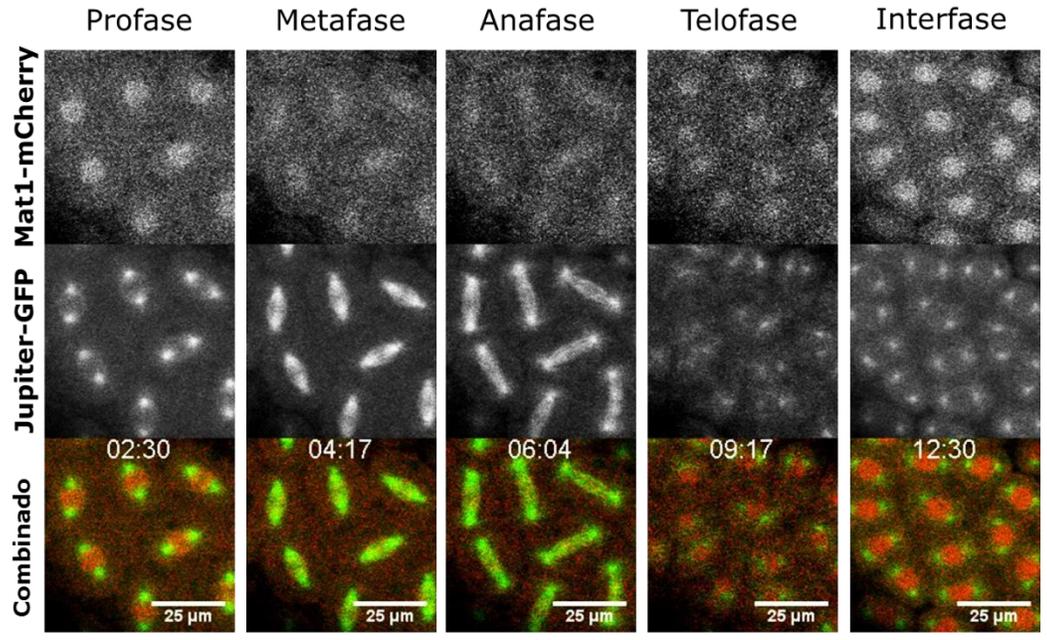


Figura 22. Dinámica de MAT1-mCherry (Rojo) con el marcador de microtúbulos Jupiter-GFP (verde). Condición #2 de la Tabla 7. Se tomó una imagen cada 21.45 s.

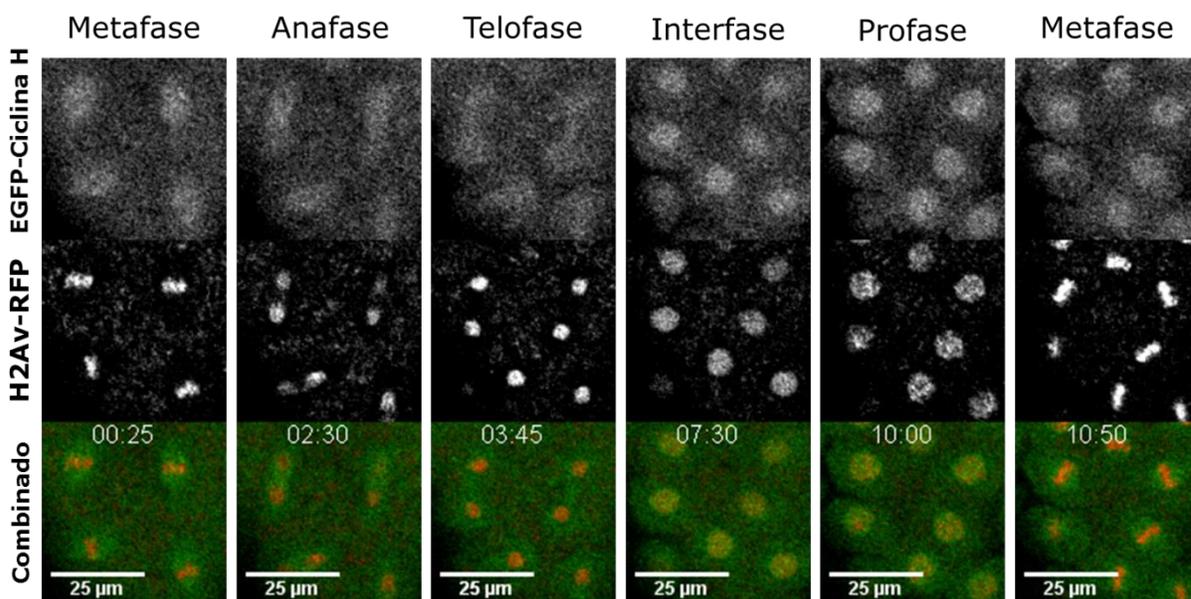


Figura 23. Dinámica de EGFP-Ciclina H (verde) con el marcador nuclear H2Av-RFP (rojo), que permite observar a la cromatina. Se observa una división nuclear de un embrión entre los ciclos 8 y 9. Condición #3 de la Tabla 7 y se tomó una imagen cada 25.00 s.

Concluimos que el comportamiento de CDK7, MAT1 y Ciclina H recombinantes son semejantes entre ellas y a otros componentes del Core [61] y por lo tanto, cualquiera de ellas representa la dinámica de localización de TFIIH durante las divisiones nucleares en el embrión temprano. Queda abierta la posibilidad de analizar la intensidad de la señal fluorescente a lo largo del tiempo con métodos cuantitativos, de reconstruir en 3D de la localización de estos componentes y de, eventualmente, determinar a qué sitios del ADN se mantiene unido TFIIH.

7.3 Ensayos de rescate de líneas mutantes de *Cdk7*

Las dos líneas mutantes de *Cdk7* (Tabla 8, materiales y métodos) poseen alelos letales para los machos, ya que *Cdk7* se encuentra en el cromosoma X. A continuación se presentan los resultados de las cruzas de rescate con 2 líneas de EGFP-*Cdk7*.

a) Mutantes de Cdk7 rescatadas con la línea 8 de EGFP-Cdk7

Genotipo	% Supervivencia (Individuos Observados/Individuos esperados)	Genotipo	% Supervivencia (Individuos Observados/Individuos esperados)
$\frac{Cdk7^{E68K}}{Y}; \frac{+}{+}$	0% (Alelo letal)	$\frac{Cdk7^{G200D}}{Y}; \frac{+}{+}$	0% (Alelo letal)
$\frac{Cdk7^{E68K}}{Y}; \frac{EGFP - Cdk7}{+}$	82.5±0.9%	$\frac{Cdk7^{G200D}}{Y}; \frac{EGFP - Cdk7}{+}$	84.7±15.4%

b) Mutantes de Cdk7 rescatadas con la línea 4 de EGFP-Cdk7

Genotipo	% Supervivencia (Individuos Observados/Individuos esperados)	Genotipo	% Supervivencia (Individuos Observados/Individuos esperados)
$\frac{Cdk7^{E68K}}{Y}; \frac{+}{+}$	0% (Alelo letal)	$\frac{Cdk7^{G200D}}{Y}; \frac{+}{+}$	0% (Alelo letal)
$\frac{Cdk7^{E68K}}{Y}; \frac{EGFP - Cdk7}{+}$	85.2±3.1%	$\frac{Cdk7^{G200D}}{Y}; \frac{EGFP - Cdk7}{+}$	82.8±8.5%

Tabla 9. EGFP-CDK7 rescata a dos líneas mutantes letales de *Cdk7*. Se muestran los porcentajes de supervivencia (Individuos observados/Individuos esperados) de la cruce de machos homocigotos para *EGFP-Cdk7* con hembras mutantes *Cdk7^{E68K}* y *Cdk7^{G200D}*. Se muestran los genotipos relevantes (machos), los cuales no sobreviven en la línea mutante sin rescatar. Cada cruce se realizó por duplicado, para ver el número de individuos contados por cruce y los resultados de todos los genotipos, ver Anexo IV.

Los porcentajes de supervivencia de machos con la mutación son bastante altos generalmente arriba del 80%, representando en una de las réplicas a la clase más saludable. Aunque no se muestran en este trabajo, se realizaron cruces de hembras mutantes con machos de fondo *w¹¹¹⁸* con y sin cromosomas balanceadores, donde tampoco se observaron machos con la mutación. El resultado de este experimento de rescate indica que la función biológica de EGFP-Cdk7 es la misma que la de Cdk7. Debido a que las proteínas mutantes *Cdk7^{E68K}* y *Cdk7^{G200D}* difieren en un aminoácido respecto a Cdk7 endógeno no es posible diferenciarlas con los anticuerpos disponibles en el laboratorio, por lo que no se muestra una comprobación del rescate por western blot.

7.4 Ensayos de rescate de líneas mutantes de *MAT1*

La línea mutante *MAT1^{EY16870}* (BL22334) no pudo ser rescatada con ninguna de las dos líneas transgénicas (*EYFP-MAT1* y *MAT1-mCherry*). A continuación se muestran las tablas con los rescates de la mutante *MAT1^{MI03948}* (BL36950) con ambas líneas. Las moscas mutantes son heterocigotas y poseen alas curvadas debido a que están balanceadas con el cromosoma *CyO*, mientras que las moscas rescatas son homocigotas para la mutación y por lo tanto presentan alas planas (fenotipo silvestre), en la Tabla 10 se muestran los resultados de este ensayo de rescate.

Rescatadas con la línea de EYFP-Mat1		Rescatadas con la línea de Mat1-mCherry	
Genotipo	% Supervivencia (Individuos Observados/Individuos esperados)	Genotipo	% Supervivencia (Individuos Observados/Individuos esperados)
$\frac{Mat1^{MI03948}}{Mat1^{MI03948}}; \frac{+}{+}$	0% (Alelo letal)	$\frac{Mat1^{MI03948}}{Mat1^{MI03948}}; \frac{+}{+}$	0% (Alelo letal)
$\frac{Mat1^{MI03948}}{Mat1^{MI03948}}; \frac{EYFP - Mat1}{TM6}$	72.5±2.5%	$\frac{Mat1^{MI03948}}{Mat1^{MI03948}}; \frac{Mat1 - mCherry}{TM6}$	86.6±1.3%
$\frac{Mat1^{MI03948}}{Mat1^{MI03948}}; \frac{EYFP - Mat1}{EYFP - Mat1}$	85.2±15%	$\frac{Mat1^{MI03948}}{Mat1^{MI03948}}; \frac{Mat1 - mcherry}{Mat1 - mCherry}$	70.6±29.4%

Tabla 10. Las proteínas recombinantes EYFP-MAT1 y MAT1-mcherry rescatan el fenotipo del alelo letal *MAT1^{MI03948}*. Porcentajes de supervivencia (Individuos observados/Individuos esperados) de la cruce de machos y hembras con el mismo genotipo (*MAT1^{MI03948}/CyO;EYFP-MAT1/TM6* y *MAT1^{MI03948}/CyO;MAT1-mCherry/TM6*). Se muestran los genotipos relevantes. Cada cruce se realizó por triplicado para *EYFP-MAT1* y por duplicado para *MAT1-mCherry*, genotipos totales y conteos totales en Anexo IV.

El porcentaje de individuos rescatados fue del 70% como mínimo, y llegó incluso a representar la clase más saludable. Como una prueba adicional se diseccionaron testículos para observar su fluorescencia. Se comprobó que machos y hembras rescatados fueran fértiles pero su progenie no fue cuantificada (cruzando con moscas del genotipo *w¹¹¹⁸*). Como se puede notar por la desviación estándar, estas cruces presentaron una gran variabilidad en su supervivencia sin importar si eran moscas con el balanceador *TM6* o *MKRS* (Ver anexo V), aunque la gran variabilidad en los resultados puede deberse a que se obtuvieron poblaciones pequeñas (entre 250 y 550 individuos totales

rescatados). La mutante *MAT1^{MI03948}* resulta de una inserción de 7.267Kb en contrasentido de la transcripción de *MAT1*, y debido a que no ha sido reportada en otro trabajo, se desconoce cómo afecta a la transcripción del gen, aunque asumimos que interrumpe la transcripción de *MAT1* ya que no se observan homocigotas del gen mutante a menos que tengan una copia de alguna proteína *MAT1* recombinante.

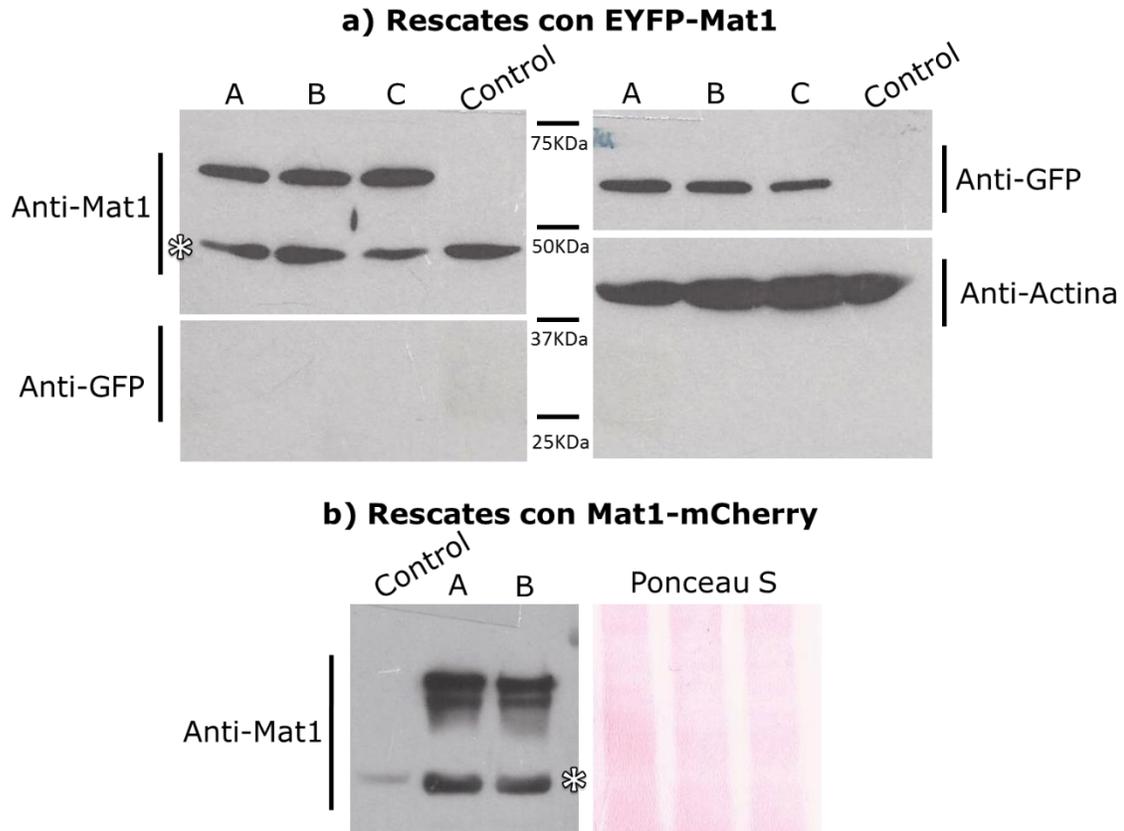


Figura 24. Western blot de extractos de proteínas totales de machos rescatados con las líneas transgénicas de *MAT1*. En **a)** Rescates con EYFP-*MAT1*, donde **A**, **B** y **C** indican los tres repetidos de la cruce de rescate, el control es la mutante balanceada *MAT1^{MI03948}/CyO;MKRS/TM6* y todas las muestras se corrieron en el mismo gel. En **b)** Rescates con *MAT1*-mCherry, donde **A** y **B** indican los duplicados de la cruce de rescate, el control es el mismo que para a). Con un asterisco se indican las bandas que no se esperaba observar para A y B, que corresponden a la masa de *MAT1* endógeno (control).

Se realizaron ensayos de western blot para comprobar la ausencia de MAT1 endógeno y la presencia de la proteína recombinante en las líneas rescatadas. Sorprendentemente, el ensayo de western blot reveló una banda que corresponde al mismo tamaño de MAT1 endógeno (Figura 24, marcado con un asterisco), algo esperado para el control mas no para las líneas A, B y C. observamos que efectivamente las líneas rescatada expresan a EYFP-MAT1 (Figura 24a) o MAT1-mcherry (Figura 24b). Una posible explicación para la banda del mismo tamaño de MAT1 endógeno fue que la proteína recombinante estaba siendo cortada o degradada de modo que EYFP o mCherry quedarían separadas de MAT1. Utilizando las herramientas PeptideCutter de EXPASy y MAPPP se encontraron cientos de sitios de corte para EYFP-MAT1 y MAT1-mCherry, pero no hay referencias sobre en qué momento del desarrollo o tejido podría darse cada tipo de corte, además, como se observa en la Figura 24a, no se encontró a EYFP libre, por lo que un corte preciso entre MAT1 y EYFP no parece la respuesta. Queda abierta la búsqueda de otras mutantes de MAT1 o la generación de las propias con herramientas de edición de genomas.

7.5 Ensayo de Western Blot para evaluar la disminución de CDK7 por interferencia de ARN en embriones tempranos

Para comprobar que el sistema UAS-GAL4 para la expresión de shRNA contra Cdk7 (*Cdk7i*) funciona y es capaz de disminuir los niveles de Cdk7 en embriones, se realizaron ensayos de western blot de embriones provenientes de hembras tanto heterocigotas como homocigotas para ambos componentes del sistema UAS-GAL4; *Gal4* y *Cdk7i*, utilizando como controles a embriones de líneas parentales (que tienen uno solo de los componentes del sistema) y a *w¹¹¹⁸* como línea silvestre. Las cruas se realizaron por triplicado. En la Figura 25 se observa una importante disminución en la cantidad de CDK7 en embriones provenientes de madres que expresan a *Cdk7i*.

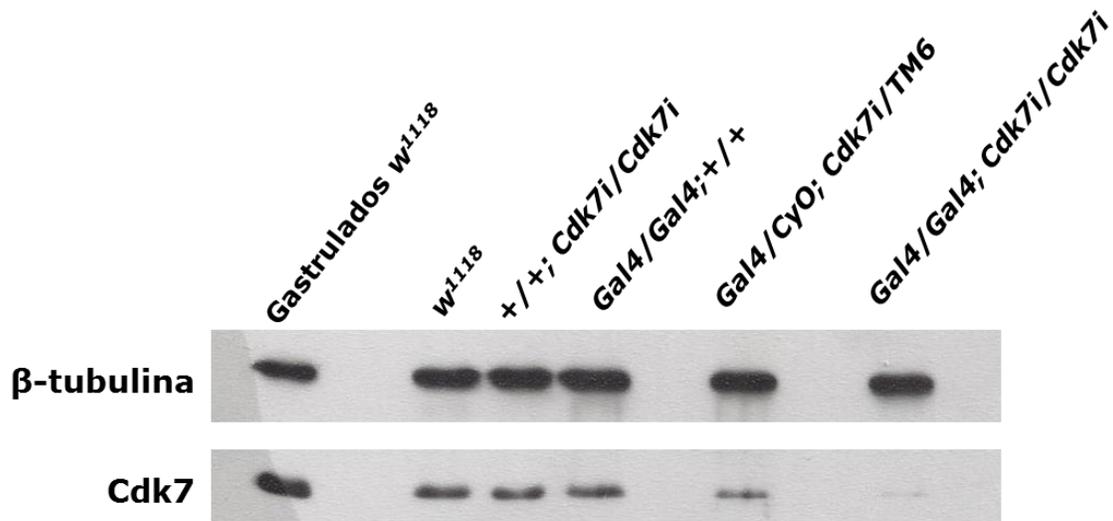


Figura 25. La expresión del shRNA contra *Cdk7*, regulada por GAL4 logra disminuir la cantidad de CDK7 en embriones tempranos. Western Blot de embriones tempranos con ARN interferente contra *Cdk7*. Embriones gastrulados *W¹¹¹⁸*, embriones tempranos (entre ciclos 5 y 6) de los genotipos: *W¹¹¹⁸* (como control silvestre), *+/+; Cdk7i/Cdk7i* (*UAS-Cdk7i*), *Gal4/Gal4; +/+* (Driver GAL4), 5) *Gal4/CyO; Cdk7i/TM6* (GAL4-*UAS-Cdk7i* heterocigoto), 6) *Gal4/Gal4; Cdk7i/Cdk7i* (GAL4-*UAS-Cdk7i*). Para cada carril se utilizaron 10 embriones. Se observa que los controles muestran niveles similares de *Cdk7*, mientras que en las línea hetero y homocigota la cantidad de *Cdk7* se encuentra disminuida, ambas líneas expresan a *Cdk7i* pero solo en el genotipo *Gal4/Gal4; Cdk7i/Cdk7i* dicha disminución es más evidente.

Como se observa en la Figura 25, la disminución en la cantidad de la proteína CDK7 demuestra que el sistema UAS-GAL4 funciona y que además es dependiente de dosis, es decir, la disminución de la proteína es observable en embriones provenientes de hembras heterocigotas (*Gal4/CyO; Cdk7i/TM6*) pero es más dramática en embriones provenientes de hembras homocigotas (*Gal4/Gal4; Cdk7i/Cdk7i*). El siguiente paso fue observar el efecto de esta disminución mediante la inmunotinción de ADN y tubulina. Es importante resaltar que la línea *Gal4/Gal4; Cdk7i/Cdk7i* no se pudo mantener estable, ya que aun cuando la oviposición fuera abundante pocos eclosionaban, no siendo suficiente para mantener una población constante.

7.6 Efectos en la mitosis de embriones con CDK7 disminuido

La expresión del ARN interferente contra Cdk7 generó una mayor proporción de embriones con mitosis defectuosas, un aumento del triple con respecto a tres controles (Figura 28). En general, los embriones defectuosos producto de la disminución de CDK7 presentaron secciones sin núcleos o con muy pocos, y dichos núcleos tienen defectos en los centrosomas, cromosomas libres, husos multipolares o fusionados o bien se encuentran desfasados con respecto al ciclo de división nuclear correspondiente (Figura 27b, núcleos en azul, tubulina en rojo). Aunque se muestran algunos defectos severos estos fueron la minoría, los más habituales fueron como el mostrado en la Figura 26, Algunos embriones con mitosis catastróficas presentan una forma ligeramente redondeada, pero esto último no se identificó como un defecto por sí mismo.

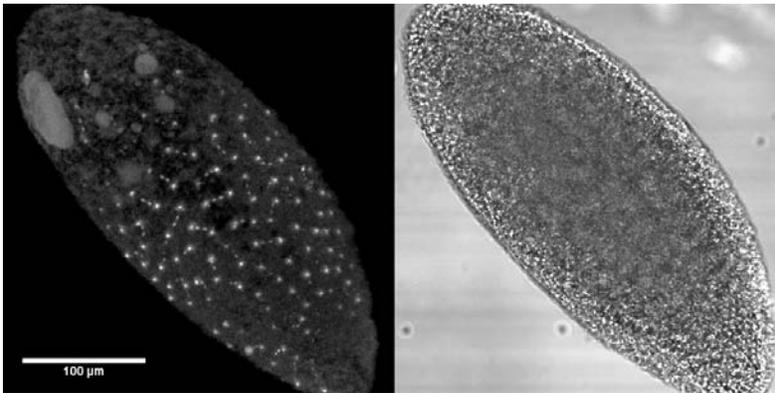


Figura 26. Tipo de defecto mitótico más habitual en embriones de madres que expresan el RNA interferente de Cdk7. Se observa una sección sin núcleos, cuando en un embrión normal los núcleos deberían recubrir toda su

superficie. A la izquierda observamos la tubulina y a la derecha el embrión en campo claro.

Adicionalmente a estos resultados, se realizaron pruebas de tinción de ovarios (datos no mostrados) en los cuales no se notaron diferencias entre la morfología y tamaño de los ovarios de las líneas estudiadas. Esto puede considerarse como un buen pronóstico si suponemos que el efecto materno será mínimo y que los defectos se deben a la falta de CDK7 en el embrión, no en el ovario

a) Fenotipos en embriones GAL4-UAS-Cdk7i

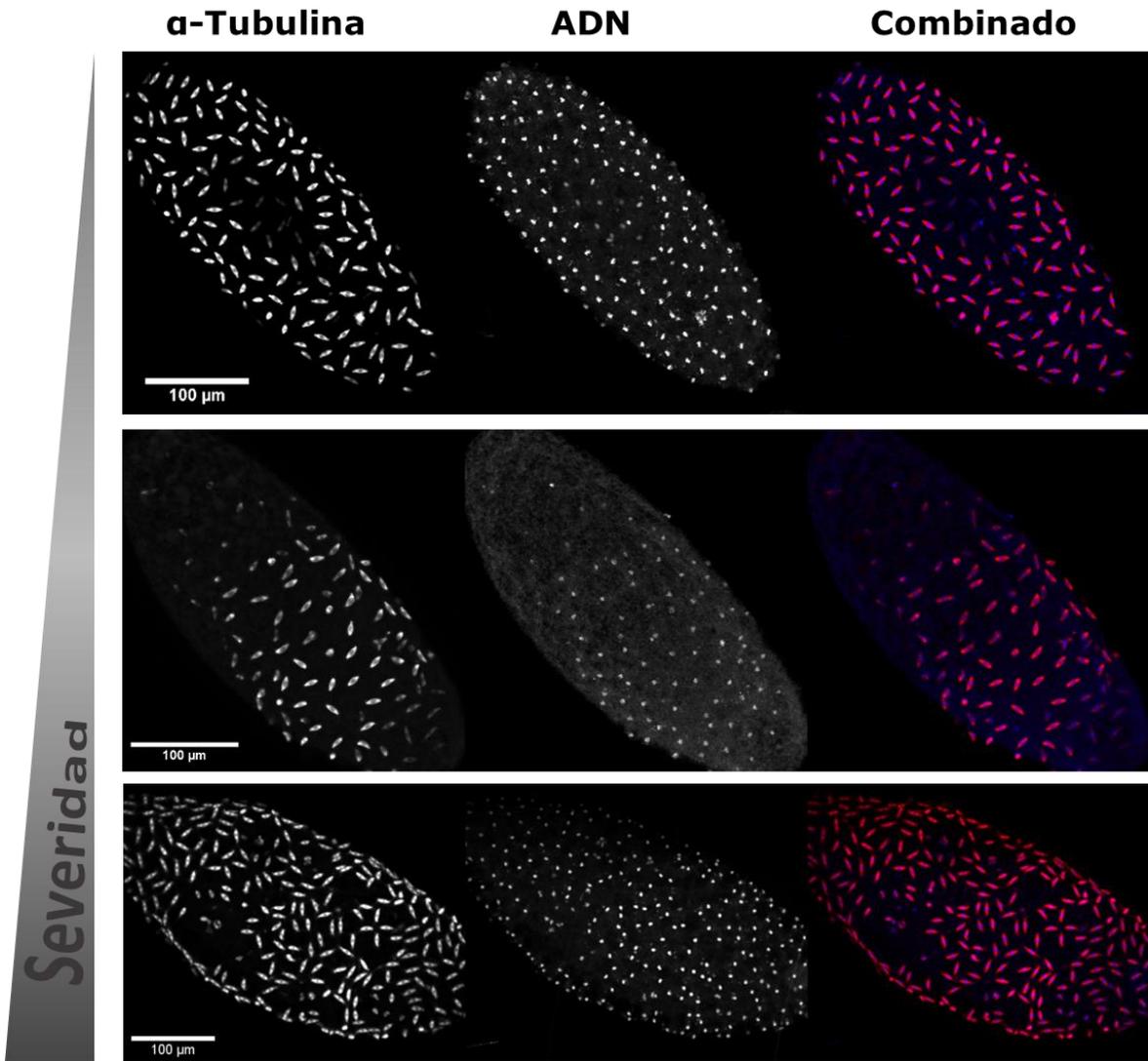
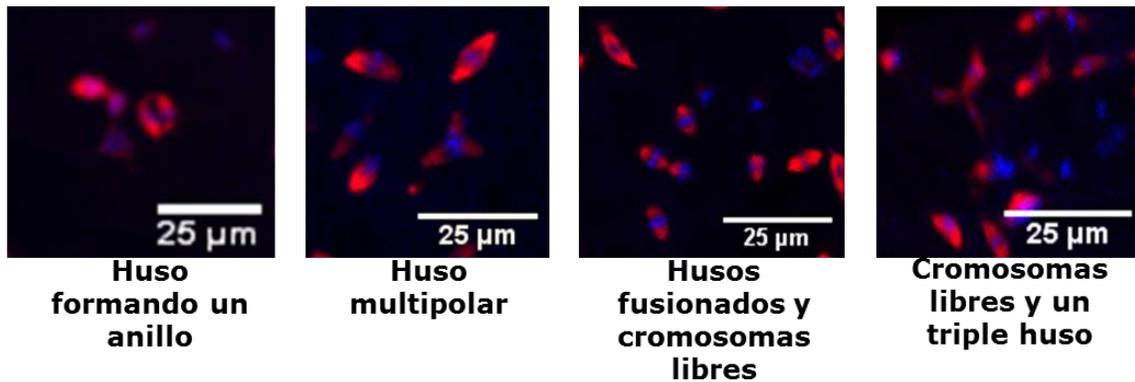


Figura 7 continúa en la siguiente página

b) Acercamiento a mitosis catastróficas



c) Embrión silvestre sin defectos

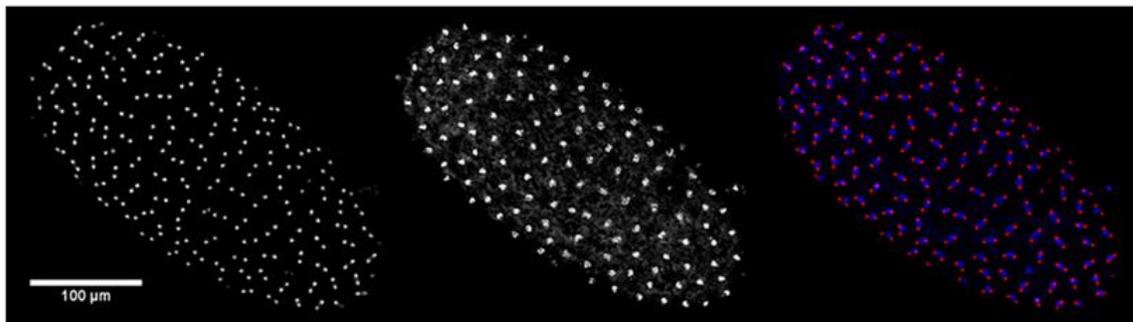


Figura 27. Mitosis catastróficas producto de la disminución de CDK7 en los embriones tempranos. ADN en azul, tubulina en rojo. **a)** Ejemplos de embriones del genotipo *Gal4/Gal4; Cdk7i/Cdk7i* (y una disminución en la cantidad de CDK7) entre los ciclos 9 y 10 que presentan defectos mitóticos con distintos grados de severidad, en el panel superior, un embrión de fenotipo silvestre, los dos inferiores son embriones con mitosis catastróficas. **b)** Amplificación de núcleos con mitosis catastróficas de embriones de severidad media (no mostrados). Se observa desde anillos formados por los husos mitóticos hasta cromosomas libres y diversos tipos de fusiones. **c)** Embrión silvestre sin defectos. Embrión silvestre *w¹¹¹⁸*, se encuentra unos minutos adelantado en el ciclo celular con respecto a los embriones mostrados en **a** pero se observa claramente lo ordenado de los núcleos y su distribución a lo largo de todo el embrión. Condiciones de adquisición de imágenes en la sección 6.5.3.

Estas pruebas no nos permiten saber si un embrión con algún tipo de defecto mitótico podría recuperarse al avanzar en el desarrollo (cuando comenzara a expresar su propio CDK7 durante la ATC), ni tampoco la diferencia en la cantidad de CDK7 disponible entre embriones GAL4-UAS-*Cdk7i* con fenotipo

silvestre y aquellos con fenotipo severo. Sería interesante realizar western blot de un solo embrión de ambos fenotipos para comprobar esto último. En la tesis de doctorado de Grisel Cruz, 2017 [61] se realizó RNA-seq de embriones con defectos y se determinó que los transcritos afectados son tanto de herencia materna como cigóticos, por lo que no se realizó este tipo de análisis para estos embriones. Resulta interesante que este fenotipo sea compartido con las mutantes de las sub-unidades del Core analizadas en su trabajo.

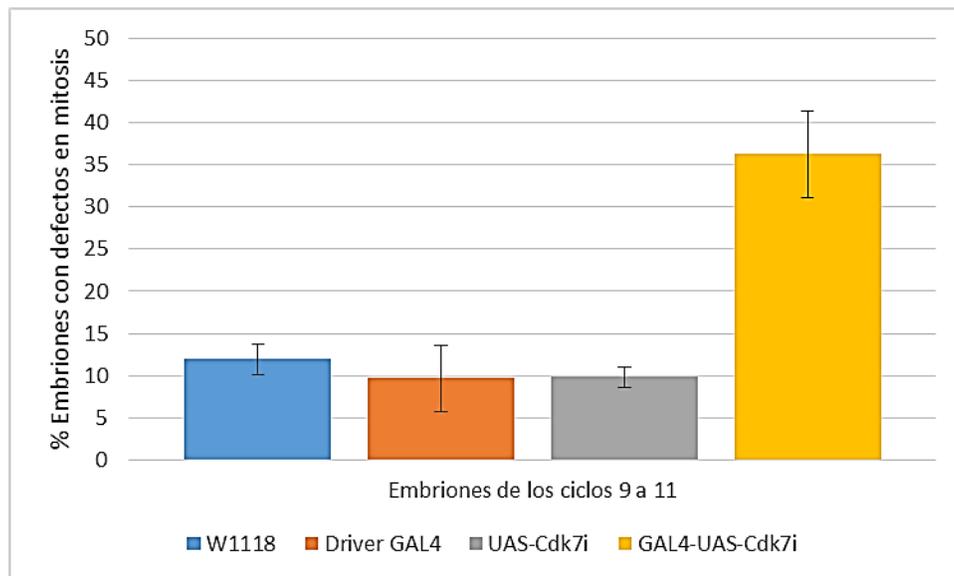


Figura 28. El porcentaje de embriones con defectos en mitosis se triplica para la línea GAL4-UAS-*Cdk7i* (*Gal4/Gal4; Cdk7i/Cdk7i*). Esto comparado con la líneas control donde W1118=*W¹¹¹⁸*(como control silvestre), UAS-*Cdk7i* = *+/+; Cdk7i/Cdk7i*, Driver GAL4=*Gal4/Gal4; +/+*. Se cuantificaron por triplicado embriones entre los ciclos 9 y 11 debido a que es la etapa en la que los núcleos se encuentran en la periferia del embrión y pueden observarse con un microscopio de fluorescencia convencional, previo a esta etapa, los núcleos se encuentran hacia el centro del embrión y es difícil observar si ya presentan defectos.

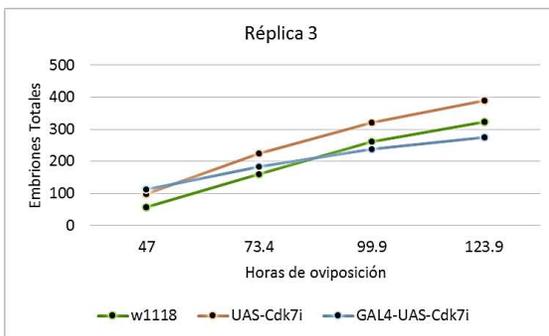
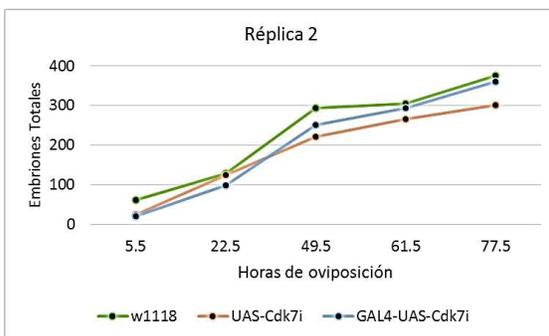
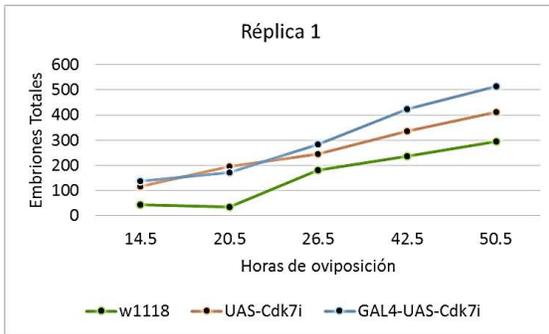
El porcentaje de embriones que se encuentran entre los ciclos 9 y 11 está entre el 13.8 y 16.7% del total de embriones cuantificados, para las 4 líneas (los tres controles y la línea que expresa a *Cdk7i*), por lo que no hay un evidente retraso en los ciclos de división nuclear aun cuando existen defectos en la mitosis, esto resulta importante ya que apunta a que la función de CAK

como regulador del ciclo celular no parece estar afectada aun con la gran disminución de CDK7, pero una afirmación de este tipo requeriría pruebas sobre el estado de la maquinaria de división celular. Los porcentajes de embriones entre los ciclos 9 y 11 resultan consistentes pese a las diferencias en cuanto al número total de embriones contados (Ver Anexo VI). Se tomaron en cuenta los embriones defectuosos totales, sin tomar en cuenta la gravedad de sus defectos (Figura 28).

7.7 Efecto en la oviposición de moscas que expresan ARN interferente contra CDK7

Las moscas que expresan el interferente contra Cdk7 no siempre depositan menos huevos que los controles (Figura 29a). Sin embargo el porcentaje de los embriones ovipositados que sobrevive hasta alcanzar la etapa adulta siempre es mucho menor (Figura 29b). La disminución en la cantidad de embriones que eclosionan no es tan obvia debido a la gran variación entre los tres experimentos, pero no logra superar al promedio de eclosión en los controles. El hecho de que estos embriones si estén eclosionando pero no alcancen la etapa adulta podría indicar que la disminución en la viabilidad de esta línea no es exclusivamente debida al incremento en defectos en la mitosis. Existe la posibilidad de que el driver GAL4 no se exprese únicamente en los ovarios y afecta a algún otro tejido tanto en hembras como en machos, aunque su secuencia promotora, de la tubulina 67c, si es específica de oogénesis y desarrollo embrionario.

a) Oviposición



b) Eclosión y etapa adulta

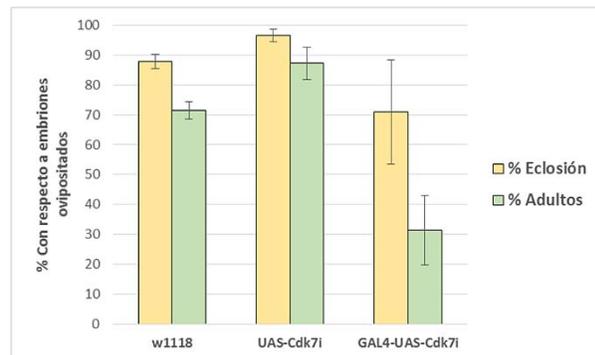


Figura 29. La disminución de CDK7 incrementa la mortalidad de los embriones pero en las madres no parece afectar la oviposición. **a)** Tres experimentos a diferentes tiempos de oviposición donde la cantidad de embriones ovipositados por la línea GAL4-UAS-*Cdk7i* (*Gal4/Gal4; Cdk7i/Cdk7i*) es similar a las líneas control donde $w1118 = W^{1118}$ y $UAS-Cdk7i = +/+; Cdk7i/Cdk7i$. No parece haber un efecto negativo en la oviposición. **b)** La supervivencia de las larvas de la línea GAL4-UAS-*Cdk7i* es menor. Se compara el porcentaje de eclosión y llegada de los embriones a la etapa adulta de las tres líneas ya

mencionadas, con respecto a los huevos ovipositados.

Estos resultados nos permiten comprobar que la disminución de CDK7 en embriones genera defectos mitóticos y problemas de viabilidad. No llega como una sorpresa ya que antes se había mencionado la gran relevancia de CAK tanto en transcripción como en el ciclo celular, pero el modelo de disminución de CDK7 por interferencia con ARN abre las puertas a estudios de los mecanismos que regulan la correcta segregación de los cromosomas, así como la posibilidad de examinar más adelante cambios en la expresión y el control del ciclo celular.

7.8 Fosforilación de la Serina 5 del CTD de la ARN polimerasa II en embriones con CDK7 disminuido

Aunque se tomaron embriones con CDK7 disminuido por el ARN interferente de las mismas muestras teñidas con DAPI y anticuerpo anti-tubulina para cuantificar defectos mitóticos, no se encontraron embriones con defectos mitóticos en las muestras teñidas con el anticuerpo anti-serina 5 fosforilada. Resultaba interesante conocer si esta marca se encontraba considerablemente reducida en embriones con defectos mitóticos, ya que es un indicador de que la transcripción se encuentra activa, pero el haber tomado muestras mucho más pequeñas para esta tinción y debido al diferente tratamiento recibido para fijar estos embriones, no fue posible observar ningún embrión con defectos en la mitosis. En los núcleos mostrados en la Figura 30 se observa la distribución de la marca de serina 5 fosforilada, que en los embriones que expresan *Cdk7i* no presenta anomalías.

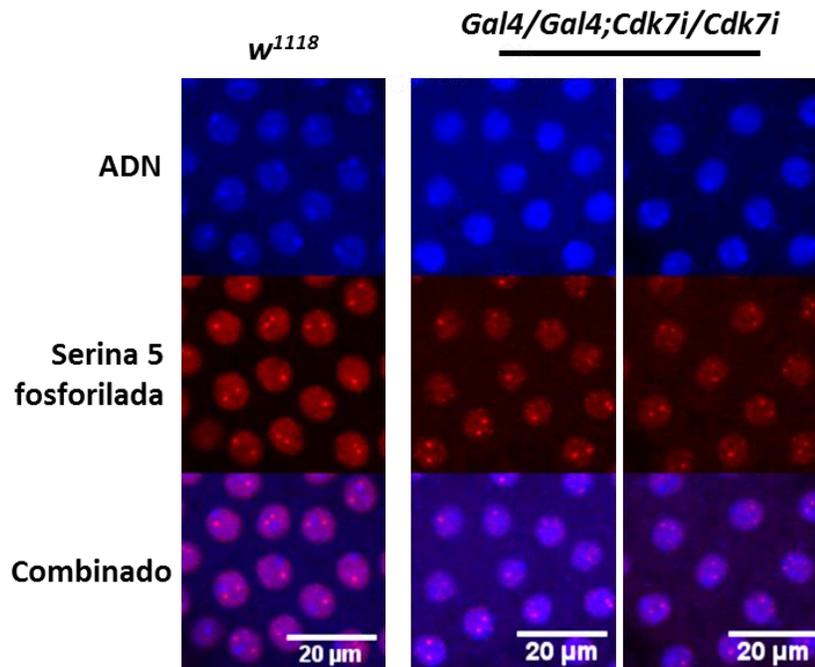


Figura 30. No se observan cambios entre la distribución de la marca de serina 5 fosforilada de embriones GAL4-UAS-*Cdk7i* de fenotipo silvestre comparado con la distribución en una línea *w¹¹¹⁸*. Imágenes tomadas en el microscopio confocal Olympus FV1000 invertido, con el objetivo UPLSAPO 20X NA: 0.75 y los láseres de excitación de 405 y 543 nm (para ver azul y rojo, respectivamente).

8. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se observó la dinámica sub-celular *in vivo* del factor de transcripción TFIIH, específicamente de uno de sus sub-complejos, CAK (Cinasa activadora de CDKs) durante la activación de la transcripción cigótica en embriones de *Drosophila melanogaster*. Adicionalmente se evaluó el efecto de la disminución de CDK7 en el desarrollo de los embriones de la mosca.

Se generaron líneas de moscas transgénicas que expresan a las proteínas de CAK (CDK7, MAT1 y Ciclina H) fusionadas a proteínas fluorescentes para observar su localización durante las rápidas divisiones del embrión temprano y particularmente durante la activación de la transcripción cigótica, que ocurre a partir del ciclo 8 [1], aun cuando algunos autores afirman que los primeros transcritos se generan desde el ciclo 6 [9]. La señal de las proteínas fluorescentes fue observada desde el ciclo 8, aunque las series de imágenes mostradas (Figuras 19-23) se tomaron a partir de los ciclos 9 y 10, ya que antes de estos ciclos los núcleos se encuentran en el centro del embrión, y aunque la microscopía confocal en teoría puede alcanzar esta profundidad, en la práctica no es posible observar claramente a los núcleos en el centro del sincicio. Las condiciones de tiempos de captura de menos de 30 segundos por imagen se deben a que es lo mínimo necesario para observar el ciclo celular sin perder información relevante ni generar un desfase artificial entre el principio y el final de la imagen.

La señal fluorescente de las tres proteínas recombinantes (CDK7, MAT1 y Ciclina H) coincide con la de un marcador de cromatina (H2Av-RFP) y otro de microtúbulos (Jupiter-GFP), y su intensidad varía gradualmente durante la mitosis, desde un máximo durante la breve interfase (fase S), hasta ser mínima, sin embargo identificable, en cromosomas en anafase (fin de la fase M). Estos resultados señalan la permanencia del CAK en la cromatina mitótica. Queda abierta la pregunta de si se está degradando solo diluyendo en el citoplasma.

Previo a este trabajo, existía poca información sobre la localización del CAK de TFIIH durante la activación de la transcripción cigótica, dichos resultados se obtuvieron a partir de ensayos de inmunotinción de embriones; y debido a las

inconsistencias entre reportes acerca de la distribución de CAK surgió el interés por observar los que sucede *in vivo* en el embrión temprano. Aguilar-Fuentes et al (2006) indican que la mayoría de Cdk7 se encuentra en el citoplasma del embrión temprano y solo una pequeña fracción se detecta junto con el Core en el núcleo, cantidad insuficiente para ser observada por inmunotinción pero detectable por ensayos de co-inmunoprecipitación de la cromatina [59], mientras que un trabajo del grupo de Beat Suter indica que en embriones silvestres la señal de CDK7 se pierde progresivamente hasta desaparecer durante la anafase, además, plantean que XPD (componente del core) se requiere para excluir a CDK7 de los cromosomas en mitosis. De acuerdo a este trabajo, en embriones mutantes de XPD, CDK7 se encuentra enriquecido en cromosomas mitóticos coincidiendo con mitosis catastróficas [60]. Estos resultados indican que tanto CDK7, como MAT1 y Ciclina H parecen traslaparse con los cromosomas mitóticos, enriquecidos con respecto al citoplasma, sin causar defectos en la mitosis y con una intensidad de señal que permite identificarlos incluso en anafase. Las líneas transgénicas son saludables y se desarrollan en el mismo periodo de tiempo que la línea usada como control silvestre, *w¹¹¹⁸*, que es el fondo genético utilizado para generar las moscas transgénicas.

La dinámica de CAK es consistente con lo reportado por Grisel Cruz en su tesis de doctorado [61] donde se reporta que la localización de tres componentes del core de TFIIH: p52, Xpb y p8, es altamente dinámica y siguen un patrón semejante al de los cromosomas durante los ciclos de división nuclear en el embrión temprano. Por esta razón, podemos extrapolar los resultados del presente trabajo y concluir que CDK7, MAT1 y Ciclina H siguen la misma dinámica de TFIIH en esta etapa del desarrollo. En el presente trabajo, se muestra por primera vez la dinámica de TFIIH *in vivo* durante la activación de la transcripción cigótica de *Drosophila melanogaster*. En conjunto con los resultados de Grisel Cruz sobre la dinámica del Core, nuestros resultados describen adecuadamente el comportamiento de estos elementos durante la activación de la transcripción cigótica. Anteriormente se había demostrado que los cromosomas mitóticos se encuentran moderadamente accesibles a

componentes de la maquinaria basal de transcripción, a factores y cofactores de transcripción y a proteínas de la cromatina para asegurar la rápida activación de la transcripción en el siguiente ciclo de división celular [11,74,75], pero no se sabía mucho acerca de TFIIH y su comportamiento durante esta transición. Con base en este trabajo, el siguiente paso sería determinar a qué secuencias se encuentra específicamente unido utilizando inmunoprecipitación de la cromatina. El conjunto de resultados obtenidos en la presente tesis indica que TFIIH puede desempeñar una función de *bookmarking*, donde su permanencia en ciertos promotores aseguraría la rápida transcripción de estos en el siguiente ciclo de división nuclear. *Bookmarking* se puede definir como la permanencia de factores unidos a regiones específicas de la cromatina para la transmisión de información regulatoria a través de la fase mitótica, cuando la transcripción se encuentra silenciada [74].

Para demostrar que las proteínas recombinantes de CAK poseen la misma función biológica que las proteínas endógenas se realizaron ensayos de rescate de alelos letales de Cdk7 y MAT1. Como se observó en la Figura 24, el ensayo de western blot de proteínas de machos rescatados revela una banda del tamaño de MAT1 endógeno. La cantidad de proteína en esta banda es mucho mayor en los individuos rescatados que en el control (la línea mutante), por lo que asumimos que está relacionado de alguna manera con la expresión de EYFP-MAT1 y MAT1-mCherry. Nadie más ha reportado haber utilizado las mutantes elegidas para este trabajo por lo que no tenemos referencias para sustentar nuestra hipótesis del procesamiento de EYFP-MAT1 y MAT1-mCherry, sin embargo, tenemos datos de rescates de líneas mutantes de p52 y p8 con proteínas recombinantes cuya dinámica es idéntica a los componentes del CAK analizados en este trabajo [61], por lo que no ponemos en duda que la dinámica observada sea un resultado de su actividad biológica.

Se sabe que embriones nulos para *p8* presentan mitosis defectuosas (desincronización, husos monopolares, fusiones mitóticas, centrosomas libres o ADN descondensado) que se atribuyen, posiblemente a fallas en la transcripción debido a una apertura ineficiente del ADN [61], y en este mismo trabajo se

observaron resultados similares con una mutante de XPB. Otros grupos ya habían reportado previamente que mutaciones en las subunidades CDK7 y XPD afectan a la progresión de la mitosis, ya que CDK7 está implicado en la regulación del ciclo celular [51,55,60]. Dichos experimentos se realizaron con mutantes de CDK7, así que en este trabajo se optó por utilizar un sistema de interferencia por ARN para disminuir la cantidad de Cdk7 en el embrión temprano a niveles mínimos y como consecuencia observamos un incremento al triple en el porcentaje de embriones con mitosis defectuosas con respecto a diferentes controles, consistente con los resultados descritos para el efecto de la ausencia de p8 o la mutación de XPD y XPB [61].

CAK, como parte del complejo TFIIH, fosforila al CTD de la RNA polimerasa II en el residuo de serina 5 durante el inicio de la transcripción [16]. Considerando lo anterior, esperábamos la disminución de esta marca en los embriones con CDK7 disminuido. Para comprobar esto, se realizó un ensayo de inmunotinción utilizando un anticuerpo específico que reconoce a la serina 5 fosforilada (H14) como indicador preliminar de problemas con el inicio de la transcripción. Sin embargo, en dichas muestras no encontramos embriones con defectos en la mitosis y los embriones con fenotipo normal (pero del mismo genotipo que los embriones con defectos) no tenían un cambio notable en la intensidad de la señal del anticuerpo H14.

Este resultado contradictorio se puede explicar de diferentes formas. Una primera hipótesis se basa en múltiples artículos que señalan que Cdk8, una Kinasa del complejo Mediator, y CDK9, componente de P-TEFb (positive transcription elongation factor b), como capaces de fosforilar a la serina 5 del CTD, sustituyendo así a la función de CDK7. Sin embargo estas propuestas se basan en experimentos *in vitro* con extractos purificados de humano y levadura. (Revisado en [76]). Además, no hay información publicada respecto a la actividad de estas cinasas (Cdk8 y Cdk9) en el embrión temprano de *Drosophila*. Por otra parte, Schwartz et al (2003) plantean la posibilidad de la existencia de cinasas que compensan la actividad de CDK7 cuando no es funcional en cromosomas politénicos [77]. La otra posible explicación es que la mínima

cantidad de CDK7 que logra traducirse es suficiente para mantener las funciones de fosforilación del CTD y que el incremento en los defectos en mitosis se debe a la insuficiencia de CAK libre en el citoplasma, por lo que se trata de un efecto sobre el control del ciclo celular (aun cuando no se observaron cambios en la proporción de embriones en los ciclos 9 a 11). Se ha reportado que XPD interacciona con la proteína Galla-1; cuando esta proteína sufre una mutación que la hace perder su función, los embriones tempranos presentan segregación anormal de los cromosomas, centrosomas mal posicionados y husos ramificados [35] y ya que XPD interacciona con Galla-1 y el CAK en el citoplasma [29,59] podría existir una interesante relación de esta doble interacción con los defectos en mitosis que se observaron al disminuir a CDK7 en el embrión temprano.

Experimentos de RNA-seq realizados con anterioridad, usando embriones carentes de p8 con defectos en la mitosis muestran que los transcritos tanto de origen materno como cigótico están desregulados, por lo que el efecto en la activación de la transcripción cigótica resulta complejo de definir [61]. Por lo anterior pensamos que realizar un experimento semejante pero disminuyendo a CDK7 no tendría sentido hasta asegurarnos de eliminar la influencia del efecto materno. Un enfoque que se ha planteado es la administración de fármacos inhibidores de diferentes sub-unidades de TFIIH directamente a los embriones tempranos. Para esto se requiere de fármacos hidrosolubles (como el minnelide, droga sintética diseñada a partir del triptolide) y estandarizar las condiciones para micro-inyectar rápidamente, causando un daño mínimo al embrión durante el proceso.

9. CONCLUSIONES

- CAK posee una distribución y dinámica semejante a la de los cromosomas mitóticos durante las divisiones nucleares rápidas del embrión temprano de *Drosophila melanogaster*.
- El traslape de la señal de las proteínas recombinantes de CAK con la señal de cromatina coincide con la primera oleada de transcritos del embrión y su permanencia en cromosomas mitóticos apunta a una posible función de *bookmarking*.
- El patrón de localización de CAK es idéntico a lo reportado previamente en nuestro laboratorio para los componentes del Core, por lo que monitorear a cualquiera de estas sub-unidades permite visualizar la dinámica de TFIIH.
- La disminución de Cdk7, uno de los componentes de CAK, provoca un incremento en el porcentaje de embriones con defectos mitóticos, afectando severamente la viabilidad de dicha línea de moscas.
- Definir la contribución de: el efecto materno, la disminución en la transcripción y el desacoplamiento de los ciclos de división nuclear, al fenotipo de incremento de defectos mitóticos, representa un reto a futuro para profundizar en la comprensión del papel de TFIIH en la activación de la transcripción cigótica.

10. PERSPECTIVAS

- Realizar un ensayo de inmunoprecipitación de cromatina con anticuerpos dirigidos a las proteínas fluorescentes en las líneas transgénicas de CAK para identificar su localización en promotores de los primeros genes transcritos durante la activación de la transcripción cigótica.
- Utilizar microscopía de súper-resolución para observar la dinámica de las proteínas recombinantes disponibles del CAK y el core.
- Evaluar si la disminución de MAT1 y Ciclina H mediante ARN de interferencia produce los mismos resultados que la disminución de CDK7.
- Estandarizar la micro-inyección de embriones con minnelide u otro inhibidor de TFIIH.
- Evaluar el uso de estas líneas transgénicas como modelo de estudio en diferentes estadios del desarrollo de la mosca.

REFERENCIAS

1. Tadros, W., & Lipshitz, H. D. (2009) The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts. *Development* 136, 3033-3042. doi: 10.1242/dev.033183
2. Harrison, M. M., Li, X.-Y., Kaplan, T., Botchan, M. R., & Eisen, M. B. (2011). Zelda Binding in the Early *Drosophila melanogaster* Embryo Marks Regions Subsequently Activated at the Maternal-to-Zygotic Transition. *PLoS Genetics*, 7(10), e1002266. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002266>
3. Li, X.-Y., Harrison, M., Kaplan, T., & Eisen, M. (2014). Establishment of regions of genomic activity during the *Drosophila* maternal to zygotic transition. *bioRxiv*, 1–20. <https://doi.org/10.1101/006312>
4. De Renzis, S., Elemento, O., Tavazoie, S., & Wieschaus, E. F. (2007). Unmasking activation of the zygotic genome using chromosomal deletions in the *Drosophila* embryo. *PLoS Biology*, 5(5), 1036–1051. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050117>
5. Foe, V. E., & Alberts, B. M. (1983). Studies of nuclear and cytoplasmic behaviour during the five mitotic cycles that precede gastrulation in *Drosophila* embryogenesis. *Journal of Cell Science*, 61, 31–70.
6. Kotadia, S., Crest, J., Tram, U., Riggs, B., & Sullivan, W. (2010) Blastoderm Formation and Cellularisation in *Drosophila melanogaster*. *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons. DOI: 10.1002/9780470015902.a0001071.pub2
7. **Farrell, J. A., & O'Farrell, P. H. (2014) From egg to gastrula: How the cell cycle is remodeled during the *Drosophila* mid-blastula transition. *Annu Rev Genet* ; 48: 269–294. doi:10.1146/annurev-genet-111212-133531.**
8. Deshpande, G., Stuke, J., & Schedl, P. (1995). scute (sis-b) function in *Drosophila* sex determination. *Molecular and Cellular Biology*, 15(8), 4430–4440.
9. Lee, M., Bonneau, A. R., & Giraldez, A. J. (2014) Zygotic genome activation during the maternal-to-zygotic transition. *Annu Rev Cell Dev Biol.*; 30: 581–613. doi:10.1146/annurev-cellbio-100913-013027.
10. Chen, K., Johnston, J., Shao, W., Meier, S., Staber, C., & Zeitlinger, J. (2013). A global change in RNA polymerase II pausing during the *Drosophila* midblastula transition. *eLife*, 2013(2), 1–19. <https://doi.org/10.7554/eLife.00861>
11. Blythe, S. A., & Wieschaus, E. F. (2016). Establishment and maintenance of heritable chromatin structure during early *Drosophila* embryogenesis. *eLife*, 5, e20148. <http://doi.org/10.7554/eLife.20148>
12. He, Y., Fang, J., Taatjes, D. J., & Nogales, E. (2013). Structural visualization of key steps in human transcription initiation. *Nature*, 495(7442), 481–6. <https://doi.org/10.1038/nature11991>
13. Vannini, A., & Cramer, P. (2012). Conservation between the RNA Polymerase I, II, and III Transcription Initiation Machineries. *Molecular Cell*, 45(4), 439–446. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.01.023>
14. Sainsbury, S., Bernecky, C., & Cramer, P. (2015). Structural basis of transcription initiation by RNA polymerase II. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 16(3), 129–143. <https://doi.org/10.1038/nrm3952>
15. Fishburn, J., Tomko E., Galburt E. & Hahn S. (2015) Double-stranded DNA translocase activity of transcription factor TFIIH and the mechanism of RNA polymerase II open complex formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Mar 31; 112(13):3961-6.

16. Palancade, B., & Bensaude, O. (2003). Investigating RNA polymerase II carboxyl-terminal domain (CTD) phosphorylation. *European Journal of Biochemistry*, 270(19), 3859–3870. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03794.x>
17. Czudnochowski, N., Bösken, C. a., & Geyer, M. (2012). Serine-7 but not serine-5 phosphorylation primes RNA polymerase II CTD for P-TEFb recognition. *Nature Communications*, 3(May), 842. <https://doi.org/10.1038/ncomms1846>
18. Zurita, M., & Merino, C. (2003). The transcriptional complexity of the TFIIH complex. *Trends in Genetics : TIG*, 19(10), 578–84. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2003.08.005>
19. Egly, J. M., & Coin, F. (2011). A history of TFIIH: Two decades of molecular biology on a pivotal transcription/repair factor. *DNA Repair*, 10(7), 714–721. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2011.04.021>
20. Schultz, P., Fribourg, S., Poterszman, a, Mallouh, V., Moras, D., & Egly, J. M. (2000). Molecular structure of human TFIIH. *Cell*, 102, 599–607. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00082-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00082-9)
21. Gibbons, B. J., Brignole, E. J., Azubel, M., Murakami, K., Voss, N. R., Bushnell, D. a., ... Kornberg, R. D. (2011). Subunit architecture of general transcription factor TFIIH. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(6), 1949–1954. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105266109>
22. Iben, S., Tschochner, H., Bier, M., Hoogstraten, D., Hozák, P., Egly, J. M., & Grummt, I. (2002). TFIIH plays an essential role in RNA polymerase I transcription. *Cell*, 109(3), 297–306. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00729-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00729-8)
23. Assfalg, R., Lebedev, A., Gonzalez, O. G., Schelling, A., Koch, S., & Iben, S. (2012). TFIIH is an elongation factor of RNA polymerase I. *Nucleic Acids Research*, 40(2), 650–659. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr746>
24. Coin, F., Oksenysh, V., Mocquet, V., Groh, S., Blattner, C., & Egly, J. M. (2008). Nucleotide Excision Repair Driven by the Dissociation of CAK from TFIIH. *Molecular Cell*, 31(1), 9–20. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.04.024>
25. Villicaña, C., Cruz, G., & Zurita, M. (2013). The genetic depletion or the triptolide inhibition of TFIIH in p53-deficient cells induces a JNK-dependent cell death in Drosophila. *Journal of Cell Science*, 126(11), 2502–2515. <https://doi.org/10.1242/jcs.122721>
26. Compe, E., & Egly, J.-M. (2012). TFIIH: when transcription met DNA repair. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(7), 476–476. <https://doi.org/10.1038/nrm3377>
27. Luo, J., Cimermancic, P., Viswanath, S., Ebmeier, C. C., Kim, B., Dehecq, M., ... Ranish, J. (2015). Architecture of the Human and Yeast General Transcription and DNA Repair Factor TFIIH. *Molecular Cell*, 59(5), 794–806. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.07.016>
28. Coin, F., Bergmann, E., Tremeau-Bravard, A., & Egly, J. M. (1999). Mutations in XPB and XPD helicases found in xeroderma pigmentosum patients impair the transcription function of TFIIH. *The EMBO Journal*, 18(5), 1357–1366. <http://doi.org/10.1093/emboj/18.5.1357>
29. Sandrock, B., & Egly, J. M. (2001). A Yeast Four-hybrid System Identifies Cdk-activating Kinase as a Regulator of the XPD Helicase, a Subunit of Transcription Factor IIH. *Journal of Biological Chemistry*, 276(38), 35328–35333. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105570200>
30. Ito, S., Kuraoka, I., Chymkowitch, P., Compe, E., Takedachi, A., Ishigami, C., ... Tanaka, K. (2007). XPG Stabilizes TFIIH, Allowing Transactivation of Nuclear Receptors: Implications for Cockayne Syndrome in XP-G/CS Patients. *Molecular Cell*, 26(2), 231–243. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.03.013>
31. Compe, E., & Egly, J.-M. (2016). Nucleotide excision repair and transcriptional regulation: TFIIH and beyond. *Annual Review of Biochemistry*, 85(1), 265–290. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014857>

32. Bradsher, J., Coin, F., & Egly, J. M. (2000). Distinct roles for the helicases of TFIIH in transcript initiation and promoter escape. *Journal of Biological Chemistry*, 275(4), 2532–2538. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.4.2532>
33. Fuss, J. O., & Tainer, J. A. (2011). XPB and XPD helicases in TFIIH orchestrate DNA duplex opening and damage verification to coordinate repair with transcription and cell cycle via CAK kinase. *DNA Repair*, 10(7), 697–713. <http://doi.org/10.1016/j.dnarep.2011.04.028>
- 34. Ito, S., Tan, L. J., Andoh, D., Narita, T., Seki, M., Hirano, Y., ... Tanaka, K. (2010). MMXD, a TFIIH-Independent XPD-MMS19 Protein Complex Involved in Chromosome Segregation. *Molecular Cell*, 39(4), 632–640. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.07.029>**
35. Yeom, E., Hong, S. T., & Choi, K. W. (2015) Crumbs interacts with Xpd for nuclear division control in *Drosophila*. *Oncogene*, May 21; 34(21): 2777-89. doi: 10.1038/onc.2014.202.
36. Kermi, C., Lo Furno, E., & Maiorano, D. (2017). Regulation of DNA Replication in Early Embryonic Cleavages. *Genes*, 8(1), 42. <https://doi.org/10.3390/genes8010042>
37. Rudolf, J., Rouillon, C., Schwarz-Linek, U., & White, M. F. (2010). The helicase XPD unwinds bubble structures and is not stalled by DNA lesions removed by the nucleotide excision repair pathway. *Nucleic Acids Research*, 38(3), 931–941. <http://doi.org/10.1093/nar/gkp1058>
38. Lolli, G., Lowe, E. D., Brown, N. R., & Johnson, L. N. (2004). The Crystal Structure of Human CDK7 and Its Protein Recognition Properties. *Structure*, 12(11), 2067–2079. <https://doi.org/10.1016/j.str.2004.08.013>
39. Meinhart, A., Kamenski, T., Hoepfner, S., Baumli, S., & Cramer, P. (2005). A structural perspective of CTD function, *Genes & Development* 1401–1415. <https://doi.org/10.1101/gad.1318105>
- 40. Gervais, V., Busso, D., Wasielewski, E., Poterszman, A., Egly, J., Thierry, J., ... Pasteur, L. (2001). Solution Structure of the N-terminal Domain of the Human TFIIH MAT1 Subunit. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(10), 7457–7464. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007963200>**
41. Akhtar, M. S., Heidemann, M., Tietjen, J. R., Zhang, D. W., Chapman, R. D., Eick, D., & Ansari, A. Z. (2009). TFIIH kinase places bivalent marks on the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Molecular Cell*, 34(3), 387–93. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.04.016>
42. Egloff, S., O'Reilly, D., Chapman, R. D., Taylor, A., Tanzhaus, K., Pitts, L., ... Murphy, S. (2007). Serine 7 of the RNA polymerase II CTD is specifically required for snRNA gene expression. *Science (New York, N.Y.)*, 318(5857), 1777–1779. <http://doi.org/10.1126/science.1145989>
43. Cho, E.-J., Takagi, T., Moore, C. R., & Buratowski, S. (1997). mRNA capping enzyme is recruited to the transcription complex by phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes & Development*, 11(24), 3319–3326.
44. Kelso, T. W. R., Baumgart, K., Eickhoff, J., Albert, T., Antrecht, C., Lemcke, S., ... Meisterernst, M. (2014). CDK7 controls mRNA synthesis by affecting stability of preinitiation complexes, leading to altered gene expression, cell cycle progression and survival of tumor cells. *Molecular and Cellular Biology*, 34(19), MCB.00595-14. <https://doi.org/10.1128/MCB.00595-14>
45. Larochelle, S., Amat, R., Glover-Cutter, K., Sansó, M., Zhang, C., Allen, J. J., ... Fisher, R. P. (2012). Cyclin-dependent kinase control of the initiation-to-elongation switch of RNA polymerase II. *Nature Structural & Molecular Biology*, 19(11), 1108–15. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2399>
46. Chymkowitch, P., Le May, N., Charneau, P., Compe, E., & Egly, J.-M. (2011). The phosphorylation of the androgen receptor by TFIIH directs the ubiquitin/proteasome process. *The EMBO Journal*, 30(3), 468–79. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.337>
47. Morgan, D. O. (1995). Principles of CDK regulation. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/374131a0>

48. Fisher, R. P. (2012). The CDK Network: Linking Cycles of Cell Division and Gene Expression. *Genes & Cancer*, 3(11–12), 731–738. <https://doi.org/10.1177/1947601912473308>
49. Ganuza, M., Sáiz-Ladera, C., Cañamero, M., Gómez, G., Schneider, R., Blasco, M. A., ... Barbacid, M. (2012). Genetic inactivation of Cdk7 leads to cell cycle arrest and induces premature aging due to adult stem cell exhaustion. *The EMBO Journal*, 31, 2498–2510. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.94>
50. Fisher, R. P. (2005). Secrets of a double agent: CDK7 in cell-cycle control and transcription. *Journal of Cell Science*, 118(22), 5171–5180. <https://doi.org/10.1242/jcs.02718>
51. Larochelle, S., Merrick, K. A., Terret, M.-E., Wohlbold, L., Barboza, N. M., Zhang, C., ... Fisher, R. P. (2007). Requirements for Cdk7 in the assembly of Cdk1/cyclin B and activation of Cdk2 revealed by chemical genetics in human cells. *Molecular Cell*, 25(6), 839–850. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.02.003>
52. Chen, J., Larochelle, S., Li, X., & Suter, B. (2003). Xpd/Ercc2 regulates CAK activity and mitotic progression. *Nature*, 424(6945), 228–232. <https://doi.org/10.1038/nature01746>
53. Lee, K. M., Miklos, I., Du, H., Watt, S., Szilagyi, Z., Saiz, J. E., ... Fisher, R. P. (2005). Impairment of the TFIIH-associated CDK-activating Kinase Selectively Affects Cell Cycle-regulated Gene Expression in Fission Yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 16(6), 2734–2745. <http://doi.org/10.1091/mbc.E04-11-0982>
54. Larochelle, S., Pandur, J., Fisher, R. P., Salz, H. K., & Suter, B. (1998). Cdk7 is essential for mitosis and for in vivo Cdk-activating kinase activity. *Genes & Development*, 12(3), 370–81. <https://doi.org/10.1101/gad.12.3.370>
55. Leclerc, V., Raisin, S., & Léopold, P. (2000). Dominant-negative mutants reveal a role for the Cdk7 kinase at the mid-blastula transition in *Drosophila* embryos. *The EMBO Journal*, 19(7), 1567–1575. <http://doi.org/10.1093/emboj/19.7.1567>
56. Liu, Q. Y., Wu, Z. L., Lv, W. J., Yan, Y. C., & Li, Y. P. (2007). Developmental expression of cyclin H and Cdk7 in zebrafish: the essential role of cyclin H during early embryo development. *Cell Research*, 17(2), 163–73. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7310144>
57. Rossi, D. J., Londesborough, A., Korsisaari, N., Pihlak, A., Lehtonen, E., Henkemeyer, M., & Mäkelä, T. P. (2001). Inability to enter S phase and defective RNA polymerase II CTD phosphorylation in mice lacking MAT1. *The EMBO Journal*, 20(11), 2844–56. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.11.2844>
58. Korsisaari, N., Rossi, D. J., Paetau, A., Charnay, P., Henkemeyer, M., & Makela, T. P. (2002). Conditional ablation of the MAT1 subunit of TFIIH in Schwann cells provides evidence that MAT1 is not required for general transcription. *J Cell Sci*, 115(Pt 22), 4275–4284. <https://doi.org/10.1242/jcs.00121>
59. Aguilar-Fuentes, J., Valadez-Graham, V., Reynaud, E., & Zurita, M. (2006). TFIIH trafficking and its nuclear assembly during early *Drosophila* embryo development. *Journal of Cell Science*, 119(Pt 18), 3866–3875. <https://doi.org/10.1242/jcs.03150>
60. Li, X., Urwyler, O., & Suter, B. (2010). *Drosophila* Xpd regulates Cdk7 localization, mitotic kinase activity, spindle dynamics, and chromosome segregation. *PLoS Genet*, 6(3), e1000876. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000876>
61. Cruz-Becerra, G. L. (2017) Estudio del papel de TFIIH durante la diferenciación de células germinales y la activación de la transcripción cigótica en *Drosophila melanogaster*. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México.
62. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2008) *Bioquímica*, Sexta Edición, Pág. 136, 143. Editorial Reverté, Barcelona, España.
63. Bachmann, A., & Knust, E. (2008). The use of P-element transposons to generate transgenic flies. *Methods in Molecular Biology*, 420, 61–77. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-583-1_4

64. Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007) *Introducción a la microbiología*, Novena Edición, Pág. 260. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina.
65. Greenspan, R. J. (2004) *Fly Pushing: The Theory and Practice of Drosophila Genetics*. Second Edition. P. 4. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
66. Baldi, S., & Becker, P. B. (2013) The variant histone H2A.V of *Drosophila*—three roles, two guises. *Chromosoma* (2013) 122:245–258.
67. van Daal A., & Elgin, S. C. (1992) A histone variant, H2AvD, is essential in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Cell* 3: 593–602.
68. Karpova, N., Bobinnec, Y., Fouix, S., Huitorel, P., & Debec, A. (2006). Jupiter , a New *Drosophila* Protein Associated With Microtubules, 312(February), 301–312. <https://doi.org/10.1002/cm.20124>
69. Huisken, J., & Stainier, D. Y. R. (2009) Selective plane illumination microscopy techniques in developmental biology. *Development* 136, 1963-1975. doi:10.1242/dev.022426
70. van Roessel P., & Brand, A. H. (2000) GAL4-mediated Ectopic Gene Expression in *Drosophila*. In '*Drosophila Protocols Chapter 24*: 439. Edited by Sullivan, Ashburner and Hawley. Cold Spring Harbor Press.
71. Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, K. C., Barinova, Y., Fellner, M., Gasser, B., Kinsey, K., Oettel, S., Scheiblauer, S., Couto, A., Marra, V., Keleman, K., and Dickson, B. J. (2007) A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature* 448(7150): 151-6. DOI: 10.1038/nature05954
72. Su, T. T. (2000) Immunoblotting of proteins from single *Drosophila* embryos. In '*Drosophila Protocols Chapter 34*: 577- 583. Edited by Sullivan, Ashburner and Hawley. Cold Spring Harbor Press.
73. Fasulo, B., Koyama, C., Yu, K. R., Homola, E. M., Hsieh, T. S., Campbell, S. D., & Sullivan, W. (2012). Chk1 and Wee1 kinases coordinate DNA replication, chromosome condensation, and anaphase entry. *Molecular Biology of the Cell*, 23(6), 1047–1057. <http://doi.org/10.1091/mbc.E11-10-0832>
74. Kadauke, S., & Blobel, G. A. (2013). Mitotic bookmarking by transcription factors. *Epigenetics & Chromatin*, 6, 6. <http://doi.org/10.1186/1756-8935-6-6>
75. Chen, D., Dundr, M., Wang, C., Leung, A., Lamond, A., Misteli, T., & Huang, S. (2005). Condensed mitotic chromatin is accessible to transcription factors and chromatin structural proteins. *The Journal of Cell Biology*, 168(1), 41–54. <http://doi.org/10.1083/jcb.200407182>
76. Prelich, G. (2002). RNA Polymerase II Carboxy-Terminal Domain Kinases: Emerging Clues to Their Function. *Eukaryotic Cell*, 1(2), 153–162. <http://doi.org/10.1128/EC.1.2.153-162.2002>
77. Schwartz, B. E., Larochelle, S., Suter, B., & Lis, J. T. (2003). Cdk7 Is Required for Full Activation of *Drosophila* Heat Shock Genes and RNA Polymerase II Phosphorylation In Vivo Cdk7 Is Required for Full Activation of *Drosophila* Heat Shock Genes and RNA Polymerase II Phosphorylation In Vivo. *Molecular and Cellular Biology*, 23(19), 6876–6886. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.19.6876>
78. Rosonina, E., & Blencowe, B. J. (2004). Analysis of the requirement for RNA polymerase II CTD heptapeptide repeats in pre-mRNA splicing and 3' -end cleavage Analysis of the requirement for RNA polymerase II CTD heptapeptide repeats in pre-mRNA splicing and 3' -end cleavage, 581–589. <https://doi.org/10.1261/rna.5207204.mechanisms>
79. Prasad, M., Jang, Anna., Starz-Gaiano, M., Melani, M., and Montell, D. J. (2007) A protocol for culturing *Drosophila melanogaster* stage 9 egg chambers for live imaging. *Nature Protocols* 2, 2467 – 2473. doi:10.1038/nprot.2007.363

80. Nowell, C. J. (2011) Centre for Advanced Microscopy, Training Manual. Ludwig Institute for Cancer Research. Version 2.0.

81. Brandt, A., Papagiannouli, F., Wagner, N., Wilsch-Bräuningner, M., Braun, M., Furlong, E. E., ... Großhans, J. (2006). Developmental control of nuclear size and shape by kugelkern and kurzern. *Current Biology*, 16(6), 543–552. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.01.051>

82. Gräf, R., Rietdorf, J., & Zimmermann, T. (2005). Live cell spinning disk microscopy. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 95, 57–75. <https://doi.org/10.1007/b102210>

83. Larochelle, S., Chen, J., Knights, R., Pandur, J., Morcillo, P., Erdjument-Bromage, H., ... Fisher, R. P. (2001). T-loop phosphorylation stabilizes the CDK7–cyclin H–MAT1 complex *in vivo* and regulates its CTD kinase activity. *The EMBO Journal*, 20(14), 3749–3759. <http://doi.org/10.1093/emboj/20.14.3749>

ANEXO I

Tabla Ia. Primers utilizados.

Oligonucleótidos para amplificación					
No. de Oligo	Nombre	Conc (uM)	TM (°C)	Descripción	Recibí
181	EcoRI-Cdk7	140.22	70	Forward de Cdk7, agrega un sitio de restricción EcoRI en el extremo 5'. No posee ATG.	13/01/2015
182	Cdk7-NotI	148.43	77	Reverse de Cdk7, agrega un sitio de restricción NotI en el extremo 3'. Posee codón de paro TAG.	13/01/2015
183	EcoRI-CycH	114.43	70	Forward de Ciclina H, agrega un sitio de restricción EcoRI en el extremo 5'. No posee ATG.	13/01/2015
184	CycH-NotI	96.22	73	Reverse de Ciclina H, agrega un sitio de restricción NotI en el extremo 3'. Posee codón de paro TAG.	13/01/2015
185	XhoI-CycH	119.42	72	Forward de Ciclina H, agrega un sitio de restricción XhoI en el extremo 5'. Posee ATG.	13/01/2015
186	CycH-XmaI	121.56	73	Reverse de Ciclina H, agrega un sitio de restricción XmaI en el extremo 3'. No posee codón de paro.	13/01/2015
187	XhoI-MAT1	137.76	77	Forward de MAT1, agrega un sitio de restricción XhoI en el extremo 5'. Posee ATG.	13/01/2015
188	MAT1-XmaI	124.83	77	Reverse de MAT1, agrega un sitio de restricción XmaI en el extremo 3'. No posee codón de paro.	13/01/2015
189	XhoI-Cdk7	180.09	73	Forward de Cdk7, agrega un sitio de restricción XhoI en el extremo 5'. Posee ATG.	13/01/2015

190	Cdk7-BamHI	174.37	75	Reverse de Cdk7, agrega un sitio de restricción BamHI en el extremo 3'. No posee codón de paro.	13/01/2015
191	XhoI-EYFP	144.34	75	Forward de EYFP, agrega un sitio de restricción XhoI en el extremo 5'. Posee ATG.	13/01/2015
192	EYFP-HindIII	171.47	72	Reverse de EYFP, agrega un sitio de restricción BamHI en el extremo 3'. No posee codón de paro.	13/01/2015
193	HindIII-MAT1	129.23	77	Forward de MAT1, agrega un sitio de restricción EcoRI en el extremo 5'. No posee ATG.	13/01/2015
194	MAT1-NotI	133.92	76	Reverse de MAT1, agrega un sitio de restricción NotI en el extremo 3'. Posee codón de paro TAG.	13/01/2015
4424	XmaI-mCherry	75.91	77	Forward de mCherry, agrega un sitio de restricción XmaI en el extremo 5'. No posee ATG.	8/05/2015
6022	5' XmaI-mCherry	165.52	78	Forward de mCherry, agrega un sitio de restricción XmaI en el extremo 5'. No posee ATG y posee una base extra (por lo que en realidad no sirve para nuestras construcciones)	2012 (Grisel)
6023	3' mCherry-NotI	185.54	74	Reverse de mCherry, agrega un sitio de restricción NotI en el extremo 3'. Posee codón de paro TAA.	2012 (Grisel)
Oligonucleótidos para secuenciación					
Número de Oligo	Nombre	Conc (uM)	TM (°C)	Descripción	Recibí
5007	3' XFPseq	238.02	63	Reverse para EGFP y EYFP, permite observar las primeras 400 pares de bases.	2009 (Grisel)
2367	Fwr EGFP-Cdk7 (F-Cdk7)	220.65	59	Forward para Cdk7, permite observar la segunda mitad del gen (Aprox. 650pb)	10/03/2015
2368	Rvso EGFP-Cdk7 (R-Cdk7)	295.87	63	Reverse para Cdk7, permite observar la primera mitad del gen (Aprox. 400pb).	10/03/2015
2369	Fwr EGFP-CycH (F-CycH)	294.29	59	Forward para CycH, permite observar la segunda mitad del gen (Aprox. 650pb)	10/03/2015
2370	Rvso EGFP-CycH (R-CycH)	224.79	64	Reverse para CycH, permite observar la primera mitad del gen (Aprox. 350pb).	10/03/2015
2371	Fwr mCherry (F-mCherry)	250.71	68	Forward para mCherry, permite observar casi todo el gen (Aprox. 650pb), excepto por los primeros 70-80pb.	10/03/2015
2372	F MAT1-mCherry	315.88	61	Forward para MAT1, permite observar la segunda mitad del gen (Aprox. 580pb)	10/03/2015

	(F-MAT1)				
2373	R MAT1- mCherry (R-MAT1)	274.51	68	Reverse para MAT1, permite observar la primera mitad del gen (Aprox. 440pb). No usar, de preferencia, ya que las secuencias resultan llenas de ruido, usar en su lugar los oligos de amplificación.	10/03/2015
2374	Fwrđ EYFP (F-EYFP)	209.84	66	Forward de Cdk7, permite observar toda la secuencia del gen EYFP (720pb) Su secuencia es complementaria a las últimas bases de Cdk7.	10/03/2015
2906	IntF Cych (Int-Cych)	193.61	66	Forward para Cych, permite observar la segunda mitad del gen (Aprox. 400pb)	23/03/2015

Tabla Ib. Amplicones y las enzimas Taq Pol utilizadas.

No.	Descripción	Oligos utilizados	Enzima	No. Lote	Fecha de amplificación
1a	EcoRI-Cdk7-NotI	181, 182 (2015)	Roche, Taq Pol dNTPack Prod. No. 04728866001	14398221	16/01/2015
3a	XhoI-Cdk7-BamHI	189, 190 (2015)	“ “	“ “	“ “
5a	XhoI-Cych-XmaI	185, 186 (2015)	“ “	“ “	“ “
7	EcoRI-Cych-NotI	183, 184 (2015)	“ “	“ “	“ “
9a	XhoI-MAT1-XmaI	187, 188 (2015)	“ “	“ “	“ “
11a	HindIII-MatI-NotI	193, 194 (2015)	“ “	“ “	“ “
11b	HindIII-MatI-NotI	193, 194 (2015)	“ “	“ “	21/01/15
11c	HindIII-MatI-NotI	193, 194 (2015)	Roche, Expand High Fidelity Enzyme Mix Prod. No. 04738250001	11075538	22/01/15
1b	EcoRI-Cdk7-NotI	181, 182 (2015)	“ “	“ “	23/01/2015
3b	XhoI-Cdk7-BamHI	189, 190 (2015)	“ “	“ “	23/01/2015

5b	XhoI-CycH-XmaI	185, 186 (2015)	“ “	“ “	28/01/2015*
9b	XhoI-MAT1-XmaI	187, 188 (2015)	“ “	“ “	23/01/2015
11d	HindIII-MatI-NotI	193, 194 (2015)	“ “	“ “	2/02/2015
9c	XhoI-MAT1-XmaI	187, 188 (2015)	“ “	“ “	2/02/2015
12a	XhoI-EYFP-HindIII	191, 192 (2015)	“ “	“ “	3/02/2015
12b	XhoI-EYFP-HindIII	191, 192 (2015)	“ “	“ “	6/02/2015
13	HindIII-MatI-NotI	193, 194 (2015)	Roche, Expand High Fidelity Enzyme Mix Prod. No. 04738250001	11075538	4/03/2015
14	XhoI-Cdk7-BamHI	189, 190 (2015)	Thermo Scientific, Taq DNA polymerase EP0404	00197145	19/03/2015
15	EcoRI-CycH-NotI	183, 184 (2015)	“ “	“ “	9/04/2015
16	XhoI-Cdk7-BamHI	189, 190 (2015)	Roche, Expand High Fidelity Enzyme Mix Prod. No. 04738250001	13434020	23/04/2015
17	XmaI-mCherry-NotI	6022, 6023 (2012)	“ “	“ “	23/04/2015
18	XhoI-CycH-XmaI	185, 186 (2015)	“ “	“ “	28/04/2015
19	XmaI-mCherry-NotI	4424 (2015), 6023 (2012)	“ “	“ “	12/05/2015

ANEXO II

Tabla II. Reporte de resultados de secuenciaci3nes.

Inserto	Plásmido	No. Col.	Amplicones	Secuencia No.	Fecha de secuenciación	Resultado
EGFP-CyCH	Hsp83	1	7	3283	3/03/15	Sin alteraciones, primeras 400pb de EGFP.
				3746	11/03/15	F-CyCH. Cambio de base A a G, lo noté hasta el 23/03. Cambia una L por una P.
				3747	17/03/15	R-CyCH. Sin alteraciones.
				4667	25/03/15	IntF-CyCH. Sin alteraciones.
EGFP-Cdk7	Hsp83	2	1a, 1b	3282	3/03/15	R-EGFP. Sin alteraciones.
				3741	11/03/15	F-Cdk7. Sin alteraciones, solo SNPs.
				3742	11/03/15	R-Cdk7. Sin alteraciones

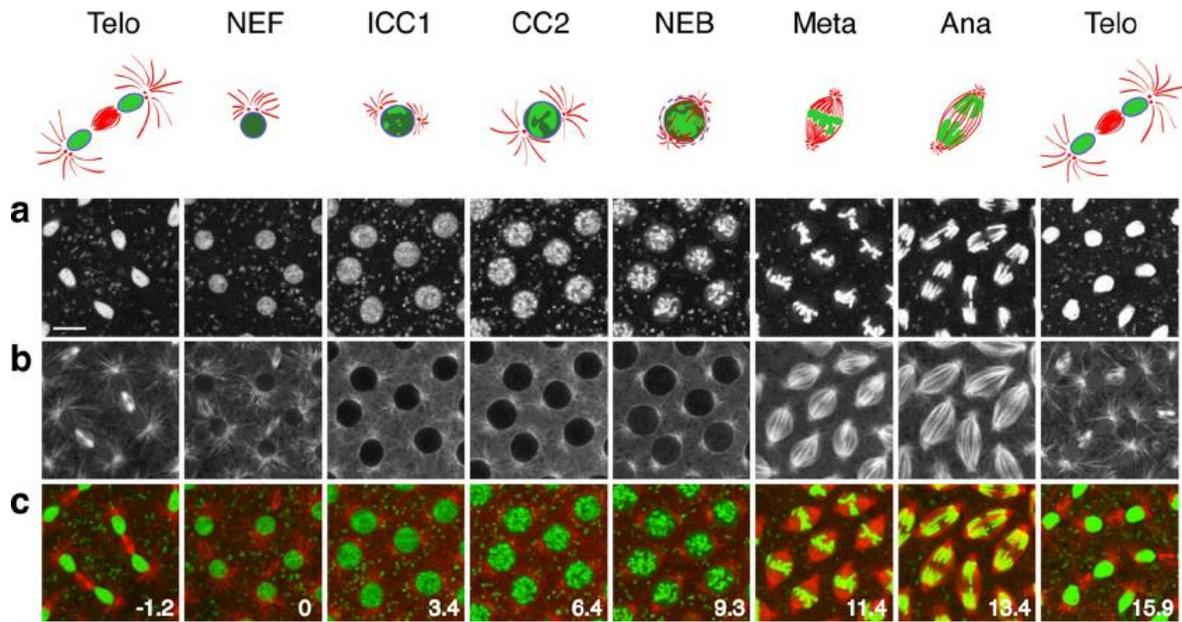
CycH-mCherry	pEGFP-N1	3	5a, 5b	3748	11/03/15	F-mCherry. Sin alteraciones (No pudimos ver el inicio pero si estaba alterado)
				3749	11/03/15	F-CycH. Cambio de base A a G, lo noté hasta el 23/03.
				3750	11/03/15	R-CycH. Sin alteraciones
				4666	25/03/15	IntF-CycH. Sin alteraciones.
MAT1-mCherry	pEGFP-N1	4	9a, 9b, 9c	3751	11/03/15	F-mCherry. Inserción al inicio que cambia fase.
				3752	11/03/15	F-MAT1. Mutación puntual de T a C y pérdida de una base.
				3753	17/03/15	R-MAT1. Sin alteraciones.
Cdk7-EYFP	pEYFP-N1	3	3a, 3b	3743	11/03/15	F-EYFP. Sin alteraciones.
				3744	11/03/15	F-Cdk7. Sin alteraciones.
				3745	11/03/15	R-Cdk7. Cambio de base (72) de A a G (Pasa de E a G)
EYFP	pBKSII+	5	12a, 12b	4037	17/03/15	F-EYFP. Sin alteraciones.
				4038	17/03/15	R-EYFP. Sin alteraciones.
MAT1-mCherry	pEGFP-N1	6	9a, 9b, 9c	4663	25/03/15	F-MAT1. Sin alteraciones.
				4664	25/03/15	R-MAT1. No salió secuencia (hasta 9/04).
				4665	25/03/15	F-MCherry. Inserción al inicio que cambia fase.
				5292	9/04/15	R-MAT1. Sin alteraciones.
EYFP-MAT1	pBKSII+	8	12a, 12b, 13	5289	9/04/15	F-EYFP. Sin alteraciones.
				5290	9/04/15	F-MAT1. Sin alteraciones.
				5291	9/04/15	R-MAT1. Sin alteraciones.
Cdk7-EYFP	pEYFP-N1	10	14	5293	9/04/15	F-EYFP. Sin alteraciones.
				5294	9/04/15	F-Cdk7. Sin alteraciones.
				5295	9/04/15	R-Cdk7. Sin alteraciones pero repetimos (mala calidad).
				6218	17/04/15	F-Cdk7. Sin alteraciones.
				6219	17/04/15	R-Cdk7. Pérdida de base que cambia fase de ¼ de la proteína.

EGFP-CycH	Hsp83	12	15	6355	20/04/15	R-EGFP. No salió secuencia, pero ya no repetimos.
				6356	20/04/15	F-CycH. Cambio de base A a G, que cambia N por D.
				6357	20/04/15	R-CycH. Sin alteraciones.
CycH-mCherry	pEGFP-N1	13	5a, 5b, Amp. de mCherry por Grisel	6358	20/04/15	F-CycH. Cambio de base A a G, se arrastró desde Col. 3, pensando que estaba bien se usó de templado.
				6359	20/04/15	R-CycH. Sin alteraciones.
				6360	20/04/15	F-mCherry. Inserción al inicio que cambia fase.
MAT1-mCherry	pEGFP-N1	14	9a, 9b, 9c, Amp. de mCherry por Grisel	6361	20/04/15	F-mCherry. Inserción en el inicio (esto se ve con la sec. 6362)
				6362	20/04/15	F-MAT1. Sin alteraciones.
				6363	20/04/15	R-MAT1. Sin alteraciones pero mala calidad.
			7076	28/04/15	F-MAT1. Sin alteraciones.	
EYFP-MAT1	Hsp83	11	12a, 12b, 13	6486	22/04/15	F-MAT1. Sin alteraciones.
				6487	22/04/15	R-MAT1. Mala Calidad
				6488	22/04/15	R-EYFP. Mala calidad.
				7073	28/04/15	F-EYFP. Sin alteraciones.
				7074	28/04/15	R-EYFP. Sin alteraciones.
				7075	28/04/15	F-MAT1. No salió la secuencia.
				7609	6/05/15	F-MAT1. Sin alteraciones.
				7610	6/05/15	R-MAT1. Sin alteraciones.
Cdk7-EYFP	pEYFP-N1	15	16	7611	6/05/15	F-Cdk7. Sin alteraciones, solo SNPs.
				7612	6/05/15	R-Cdk7. Sin alteraciones.
				7613	6/05/15	F-EYFP. Sin alteraciones.
				7614	6/05/15	R-EYFP. Sin alteraciones.
CycH-mCherry	pEGFP-N1	23	18, Amp. de mCherry por Grisel	8241	18/05/15	F-CycH. Mutación que hace a K102 pasar a T102.

				8242	18/05/15	R-CycH. Mutación que hace a L19 pasar a R19.
Cdk7-EYFP	Hsp83	4	16	8243	18/05/15	F-Cdk7. Sin alteraciones, solo SNPs.
				8244	18/05/15	R-Cdk7. Sin alteraciones.
				8245	18/05/15	F-EYFP. Sin alteraciones.
CycH-mCherry	pEGFP-N1	21	18, Amp. de mCherry por Grisel	8987	27/05/15	R-CycH. Sin alteraciones.
CycH-mCherry	pEGFP-N1	26	18, Amp. de mCherry por Grisel	8988	27/05/15	R-CycH. Sin alteraciones.
MAT1-mCherry	pEGFP-N1	24	9a, 9b, 9c, 19	8989	27/05/15	F-mCherry. Sin alteraciones.
				8990	27/05/15	F-MAT1. Sin alteraciones.
				8991	27/05/15	R-MAT1. Sin alteraciones.
CycH-mCherry	pEGFP-N1	21	18, Amp. de mCherry por Grisel	9317	1/06/15	F-CycH. Cambio de base A a G, que resulta en un cambio de D a G.
CycH-mCherry	pEGFP-N1	26	18, Amp. de mCherry por Grisel	9318	1/06/15	F-CycH. Sin alteraciones.
MAT1-mCherry	Hsp83	6	9a, 9b, 9c, 19	9777	9/06/15	F-MAT1. Sin alteraciones.
				9778	9/06/15	R-MAT1. Sin alteraciones.
				9779	9/06/15	F-mCherry. Sin alteraciones.
CycH-mCherry	pEGFP-N1	37	18, 19	9780	9/06/15	F-CycH. Sin alteraciones.
				9781	9/06/15	R-CycH. Sin alteraciones.
				9782	9/06/15	F-mCherry. Sin alteraciones.

ANEXO III

Mitosis en el blastodermo sincicial de *Drosophila melanogaster* [73].



Embrión en la división nuclear 12, donde a) GFP-histona (no se especifica cuál) y b) rodamina-tubulina. Telo=Telofase, NEF=Formación de la envoltura nuclear, ICC1=Inicio de la condensación de cromatina, CC2=Segunda etapa de condensación de la cromatina, NEB=Rompimiento de la envoltura nuclear, Meta=Metafase, Ana=Anafase.

ANEXO IV

Tablas de datos crudos de los ensayos de rescate.

	Cdk7 ^A				Cdk7 ^B			
	Línea 4		Línea 8		Línea 4		Línea 8	
	A ₁₄₀	B ₁₄₅	A ₁₇₄	B ₃₈	A ₁₇₅	B ₁₇₃	A ₁₃₇	B ₁₆₃
$\frac{Cdk7^{WT}}{Cdk7^{A/B}}; \frac{EGFP - Cdk7}{+}$	100	100	95.4	100	100	100	90.5	100
$\frac{Cdk7^{WT}}{FM7c}; \frac{EGFP - Cdk7}{+}$	77.1	78.6	100	68.4	87.4	85.0	80.3	81.6
$\frac{FM7c}{Y}; \frac{EGFP - Cdk7}{+}$	58.6	67.6	74.7	55.4	70.9	71.1	81.0	62.6
$\frac{Cdk7^{A/B}}{Y}; \frac{EGFP - Cdk7}{+}$	82.1	88.3	83.3	81.6	74.3	91.3	100	69.3

Tabla IVa. Porcentajes de supervivencia (Individuos observados/Individuos esperados) de la cruce de machos homocigotos para *EGFP-Cdk7* con hembras mutantes. Se muestran los cuatro genotipos posibles de la cruce para las mutantes Cdk7^A (donde E68K) y Cdk7^B (donde G200D).

Cada cruce se realizó por duplicado (A/B) y en subíndice se indica el número de individuos esperados para cada genotipo.

	% supervivencia (Individuos observados/Individuos esperados)					
	TM6			MKRS		
	A ₃₁	B ₃₄	C ₂₈	A ₁₇	B ₂₁	C ₆₆
$\frac{MAT1^{MI03948}}{CyO}; \frac{EYFP - Mat1}{Bal}$	100	86.8	78.6	89.4	91.7	100
$\frac{MAT1^{MI03948}}{CyO}; \frac{EYFP - Mat1}{EYFP - Mat1}$	91.9	100	100	100	71.4	90.2
$\frac{MAT1^{MI03948}}{MAT1^{MI03948}}; \frac{EYFP - Mat1}{Bal}$	72.6	75	70	97	100	91.7
$\frac{MAT1^{MI03948}}{MAT1^{MI03948}}; \frac{EYFP - Mat1}{EYFP - Mat1}$	70	100	85.7	60.6	61.9	84.8

Tabla IVb. Porcentajes de supervivencia (Individuos observados/Individuos esperados) de la cruce de machos y hembras con el mismo genotipo ($MAT1^{MI03948}/CyO;EYFP-MAT1/TM6$ y $MAT1^{MI03948}/CyO;EYFP-MAT1/MKRS$). Se muestran los cuatro genotipos posibles resultantes de la cruce. Cada cruce se realizó por triplicado (A, B, C) y en subíndice se indica el número de individuos esperados para cada genotipo.

	% supervivencia (Individuos observados/Individuos esperados)			
	TM6		MKRS	
	A ₁₇	B ₇₀	A ₃₈	B ₉₀
$\frac{MAT1^{MI03948}}{CyO}; \frac{Mat1 - mCherry}{Bal}$	100	77.1	44.7	100
$\frac{MAT1^{MI03948}}{CyO}; \frac{Mat1 - mCherry}{Mat1 - mCherry}$	52.9	60	30.7	75.8
$\frac{MAT1^{MI03948}}{MAT1^{MI03948}}; \frac{Mat1 - mCherry}{Bal}$	85.3	87.9	100	95.2
$\frac{MAT1^{MI03948}}{MAT1^{MI03948}}; \frac{Mat1 - mCherry}{Mat1 - mCherry}$	41.2	100	61.33	78

Tabla IVc. Porcentajes de supervivencia (Individuos observados/Individuos esperados) de la cruce de machos y hembras con el mismo genotipo ($MAT1^{MI03948}/CyO;MAT1-mCherry/TM6$ y $MAT1^{MI03948}/CyO;MAT1-mCherry/MKRS$). Se muestran los cuatro genotipos posibles resultantes de la cruce. Cada cruce se realizó por duplicado (A, B, C) y en subíndice se indica el número de individuos esperados para cada genotipo.

ANEXO V

Preparación de soluciones utilizadas en la presente tesis.

TBE 5X: 450 mM Tris-Base, 444 mM ácido bórico, 10 mM EDTA pH 8.0.

PBS 10X: 1.37 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na₂HPO₄, 18 mM KH₂PO₄. Ajustar pH a 7.4 y esterilizar en autoclave.

Testis Buffer: 183 mM KCl, 47 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 6.8. Llevar a pH 6.8.

Buffer de homogeneizado: 250 mM sacarosa, 50 mM Tris pH 7.5, 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM EDTA. Esterilizar por filtración con un tamaño de poro de 0.22 µm. Se alícuota y se almacenan a -20°C. Antes de usar, suplementar con inhibidor de proteasas Complete™ 50X de (Sigma-Aldrich).

Acrilamida 30%: 29.2% acrilamida (p/v), 0.8% bisacrilamida (p/v). Filtrar en un poro de 0.22 µm. Almacenar a 4°C protegido de la luz.

Laemmli 2X: 65.8 mM Tris-HCl pH 6.8, 2.1% SDS, 26.3% glicerol (v/v), 0.01% azul de bromofenol. **Guardar a TA, antes de usar suplementar con 50 µL de β-mercaptoetanol por cada 950 µL de buffer.**

Buffer de Corrida 5X: 124 mM Tris-Base, 960 mM glicina, 0.5 % SDS (p/v). Esterilizar y guardar a 4°C.

Buffer de Transferencia: 50 mM Tris-Base, 380 mM glicina, 0.1% SDS (p/v), 20% metanol. Guardar a 4°C protegido de la luz.

Medio Agar-Jugo de manzana: 80% de agar piloncillo fundido (v/v), 20% de jugo de manzana (v/v). Agregar 0.5% de ácido propiónico justo antes de vertir.

Embryo Buffer (EB): 10 mM Tris-Cl pH 7.5, 80 mM β-glicerofosfato de sodio pH 7.5, 20 mM EGTA, 15 mM MgCl₂, 2 mM Na₃VO₄, 1 mM Benzamidina, 1 mM metabisulfito de sodio, 2mM PMSF, 0.05% Tween-20 (v/v). Este buffer se prepara al momento y el volumen que no es utilizado ese mismo día debe ser descartado.

2X SDS Sample Buffer: 100 mM Tris-Cl pH 6.8, 4% SDS (p/v), 20% Glicerol (v/v), 0.2% Azul de bromofenol (p/v), 200 mM Dithiothreitol (DTT). El buffer sin DTT se puede mantener a temperatura ambiente, suplementar antes de usar.

TBS: 20 mM Tris-Base, 150 mM NaCl y ajustar a pH 7.4 con HCl, esterilizar en autoclave.

Crosslinking Buffer (CB): 50 mM Hepes, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 100 mM NaCl.

ANEXO VI

Tabla VI. Cuantificación de embriones con defectos en la mitosis, resultado de la interferencia de cdk7.

Datos crudos					
Experimento A		alfa-Tubulina/DAPI en Yokogawa			
	W1118	Driver GAL4	UAS-Cdk7i	GAL4-Cdk7i	
Ciclos 1-8	1(298)	2(411)	1(427)	1(42)	
Ciclos 9-11	7(65)	7(60)	7(65)	5(16)	
Ciclos 12-14	1(42)	1(32)	1(71)	2(23)	
Gastrulados	0(41)	0(29)	0(39)	0(0)	Total
Total	446	532	602	81	1661
Experimento B		alfa-Tubulina/Sytox en Olympus			
	W1118	Driver GAL4	UAS-Cdk7i	GAL4-Cdk7i	
Ciclos 1-8	0(503)	0(529)	0(489)	7(534)	
Ciclos 9-11	16(114)	12(93)	11(107)	46(111)	
Ciclos 12-14	1(41)	3(55)	5(100)	5(75)	
Gastrulados	0(59)	0(28)	0(17)	3(15)	Total
Total	717	705	713	735	2870
Experimento C		alfa-Tubulina/DAPI en Olympus			
	W1118	Driver GAL4	UAS-Cdk7i	GAL4-Cdk7i	
Ciclos 1-8	3(519)	1(736)	1(395)	5(724)	
Ciclos 9-11	12(108)	9(173)	19(226)	31(86)	
Ciclos 12-14	3(57)	0(74)	12(247)	4(68)	
Gastrulados	0(43)	0(32)	0(62)	0(16)	Total
Total	727	1015	930	894	3566
Conté 8097 embriones			93		