



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales

## **Caracterización de alelos mutantes de *amfos***

Tesis individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

**Licenciado en Microbiología**

**Presenta:**

Luis Alberto Hidalgo Chaires



Facultad de Ciencias Naturales  
Licenciatura en Microbiología

**Caracterización de alelos mutantes de *amfos***

Tesis Individual  
Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Licenciado en Microbiología

**Presenta:**  
Luis Alberto Hidalgo Chaires

**Dirigido por:**  
Dr. Juan Rafael Riesgo Escóvar

Dr. Juan Rafael Riesgo Escóvar  
Presidente

\_\_\_\_\_  
Firma

Dr. Fausto Arellano Carbajal  
Secretario

\_\_\_\_\_  
Firma

Dr. José Antonio Cervantes Chávez  
Vocal

\_\_\_\_\_  
Firma

Dra. Bertha Isabel Carvajal Gamez  
Vocal

\_\_\_\_\_  
Firma

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Fecha  
México

# Resumen

*amfos* (amigo de *fos*) es un gen que interactúa genéticamente con el oncogén *kayak*, homólogo en *Drosophila melanogaster* de los genes *fos* de vertebrados. Ambos genes presentan un fenómeno genético poco común conocido como letalidad sintética. Normalmente cuando un organismo es heterocigoto para un gen, con un alelo mutante y su contraparte silvestre y al mismo tiempo posee un alelo mutante en adición a la copia silvestre de un segundo gen, el organismo dihíbrido es viable y fértil, aunque la condición letal ocurra si uno de los genes es homocigoto. La excepción a lo anterior pasa muy raramente, cuando ambos genes tienen una relación genética muy estrecha tal que los organismos dobles heterocigotos para ambos genes no pueden terminar su desarrollo y la condición resultante es la letalidad embrionaria. Los embriones dihíbridos para *amfos* y *kayak* fallan al completar la embriogénesis y exhiben dos fenotipos anormales, apertura dorsal e incorrecta involución de la cabeza. Homocigocis individual para *amfos* ó *kayak* tienen los mismos fenotipos anormales, incluso si el otro gen es homocigoto silvestre. Este estudio clasifica y cuantifica los fenotipos mutantes de estos genes, y los que son producto de la interacción entre los mismos y caracteriza la naturaleza molecular de *amfos* identificando lesiones moleculares presentes en alelos mutantes.

# Summary

*amfos* (*amigo de fos*) is a novel gene that interacts genetically with the well characterized oncogenic gene *kayak*, the *Drosophila melanogaster* homolog of vertebrate *fos* genes. Both genes present a very rare and interesting genetic phenomenon, known as synthetic lethality. Normally, when an organism is heterozygous for a gene, having one mutant allele plus a wild type counterpart, and at the same time being also heterozygous for a mutant allele and the wild type counterpart of a second gene, both genes being homozygous lethal, the dihybrid organism is viable and fertile. The exception to the above happens very rarely, when both genes have a very strong genetic relationship such that organisms doubly heterozygous for both genes cannot finish their development, and the ensuing condition results in lethality. The dihybrid *Drosophila* embryos for *amfos* and *kayak* fail to complete embryogenesis and exhibits two abnormal phenotypes, dorsal open and head involution

defects. Embryos singly homozygous mutant for *amfos* or *kayak* also have these same mutant phenotypes, even if the other is wildtype. This study classifies and quantitates the mutant phenotypes of these genes, including those present in the genetic interactions between them, and characterizes the molecular nature of *amfos*, identifying the molecular lesions present in *amfos* mutant alleles.

Dirección General de Bibliotecas UAQ



## ***Dedicatoria***

*A mi padre y a mi madre por apoyarme en los noches más oscuros y a mis amigos de la infancia por regalarme los días más brillantes.*

*Al Doctor Juan Rafael Riesgo Escovar por las interminables sesiones de laboratorio, por todos sus consejos e inagotable paciencia.*

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## **Agradecimientos**

**A los miembros de la Unidad de Proteogenómica del Instituto de Neurobiología, al Dr. Michael Jeziorski y a la M. en C. Adriana González Gallardo**

**Al Dr. Juan Manuel Murillo Maldonado que forma parte del laboratorio de Genética de transducción de Señales del Instituto de Neurobiología**

Dirección General de Bibliotecas UJAQ

# Índice

Resumen.....	3
Summary .....	3
Introducción .....	9
El gen <i>amigo de fos (amfos)</i> .....	9
Cerrado dorsal embrionario, <i>amfos</i> y <i>kayak</i> .....	11
Antecedentes.....	12
<i>Drosophila melanogaster</i> como modelo.....	12
Desarrollo temprano del embrión de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	13
Movimientos morfológicos en el embrión de <i>D. melanogaster</i> .....	14
Gastrulación.....	14
Elongación de la banda germinal .....	14
Acortamiento de la banda germinal.....	15
Cerrado Dorsal e Involución de la Cabeza .....	15
Control genético del desarrollo .....	16
Eje antero-posterior .....	17
Nanos y el eje posterior.....	17
Establecimiento del eje dorsal-ventral.....	19
Segmentación en el embrión de la mosca.....	20
Cerrado dorsal en <i>Drosophila melanogaster</i> .....	21
Generalidades .....	21
Citoesqueleto y Microtúbulos.....	26
Filopodios .....	28
Proteínas de membrana.....	28
Justificación .....	28
Hipótesis.....	29
Objetivos .....	29
Metodología .....	29
Genética y cruas de <i>amfos</i> y <i>kayak</i> .....	29
Preparación de cutículas .....	30
Extracción de ADN .....	30
Primers .....	31
Purificación del producto de la PCR.....	32

Preparación de células electrocompetentes .....	32
Ligación de producto de PCR .....	32
Electroporación.....	33
Miniprep.....	33
Secuenciación .....	34
Resultados .....	34
Los alelos de falta de función de <i>amfos</i> inducen letalidad embrionaria.....	34
<i>amfos</i> interactúa genéticamente con <i>kay</i> mediante no .....	38
complementación no alélica o letalidad sintética .....	38
<i>amfos</i> se encuentra en el brazo derecho del tercer cromosoma de <i>D. melanogaster</i> .....	40
Clonación de los alelos de <i>amfos</i> .....	41
El alelo <i>Thar</i> <sup>1</sup> tiene una deleción en el extremo 3' .....	42
Dominios predichos de Amfos. La deleción del alelo <i>Thar</i> <sup>1</sup> altera la secuencia a partir de la segunda mitad del dominio ácido predicho de la proteína codificada por <i>amfos</i> .....	44
El alelo <i>mab</i> <sup>2</sup> tiene un cambio en la secuencia nucleotídica del segundo intrón en el extremo 5' .....	46
Discusión de resultados .....	46
Alelos mutantes de <i>amfos</i> .....	46
Interacción <i>amfos-kay</i> .....	48
Conclusiones.....	49
Función(es) de <i>amfos</i> .....	50
Perspectivas.....	51
Referencias.....	51

# Introducción

## El gen *amigo de fos* (*amfos*)

El gen que se estudia en este trabajo se denomina por el laboratorio como *amigo de fos* (*amfos*), en la base de datos del genoma de *D. melanogaster*, a la fecha no hay reportes de datos experimentales respecto a su función en este organismo (Gramates et al., 2016). *fos* es un gen ampliamente estudiado en distintos procesos como el desarrollo y en patologías como el cáncer (Ríos-Barrera & Riesgo-Escovar, 2013). Existen ortólogos de *amfos* en otras especies, por lo que *amfos* es un gen conservado evolutivamente (Gramates et al., 2016). Este gen se está caracterizando en el laboratorio de genética de transducción de señales del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México por primera vez. El gen *amfos* interactúa con el gen *fos*, que en *Drosophila* se denomina *kayak* (*kay*) (Riesgo-Escovar, datos no publicados). Los alelos de falta de función de ambos genes comparten fenotipos letales embrionarios.

El primer alelo de *amfos*, se aisló durante una investigación que tenía como objetivo aislar alelos mutantes de genes del complejo Antennapedia. Usaron mutagénesis por saturación para obtener el número máximo de alelos mutantes de los genes de la zona, donde también se encuentra *amfos*. El alelo *Thar<sup>1</sup>* se describió como una inversión entre *thickened arista* y *Antennapedia*, pero en esa época no se tenía conocimiento del gen analizado en este trabajo. *Thar<sup>2</sup>* fue aislado durante la misma mutagénesis y no complementa con *Thar<sup>1</sup>*, lo que sugiere que son alelos del mismo gen, aunque *Thar<sup>2</sup>* no tiene el fenotipo de arista engrosada de *Thar<sup>1</sup>* (Lewis, Kaufman, Denell, & Tollerico, 1980).

Un nuevo alelo de *amfos* fue aislado independientemente en otro experimento de mutagénesis, y se le denominó *I(3)7E103+21*. En esta mutagénesis se aislaron la mayoría de los genes implicados en el desarrollo de *Drosophila*, de los cuales muchos están conservados entre invertebrados y vertebrados. En dicho trabajo también se mapeó el nuevo alelo de *amfos* a una región en el brazo derecho del cromosoma tres de la mosca de la fruta (Jürgens, Wieschaus, Nüsslein-Volhard, & Kluding, 1984).

Para mapear con más precisión los alelos de los genes de la zona de Antennapedia, el grupo de Kaufman realizó una segunda mutagénesis. En este caso, el mapeo se hizo mediante deficiencias. Se aislaron dos alelos mutantes de un gen que se denominó *malformed abdomen* (*mab*), *mab<sup>1</sup>* y *mab<sup>2</sup>*, con fenotipo letales (Cavener, Ottelson, & Kaufman, 1986). Trabajos previos en el laboratorio (Riesgo-Escovar, datos no publicados)

demonstraron, por falta de complementación, que los cinco alelos son alelos mutantes del mismo gen.

En 1998 se desarrolló una técnica para mapear genes mediante recombinación en machos de *D. melanogaster*. Esta técnica permite mapeos muy precisos del sitio físico de donde se encuentra un gen. Este método utiliza los transposones, llamados elementos P, usándolos como marcas para conocer el sitio de un locus (Chen, Chu, Harms, Gergen, & Strickland, 1998). En el laboratorio se usó recombinación en machos para conocer la posición del locus de *amfos* (Riesgo-Escovar, datos no publicados). Estos datos previos del proyecto han sido desarrollados por diferentes miembros del laboratorio y en este trabajo se analiza la naturaleza molecular de las lesiones que tienen los alelos de *amfos*, así como su interacción con *kayak* (Riesgo-Escovar, datos no publicados).

*kayak* (*kay*), el homólogo de los genes *fos* de vertebrados, es un gen que está implicado en diversos procesos como la inducción del endodermo (Bienz, 1997), la regulación de la morfogénesis de la línea germinal (Fan et al., 2016), la diferenciación de células gliales (Giesen et al., 2003), el cerrado dorsal (Jacinto, Woolner, & Martin, 2004) y el aumento en la invasividad de tumores malignos (Mundorf et al., 2015). Este gen codifica para un factor de transcripción, e interactúa físicamente con el factor de transcripción *Jun related antigen* (*Jra*, el homólogo en *Drosophila* de *Jun*) para formar el complejo AP-1 (Ríos-Barrera & Riesgo-Escovar, 2013).

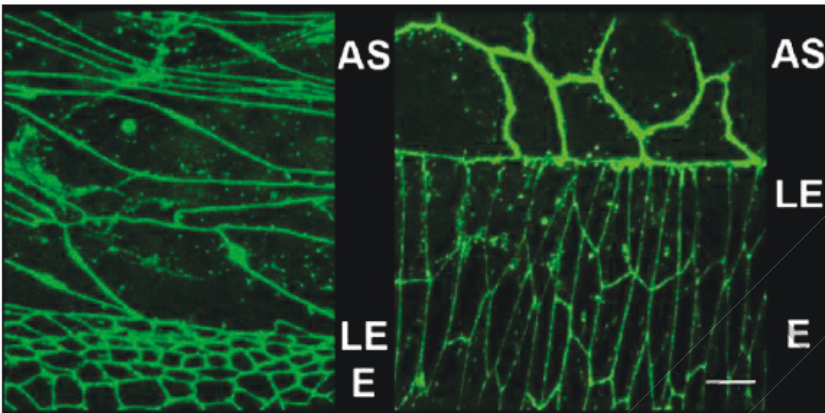
*amfos* y *kay* comparten el mismo fenotipo mutante letal embrionario, un fallo en el cierre de la región dorsal, lo cual se demuestra en este trabajo, así como otros fenotipos letales para el desarrollo. En el caso de *kay* existen estudios que demuestran este fenómeno, así como su interacción con otros genes de la vía de la cinasa de Jun durante la embriogénesis en *D. melanogaster* (Zeitlinger et al., 1997).

La vía de la cinasa de Jun dirige el correcto cerrado dorsal embrionario. Los alelos mutantes de genes que pertenecen a esta vía inducen un fenotipo letal de apertura dorsal (Riesgo-Escovar, Jenni, Fritz, & Hafen, 1996). De estos genes algunos están implicados en el cáncer al igual que *kay*, como es el caso de *Src42A* (Ma et al., 2013) y *Jun* (Vogt, 2001); otros como *Dcdc42* (Zeitlinger et al., 1997) se han estudiado por su participación como moduladores del citoesqueleto (Ricos, Harden, Sem, Lim, & Chia, 1999).

*amfos* y *kay* son un ejemplo de una interacción genética poco común denominada letalidad sintética, lo cual se demuestra con los resultados de este trabajo. Normalmente al realizar una cruce entre heterocigotos de diferentes genes, la descendencia es viable (complementan). En el caso de la letalidad sintética, esto no ocurre así, sino que el doble

mutante heterocigoto no es capaz de desarrollarse y muere (Nijman, 2011). Este fenómeno sugiere una interacción muy estrecha entre los genes que presentan dicha dinámica. Debido a la estrecha relación entre el cerrado dorsal y la vía de la cinasa de Jun, en este trabajo se analizó a detalle dicho fenómeno a nivel morfológico, genético y celular (Ríos-Barrera & Riesgo-Escovar, 2013).

## Cerrado dorsal embrionario, *amfos* y *kayak*



**Imagen 1. Cambios morfológicos durante el cerrado dorsal.** Al momento de la retracción de la banda germinal, las células de la amnioserosa están elongadas en su eje antero-posterior y las células del epitelio lateral se mantienen en su forma cuboidal. En el cerrado dorsal, las células que constituyen la amnioserosa tienen una morfología poligonal y las células del epitelio lateral se estiran en el eje dorso-ventral. As= amnioserosa, LE= células de la hilera guía, E= epitelio lateral. Modificado de Ríos-Barrera & Riesgo-Escovar, 2013

El cerrado dorsal es de los últimos eventos morfológicos del desarrollo de *D. melanogaster* (Jacinto et al., 2002). La banda germinal es una estructura embrionaria que se origina por convergencia y extensión en el mesodermo y el ectodermo, se alarga a la región posterior y

después se retrae a la zona ventral (Campos-Ortega & Hartenstein, 1985). Esto deja un hueco en la zona dorsal ocupado por la amnioserosa, que es un tejido extraembrionario que será eliminado posteriormente por histólisis (Reed, Wilk, Schöck, & Lipshitz, 2004).

En el cerrado dorsal, la vía de la cinasa de Jun está activa en las células de la hilera guía, a diferencia de la amnioserosa donde esta vía no está activa. Las células de la hilera guía, al inicio del cerrado dorsal, no acumulan actina en la región apical; posteriormente acumulan actina de manera apical y miosina no muscular y cambian de forma, alargándose en dirección dorsal, hacia la región ocupada por la amnioserosa. Las células de la amnioserosa pulsán activamente, lo que es crítico para que las células de la hilera guía y del epitelio lateral se estiren dorsalmente y reduzcan así la superficie en el área apical ocupada por la amnioserosa y terminen por cerrar al embrión dorsalmente (**Imagen 1**) (Noselli & Agnè, 1999; Pasakarnis, Frei, Caussinus, Affolter, & Brunner, 2016; Ríos-Barrera & Riesgo-Escovar, 2013).

# Antecedentes

## *Drosophila melanogaster* como modelo

Múltiples organismos han sido usados para modelar y elucidar procesos biológicos. Mendel utilizó el chícharo y descubrió los mecanismos generales de la herencia. *D. melanogaster* se convirtió en un organismo muy importante para el estudio de la genética cuando el laboratorio de T. H. Morgan introdujo y utilizó este organismo, pues cubría todas las cualidades que idealmente se buscan para realizar estudios genéticos. En general, se busca un organismo pequeño con un ciclo de vida corto que puede dejar una descendencia numerosa en un periodo breve (Beckingham, Armstrong, Texada, Munjaal, & Baker, 2005). En este organismo es sencillo diseñar esquemas de cruzas multigeneracionales. Para ello es necesario aislar una hembra virgen de menos de 8 horas (a 25°C) de haber emergido de la pupa (debido a que una vez fecundadas las hembras guardan espermatozoides en su espermateca por varios días) y dejarla aparearse con un macho del genotipo deseado, y con ello obtener la progenie requerida según sea el caso (Greenspan, 1997).

En *D. melanogaster* se han aislado muchos alelos mutantes de genes que se requieren para el desarrollo (Jürgens et al., 1984). Estos alelos mutantes afectan el desarrollo, generando estructuras alteradas en la mosca. Algunos de estos alelos se han utilizado para seleccionar la descendencia que los porta en un cierto cromosoma, pues generan fenotipos visibles, fácilmente identificables. Ejemplos clásicos de mutaciones usadas como marcadores son *yellow* y *white* en el cromosoma x, los cuales afectan el color del cuerpo y de los ojos, respectivamente. A estas mutaciones se les denomina "marcadores". También existen los alelos *Curly (Cy)* en el segundo cromosoma que afecta la forma de las alas y *Stubble (Sb)* en el tercer cromosoma, que afecta la forma de las quetas, (Greenspan, 1997). En algunas cruzas se colectan moscas que perdieron el marcador y poseen el cromosoma con la copia silvestre. La recombinación meiótica representa un problema pues la sinapsis entre homólogos y el entrecruzamiento de estos, puede causar la pérdida de la mutación de interés y no el marcador. Para eliminar este problema, los cromosomas con los marcadores poseen múltiples inversiones que impiden la sinapsis entre homólogos y evitan así la recombinación. A los cromosomas con múltiples inversiones y marcadores visibles se les denomina balanceadores. Además de lo anterior, poseen también mutaciones letales recesivas, que evitan que existan en condición homocigota (Hales, Korey, Larracuenta, & Roberts, 2015).



## Desarrollo temprano del embrión de *Drosophila melanogaster*

La fertilización en *D. melanogaster* ocurre dentro del oviducto por un espermatozoide que entra por el micrópilo (Hildreth & Lucchesi, 1963). Las primeras 13 divisiones de los núcleos del cigoto ocurren sin división celular y sin citocinesis, lo cual forma un sincicio transitorio en las primeras dos horas. Posteriormente, muchos componentes del citoplasma se segregan junto con la mayoría de los núcleos a la periferia del embrión; algunos permanecen en el centro, no se dividen y se vuelven poliploides, se denominan vitelofagos. Estos núcleos están en el centro del embrión, junto con las sustancias de reserva no celularizadas que constituyen la yema (Mahowald & Hardy, 1985).

Los núcleos que migran a la periferia se dividen cuatro veces sincrónicamente con un retraso durante la interfase (Foe & Alberts, 1983). Conforman dominios mitóticos de grupos de núcleos que se dividen sincrónicamente, pero a diferente tiempo de los otros grupos de núcleos, prefigurando futuros tejidos. Este periodo se conoce como blastodermo sincicial (Foe & Alberts, 1983; Mahowald, 1971).

Después de la treceava división nuclear ocurre la celularización. La membrana plasmática de entre los núcleos de la periferia se invagina y se extiende hasta el centro, hacia los vitelofagos. Interviene el citoesqueleto que rodea cada núcleo y se forman anillos contráctiles en la base de cada surco (Warn & Magrath, 1983; Warn, Magrath, & Webb, 1984).

Los surcos de escisión llegan por la zona dorsal de los vitelofagos y ventral a los núcleos periféricos (Mahowald, 1963). Durante una hora aproximadamente, cada célula blastodermal se conecta al sincicio de la yema en la región céntrica; aunque no se conoce la función de estas hebras, se piensa que su contracción ayuda a la gastrulación (Rickoll & Counce, 1980). Al final de la celularización la membrana plasmática se cierra por debajo de los núcleos periféricos y crea una capa de células en la periferia del embrión (Underwood, Caulton, Allis, & Mahowald, 1980).

Durante la celularización y antes de la gastrulación, de 5 a 10 núcleos se mueven a la zona posterior del embrión. En esta zona está el plasma polar y en la décima división estos núcleos se segregan como células polares. Estas células después se invaginan y migran hacia las gónadas, dando origen a la línea germinal (Underwood et al., 1980; Zalokar, 1976). Las células germinales se forman en el área posterior del embrión y necesitan de los

componentes del citoplasma de esta región para su diferenciación (Illmensee & Mahowald, 1974).

## Movimientos morfológicos en el embrión de *D. melanogaster*

### Gastrulación

La gastrulación resulta en la formación de las capas germinales del embrión. Requiere de la invaginación de un segmento de células en la región ventral media, las cuales formarán una estructura cilíndrica dentro del embrión, el mesodermo. El endodermo se conforma a partir de dos primordios distintos, el anterior que se invagina para formar la apertura y parte anterior del endodermo, y en la región más posterior la zona endodermal de tal área, así como el proctodeo (Campos-Ortega & Hartenstein, 1985).

En la primera fase de la gastrulación el surco ventral se invagina desde la región media de esta zona. Un grupo de células localizadas en el polo posterior se mueve en dirección antero-dorsal. Así se inicia la elongación de la banda germinal. La banda germinal se constituye de todas las metámeras (regiones segmentadas) del embrión. Las células que se movieron antero-dorsalmente, después se internalizan a continuación del surco ventral, y se forma la invaginación amnioproctodeal (Sonnenblick, 1950).

El siguiente evento de la gastrulación es la formación de un surco transversal estrecho a partir de la punta rostral de la invaginación ventral. Este surco forma el primordio endodermal del intestino medio anterior (Poulson, 1950)

La última fase de la gastrulación requiere de la reorientación de la invaginación amnioproctodeal. Este movimiento está acoplado a la elongación de la banda germinal; de esta manera el área del primordio posterior del intestino medio adquiere la forma de un saco (Poulson, 1950).

La región metamérica de *Drosophila* está constituida por tres primordios: los que formarán los segmentos de la cabeza, los que conformarán los segmentos del tórax y los que formarán los del abdomen. Cada segmento de la banda germinal comprende las células correspondientes al ectodermo y mesodermo. Estos primordios segmentales se dividen en miómero, neurómero y dermómero (Ede & Counce, 1955).

### Elongación de la banda germinal

En esta fase el ancho del primordio ectodermal disminuye y el largo aumenta. Esto ocasiona que la banda germinal se doble sobre su eje mientras se alarga y así se extiende sobre su

dorso. Como la extensión de la banda germinal se dirige a la zona dorsal, el área ventral y dorsal es aproximadamente equivalente (Rickoll & Counce, 1980).

Este proceso ocurre después de la formación del surco ventral y la fase inicial coincide con el movimiento de regiones que se acomodan durante la gastrulación (Ede & Counce, 1955).

Al inicio de la elongación de la banda germinal, la invaginación amnioproctodeal es un pequeño surco. Mientras la elongación acontece la punta de la invaginación amnioproctodeal empuja hacia adentro a las células circundantes al surco, lo cual ocasiona que estas cubran el surco amnioproctodeal (Sonnenblick, 1950).

La segmentación del embrión se hace evidente después de la elongación de la banda germinal. Una vez alargada, la banda germinal se acorta (Sonnenblick, 1950).

#### Acortamiento de la banda germinal

El acortamiento de la banda germinal es un movimiento que reestablece las porciones ventrales del embrión en la parte ventral y las dorsales arriba. La larva queda prefigurada en el embrión, el extremo caudal del intestino posterior se reorienta organizado como el patrón que quedará en la larva. Se fusiona el primordio anterior y posterior del intestino medio (Campos-Ortega & Hartenstein, 1997).

Cuando finaliza el acortamiento de la banda germinal, la parte dorsal del embrión está ocupada por las células de la amnioserosa que hacen contacto directo con la membrana vitelina y no con células epidermales. Las células de la amnioserosa son extraembrionarias, estas serán eliminadas del embrión por apoptosis e histólisis. Durante este estadio los primordios epidermales se localizan en las zonas laterales y ventrales. El acortamiento de la banda germinal deja un hueco en la zona dorsal que deberá cerrarse en la siguiente etapa del desarrollo (Schöck & Perrimon, 2002).

#### Cerrado Dorsal e Involución de la Cabeza

Para que el cerrado del hueco dorsal (recubierto por la amnioserosa) ocurra, la epidermis de las zonas laterales debe extenderse hacia la región media dorsal. En el dorso los dos epitelios opuestos se encuentran y se fusionan al tiempo que cubren la amnioserosa, la cual será eliminada del embrión. Al momento en que se acorta la banda germinal los movimientos que inducen la involución de la cabeza comienzan. Después de estos dos grandes acomodados en los segmentos embrionarios, a grandes rasgos, la morfogénesis del embrión de la mosca de la fruta está completa (Campos-Ortega & Hartenstein, 1997).

## Control genético del desarrollo

En *Drosophila* los ejes corporales se originan a partir de la polaridad del ovocito en desarrollo. En el ovario una célula germinal se divide y forma un cisto, que consiste de 16 núcleos interconectados que comparten un mismo citoplasma por medio de canales anillados, que son uniones citoplásmicas sostenidas por el citoesqueleto. Uno se diferencia como núcleo del ovocito y los demás forman las células nodrizas, que dan soporte al ovocito. Alrededor se encuentran las células somáticas foliculares. Esta línea somática en conjunto con la línea germinal comprenden el folículo (Mahowald & Hardy, 1985).

El folículo dicta la polaridad del ovocito antes de la fertilización. A la mitad de la ovogénesis, el ovocito está en la parte posterior del folículo, el núcleo de esta célula se encuentra también en la porción posterior en ese momento (Spradling, 1993). Tal acomodo espacial define las interacciones moleculares que preestablecen la polaridad en el ovocito (González-Reyes et al, 1995).

El núcleo del ovocito futuro transcribe y traduce Gurken, después lo inserta en la membrana plasmática aledaña al mismo (Neuman-Silberberg & Schüpbach, 1993), donde interactúa con el receptor de las membranas plasmáticas de las células foliculares aledañas. Esto les induce un destino de células foliculares posteriores a estas células. Las células foliculares que recibieron la señal que dicta el destino posterior mandan de regreso al ovocito una señal aún desconocida mediada por una cinasa lipídica que recluta a Par-1 (Price, Clifford, & Schüpbach, 1989), la evidencia más actual de su actividad involucra a la proteína 14-3-3, la cual comparte los mismos fenotipos mutantes y que además se une a Par-1 (Benton, Palacios, & Johnston, 2002). Par-1 organiza los microtúbulos del ovocito con el extremo (-) en la región anterior y el extremo (+) en la zona posterior (González-Reyes et al, 1995).

La orientación de los microtubulos es crucial, pues distintas proteínas motoras llevan diferentes mRNAs o proteínas en diversas direcciones. Las proteínas Kinesinas y Dineínas son motores que se mueven al extremo (+) y al extremo (-) de los microtúbulos, respectivamente. El mRNA *oskar* es transportado por una Kinesina a la región posterior (Zimyanin et al., 2008). *oskar* solo se traduce si llega al polo posterior. En su forma proteica, Oskar recluta a más Par-1 en la región posterior, lo cual estabiliza la orientación de los microtúbulos (Doerflinger, Benton, Torres, Zwart, & St Johnston, 2006).

## Eje antero-posterior

### *Los genes de efecto materno establecen el eje antero posterior*

Existen dos centros organizadores, uno de la región anterior y otro en la posterior. El ARN mensajero de bicoid y el de nanos se traducen dónde están, y sus productos proteicos se encargan de dictar el destino de la zona anterior y posterior, respectivamente. Estos mensajeros son transportados desde las células nodrizas al ovocito, donde se traducen posterior a la fertilización, para desempeñar sus tareas morfogénicas (Lehmann & Nüsslein-Volhard, 1991).

### *Bicoid y el eje anterior*

El mensajero de *bicoid* es un gen sintetizado en las células nodriza y es transportado al ovocito. Cuando la fertilización ocurre, bicoid se traduce y la proteína establece un gradiente de concentración. La concentración es mayor en la parte anterior y disminuye hacia la región posterior. La pérdida de función de este gen induce que las estructuras anteriores no se desarrollen (tórax, cabeza y acron) y las mutantes poseen solo el abdomen y los segmentos terminales (Frohnhofer & Nüsslein-Volhard, 1986). La expresión ectópica de *bicoid* en otras regiones es suficiente para desarrollar estructuras anteriores ectópicas (Berleth et al., 1988; Driever & Nüsslein-Volhard, 1988).

La localización de *bicoid* en la región anterior depende de su extremo 3' UTR (Ferrandon, Koch, Westhof, & Nu, 1997). Esta secuencia interactúa con Exuperantia y Swallow, mientras se encuentra en el folículo (Ferrandon et al., 1997; Schnorrer, Bohmann, & Nusslein-Volhard, 2000). El complejo Exuperantia-*bicoid* es transportado de las células nodriza al ovocito por una Kinesina, (Arn, Cha, Theurkauf, & Macdonald, 2003) y una vez dentro del ovocito, queda anclado a una Dineína al extremo (-) de los microtúbulos en la región anterior (Cha, Koppetsch, & Theurkauf, 2001).

### Nanos y el eje posterior

El gen de efecto materno *nanos* es transportado al ovocito, posterior a la fertilización. Este gen establece las señales necesarias para el desarrollo de las estructuras de la zona posterior, lo cual le convierte en el centro organizador de dicha región (Lehmann & Nüsslein-Volhard, 1991). La localización de este mensajero y su regulación transcripcional involucra a los genes *oskar*, *staufer*, *vasa*, *valois* y *tudor* por medio del 3'UTR de *nanos* (Gavis & Lehmann, 1992; Ruth Lehmann & Nüsslein-Volhard, 1986). La "trampa" especializada para

que *nanos* quede en la región posterior es la proteína Oskar (Ephrussi, Dickinson, & Lehmann, 1991).

El mRNA *oskar* y la proteína Staufén se transportan al polo posterior por una Kinesina donde se unen a los microfilamentos de actina. Staufén permite la traducción de *oskar* en la región posterior y la proteína se une a secuencias del segmento 3'UTR de *nanos* (Brendza et al., 2000; Hachet & Ephrussi, 2004).

El mensajero de *nanos* se difunde a través del ovocito y queda anclado a través de su 3'UTR al inhibidor traduccional Smaug (Forrest, Clark, Jain, & Gavis, 2004; Nelson, Leidal, & Smibert, 2004). Este recluta a la proteína CUP, que previene la unión del mRNA *nanos* a la maquinaria ribosomal. Si Oskar se une al complejo *nanos*-Smaug-Cup, entonces induce la liberación de CUP y *nanos* puede traducirse en la región posterior (Forrest et al., 2004; Nelson et al., 2004).

Los genes de efecto materno en la región posterior del ovocito son esenciales para la embriogénesis pues especifican el destino de las células que formarán el abdomen y la línea germinal. Las células polares que originan la línea germinal provienen del polo posterior. Es necesario remarcar que Oskar, Vasa y Nanos son miembros importantes del plasma germinal (Saffman & Lasko, 1999).

Es importante mencionar que las proteínas Bicoid y Nanos no están ancladas al citoesqueleto y por ello difunden libremente por el citoplasma, de esta manera se generan dos gradientes opuestos entre la región anterior y la posterior. Los modelos matemáticos indican que el gradiente se forma por la difusión libre de estas proteínas, así como por medio de su degradación (Little, Tkačik, Kneeland, Wieschaus, & Gregor, 2011).

#### *Inhibidores Transcripcionales específicos y sus gradientes*

Existen otros dos genes de efecto materno para establecer el eje antero-posterior, estos son *hunchback* y *caudal*. Son sintetizados en las células nodrizas y transportados al ovocito, donde se distribuyen en todo el citoplasma (Fujioka, Emi-Sarker, Yusibova, Goto, & Jaynes, 1999). Para que pueden desempeñar su función en gradientes, la traducción de *hunchback* y *caudal* es inhibida por Nanos y Bicoid, respectivamente (Rivera-Pomar & Jäckle, 1996).

En la región anterior Bicoid inhibe la traducción de *caudal*, se une a su extremo 3' UTR y recluta a Bin3, un estabilizador de un complejo que impide la unión del extremo 5' UTR de *caudal* a los ribosomas (Rivera-Pomar & Jäckle, 1996). Si *caudal* se expresa en la región anterior, entonces la formación de la cabeza y el tórax se altera (Mlodzik, Gibson, & Gehring, 1990). En la zona posterior donde la proteína Caudal se traduce, induce la transcripción de



genes cigóticos como *knirps* y *giant* que son críticos para el desarrollo del abdomen (Rivera-Pomar et al., 1995).

Nanos en la zona posterior del embrión, donde su concentración es mayor, forma un complejo con Pumilio, una ribonucleoproteína (Murata & Wharton, 1995). En conjunto con Brat y d4EHP, el complejo se une al 3' UTR de *hunchback* e inhiben su traducción (Cho et al., 2006).

Bicoid es un factor de transcripción muy conservado (Berleth et al., 1988). Activa la expresión cigótica de *hunchback*, *buttonhead*, *orthodenticle* y *empty spiracles*, se requieren para el desarrollo de cabeza y tórax (Casanova & Struhl, 1989; Cohen & Jürgens, 1990; Driever & Nüsslein-Volhard, 1988; Finkelstein & Perrimon, 1990; Gao & Finkelstein, 1998; Grossniklaus, Cadigan, & Gehring, 1994). La regulación de Bicoid sobre *hunchback* ayuda a establecer un gradiente de la proteína Hunchback en la porción anterior. Estas dos proteínas trabajan de manera conjunta para organizar la expresión de genes involucrados en las estructuras anteriores (Simpson-Brose, Treisman, & Desplan, 1994).

#### Establecimiento del eje dorsal-ventral

Debido a la polarización de los microtubulos en el ovocito, el núcleo de este es empujado a la zona anterior dorsal (Zhao, Graham, Raposo, & St Johnston, 2012). El mensajero de *gurken* se localiza entre el núcleo del ovocito y la membrana plasmática y su forma proteica establece un gradiente dorsal-ventral en el eje anterior-posterior a lo largo del área dorsal (Neuman-Silberberg & Schüpbach, 1993). La difusión de Gurken es muy corta, por ello solo interactúa con las células foliculares más cercanas al núcleo de ovocito, a las cuales les induce a diferenciarse como células foliculares dorsales. De esta manera se establece el eje dorsal-ventral en las células foliculares que rodean al ovocito (Montell, Keshishian, & Spradling, 1991).

La misma interacción entre Gurken y Torpedo que induce un destino dorsal a las células foliculares, preestablece en el embrión el eje dorsal-ventral, por medio de la activación de diversos genes. Después de la interacción de Gurken con su receptor Torpedo, este activa al factor de transcripción Mirror que inhibe la expresión de *pipe* en la región dorsal (Andreu et al., 2012), de manera que dicho gen solo se encuentra en las células foliculares ventrales (Sen, Goltz, Stevens, & Stein, 1998).

Pipe sulfata las proteínas de la membrana vitelina, incluyendo a la proteína Gastrulation-defective. Pipe se une a dichas proteínas sólo en la región ventral y así recluta al complejo que escinde a Easter y lo deja en su forma activa, lo cual ocurre en la región perivitelina

(Stein & Stevens, 2014). La interacción anteriormente descrita permite que Easter desempeñe su función de proteasa y corte a Spätzle (Chasan, Jin, & Anderson, 1992). Toll es el receptor de Spätzle. Este receptor está distribuido por todo el ovocito, pero sólo se activa en la zona ventral donde se difunde su ligando Spätzle (Hashimoto, Hudson, & Anderson, 1988).

Debido a que Spätzle se encuentra solo en la región ventral, la señalización de su receptor Toll, solo estará activa en esta región. La cascada de señalización de Toll induce que la proteína denominada como Dorsal pueda entrar solo a los núcleos en las zonas ventrales y así se termine de establecer el eje dorsal-ventral en el embrión (Stein & Stevens, 2014). El mRNA *dorsal* es transportado por las células nodriza al ovocito y su transcripción comienza 90 minutos después de la fertilización (Steward, Ambrosio, & Schedl, 1985; Steward, 1989). Dorsal está distribuido por todo el embrión durante la etapa de blastodermo sincitial, pero sólo se internaliza en los núcleos ventrales, porque normalmente está secuestrado en el citoplasma por Cactus. La vía de Dorsal, cuando se activa por la unión de Spätzle a Toll, provoca que Cactus se fosforile por la cinasa Pelle y se degrade en el proteosoma, liberando a Dorsal. Una vez en el núcleo, Dorsal regula genes para el desarrollo del mesodermo y del ectodermo ventral (Galindo, Edwards, Gillespie, & Wasserman, 1995; Kidd, 1992; Roth, Stein, & Nüsslein-Volhard, 1989; Rushlow, Han, Manley, & Levine, 1989). Dorsal es responsable de activar genes involucrados en la formación del mesodermo ventral como *snail* y *twist* (Stein & Stevens, 2014).

El epitelio lateral y la amnioserosa están originalmente diferenciados por la señal antineuronal del morfógeno *dpp*. Los niveles del área más dorsal del embrión que dará origen a la amnioserosa poseen mayor expresión de *dpp* en comparación a la región de la epidermis lateral (Stronach & Perrimon, 2001). La amnioserosa expresa, además, los genes *zerknüllt* (*zen*) y *related to angiotensin converting enzyme* (*race*) (Ríos-Barrera & Riesgo-Escovar, 2013)

### Segmentación en el embrión de la mosca

Los genes cigóticos controlan el cambio del estadio sincitial al plano corporal segmentado. En el citoplasma del sincicio existen microambientes muy variados por los genes de efecto materno y sus dianas moleculares. Los genes de efecto materno inducen la expresión cigótica de los genes *gap*, son factores de transcripción que regulan la expresión de los genes de regla de pares que organizan los parasegmentos del embrión (Jaeger, 2011).



Los genes de regla de pares median la expresión de los genes de polaridad de segmentos, y estos últimos mantienen el patrón de los parasegmentos mediante señalización yuxtácrina que dicta el destino celular que define el límite de los parasegmentos. El proceso final en la segmentación requiere los genes gap y los de regla de pares para regular los genes homeóticos, que dictan el destino individual de cada segmento (Harding, Hoey, Warrior, & Levine, 1989).

## Cerrado dorsal en *Drosophila melanogaster*

### Generalidades

El cerrado dorsal es de los últimos eventos que ocurren durante la embriogénesis de *D. melanogaster*. En este proceso se cierra el embrión dorsalmente, el epitelio lateral se estira y cubre la sección dorsal ocupada por la amnioserosa (tejido extraembrionario). El segmento dorsal sin epidermis es producto de la retracción de la banda germinal (Jacinto et al., 2004). Para cerrar este espacio en la región dorsal las células aledañas se alargan y cubren esta región. Esto ocurre sin ninguna división celular. De esta manera la amnioserosa dorsal queda cubierta por las células epiteliales y muere (Payre, 2004).

El cerrado dorsal comparte mecanismos con el cerrado del tubo neural y la palatogénesis (Jacinto et al., 2004), así como el cerrado del corazón y la epibolia en vertebrados. Aunque los fenómenos mencionados no ocurren en la misma región ni al mismo tiempo comparten diversos elementos como las vías de señalización, la región epitelial aledaña migra o se reorienta, y se origina un tejido continuo (Kiehart et al., 2017).

El cerrado dorsal es un proceso tipo “bolsa de jarreteras” que requiere de la participación y reorganización del citoesqueleto de actina-miosina (Jacinto et al., 2002). El fenotipo causado por el fallo de este fenómeno da lugar a una apertura en la región dorsal. Este fenotipo embrionario letal de apertura dorsal ha servido para identificar diferentes genes que participan en dicho proceso, como los de la vía de *decapentaplegic (dpp)* y los de la vía de la cinasa de Jun (JNK). La vía JNK activa la expresión de diversos genes mediante el complejo Fos/Jun (AP-1) o Kayak(Kay)/Jun related antigen(Jra) en la mosca (Noselli & Agné, 1999).

La señalización controla dos grandes eventos morfológicos en el cerrado dorsal. Durante el primero, las dos capas laterales de células epiteliales cambian de forma, se estiran dorsalmente de manera que convergen, y en el segundo se conectan los extremos

anteriores y posteriores. Este último proceso se conoce como cierre (Jankovics & Brunner, 2006).

La convergencia epitelial requiere de la constricción apical de las células de la amnioserosa, porque genera la fuerza necesaria para conjuntar las células epidermales hacia la línea media. Mientras esto ocurre las células epiteliales cambian su forma y se elongan en su eje dorso/ventral (Kiehart et al., 2000).

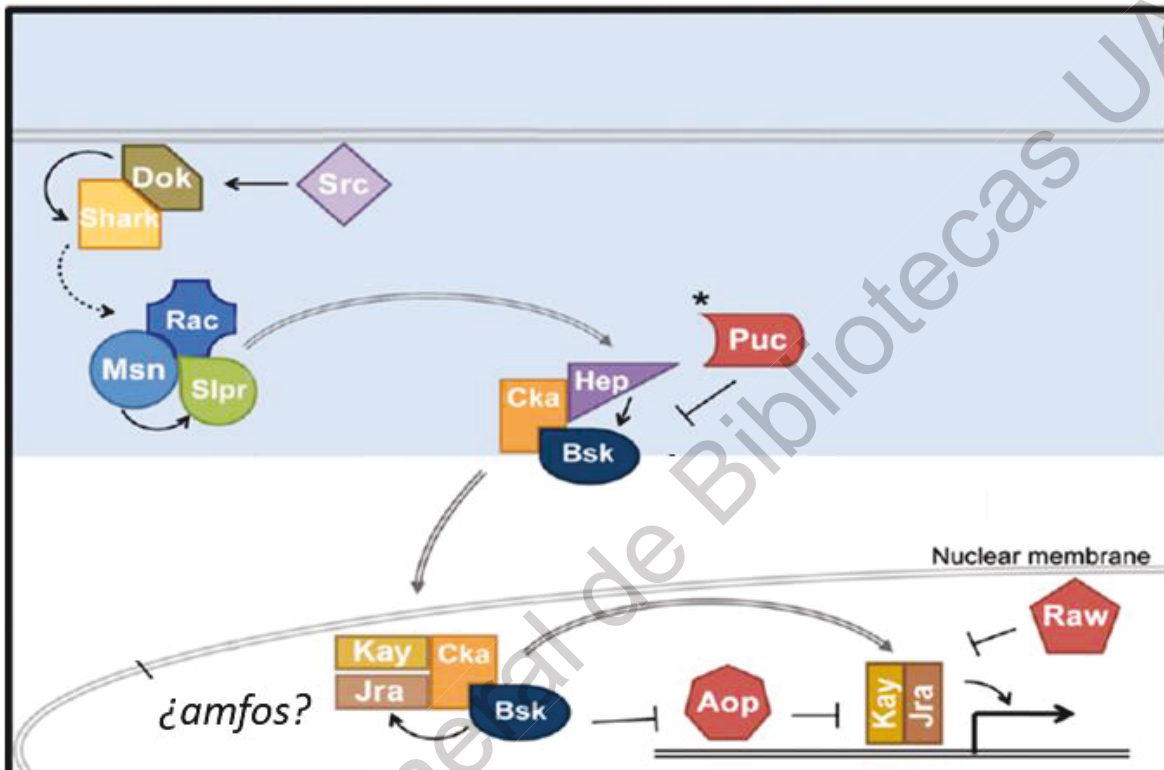
Las células del epitelio lateral que se encuentran en la fila más dorsal a cada lado del embrión se denominan hilera guía. Estas células se polarizan paralelamente al eje dorsal/ventral, y excluyen el complejo de proteínas encargadas de la adhesión célula-célula, acumulando actina y miosina II en la región más dorsal (Kaltschmidt et al., 2002). La formación de filopodios ayuda al cierre en la región más dorsal de las membranas. Estas estructuras permiten el contacto inicial entre las capas epiteliales (Jankovics & Brunner, 2006).

#### Vía JNK en el cerrado dorsal

Diversas fuerzas mecánicas están involucradas en el cerrado dorsal como los microtubulos, el cable supracelular de actina y la pulsión de la amnioserosa (ver abajo) (Noselli & Agné, 1999). El centro de señalización responsable de coordinar estos eventos se encuentra en la hilera guía, orquestado por la vía de la cinasa de Jun (JNK). Basket (*Bsk*) es el homólogo de JNK en *Drosophila* y Jra es el homólogo en *Drosophila* de Jun. La vía de la cinasa de Jun se activa solo en la hilera guía antes del cerrado dorsal. Decapentaplegic (*Dpp*) se secreta de la hilera guía y se difunde para coordinar el cambio de forma celular durante el cerrado dorsal en otras células (García-Fernández, Martínez-Arias, & Jacinto, 2007; Glise & Noselli, 1997b; Riesgo-Escovar & Hafen, 1997).

La diferenciación de la hilera guía del epitelio lateral es clave para el cerrado dorsal, pues están en contacto con la amnioserosa y son el centro de actividad de la vía JNK, aunque la diferenciación ocurre en los estadios tempranos en la embriogénesis y el cerrado dorsal es de las últimas etapas (Noselli, 1998). Esta vía tiene funciones conservadas, en *D. melanogaster* se requiere para el cerrado dorsal, cerrado del tórax, desarrollo de las células foliculares y la rotación de las células del disco genital en machos (Ríos-Barrera & Riesgo-Escovar, 2013).

Es importante resaltar que hasta la fecha no se ha podido identificar al receptor ni al ligando responsable de activar a Bsk en el cerrado dorsal. Los componentes más arriba de la vía identificados, son genes que codifican para proteínas con actividad de tirosin cinasa citoplasmica de la familia Src: Src42A, Src64B y Btk29A. A pesar de que la perdida de función de uno de estos genes, no inducen fenotipo de apertura dorsal, cuando se hacen



**Imagen 2. Actividad de la vía JNK en el cerrado dorsal.** No se conoce el ligando que activa la vía durante el cerrado dorsal. Src es el componente más arriba de la vía identificado, fosforila a Dok y este recluta a Shark. Misshapen (Msn) es una cinasa MAP4k, activa por fosforilación a Slipper (Slpr), una cinasa MAP3K que forma un complejo con Rac. Slpr se une a Msn y Rac, este complejo es necesario para la correcta actividad de Slpr. Hemipterous (Hep) es una cinasa de tipo MAP2K, fosforila a Basket (Bsk). Conector de cinasa a AP-1 (Cka) ayuda a formar el complejo Hep/Bsk y Jra (el homólogo de Jun en Drosophila). Bsk fosforila a Jra, esto induce su unión con Kayak (Kay), Bsk fosforila al represor Anterior Open e índice que se desacople del DNA, así Jra/Kay activan la transcripción de genes como Decapentaplegic (Dpp) y Puckered (Puc) un regulador negativo de la vía.

Modificado de Ríos-Barrera & Riesgo-Escovar, 2013

combinaciones de dobles mutantes ó triples mutantes los embriones si muestran dicho fenotipo letal (Ríos-Barrera & Riesgo-Escovar, 2013) (Imagen 2).

Shark es una tirosin cinasa citoplasmica que participa en la señalización de Bsk. Al eliminar la contribución materna de esta, se induce un fenotipo de apertura dorsal en los embriones (Fernandez et al., 2000). Esta enzima posee un dominio SH2, es capaz de interactuar con el adaptador Dok y los alelos nulos de este último gen también inducen el mismo fenotipo. Se puede hacer el rescate de la condición letal de Dok mediante la sobreexpresión de *shark*. En cambio Src42 no es capaz de rescatar los alelos nulos de Dok. Por ello se propone que Src42 fosforila a Dok y Dok recluta a Shark (Biswas, Stein, & Stanley, 2005). La familia proteica Rac está implicada también en la señalización JNK como activadores de esta. Esto se estudió primeramente mediante la expresión ectópica de formas activas de algunos de los componentes de dicha familia. Drac1V12 y Dcdc42V12 son capaces de activar ectópicamente la expresión de *puckered* y *dpp* (Glise & Noselli, 1997a). En particular, las proteínas Rac en la mosca, cuando mutadas, presentan fenotipos de apertura dorsal (Ríos-Barrera & Riesgo-Escovar, 2013).

Slipper (Slpr) es una cinasa tipo MAP3K, de la familia MLK (Cinasa de linaje mixto), se une a Rac1 y Misshapen (Msn), los alelos nulos de esta última proteína producen un fenotipo de apertura dorsal y codifica para una cinasa MAP4K de la familia Ste20 (Sterile-20) (Su, Treisman, & Skolnik, 1998). En vertebrados, DOC180 es una GTPasa de proteínas tipo Rac, y contiene un sitio SH3. DOC180 moldea la morfología celular (Kiyokawa et al., 1998; Wu & Horvitz, 1998). *myoblast city* (*mbc*) es el homólogo en *Drosophila* de DOC180. Las mutantes tienen fenotipo de apertura dorsal. Los embriones con esta mutación tienen una forma más redondeada y expresan de manera anormal la Fasciclina III (Erickson, Galletta, & Abmayr, 1997). Los mutantes acumulan menos actina filamentosa, en comparación con los silvestres. El cambio observado en el citoesqueleto, está mediado por Drac1, pues *mbc* es capaz de suprimir los defectos en las mutantes de Drac1. Al afectar la activación de la vía de JNK, la expresión de *dpp* inducida por la vía JNK es menor en los mutantes (Nolan et al., 1998).

Slpr se une al extremo C-terminal de Msn a través de la región central de Slpr, que consta de un dominio con zipper de leucina y un sitio CRIB que ayuda en dicha interacción (Garlana, Gonda, Green, Pileggi, & Stronach, 2010). Las mutantes de *slpr* se aislaron en tamizajes genéticos en busca de genes de efecto materno (Chou & Perrimon, 1996); sus alelos hipomorfos tienen defectos en el cerrado del tórax y fallos en la rotación de los genitales masculinos (Polaski, Whitney, Barker, & Stronach, 2006; Beth Stronach & Perrimon, 2002) (**Imagen 2**).

Slpr requiere de Rac1 y Msn para su actividad. Debido a que Rac1, Rac2 y Mtl son redundantes genéticamente, la interacción con Slpr es similar. Probablemente Msn fosforila a Slpr, de esta manera lo activa. Mediante experimentos genéticos de epistasis se determinó que Msn actúa antes de Hemipterous (Hep) (Su et al., 1998). Mediante un ensayo de dos híbridos, fue posible comprobar la interacción física entre Misshapen y el factor asociado al receptor TNF de *Drosophila*, lo cual abre la posibilidad de la interacción entre el receptor TNF y la vía JNK en el cerrado dorsal (Su et al., 1998).

Hemipterous (Hep) media la señalización entre Slpr -una MAP3K- y la activación de Bsk. Hep fue el primer componente de la vía que se demostró en participar en el cerrado dorsal (Glise, Bourbon, & Noselli, 1995). Hep es una MAP2K y es homólogo al MKK7 de mamíferos. Mediante experimentos de epistasis fue posible deducir su participación por debajo de Rac1. Alelos nulos de *hep* no expresan los genes de respuesta de *bsk*. Se ha propuesto que Hep fosforila a Bsk en un motivo TPY y así la activa (Martín-Blanco, Pastor-Pareja, & García-Bellido, 2000; Zeitlinger & Bohmann, 1999) (**Imagen 2**).

Los alelos nulos de *basket* (*bsk*) son letales para el desarrollo embrionario debido a un fallo en el cerrado dorsal (Riesgo-Escovar et al., 1996). Los primeros alelos de este gen se aislaron en la célebre mutagénesis dirigida por Wieschaus y Nüsslein-Volhard, en la cual buscaban mutantes letales para el desarrollo embrionario (Ephrussi & St. Johnston, 2004). Bsk en su forma activa fosforila a Jra en residuos de serina y treonina en el extremo N terminal. Este gen es el homólogo en *Drosophila* de Jun, y codifica un factor de transcripción. Cuando Jra es fosforilado por Bsk, su forma activa es capaz de interactuar con el factor de transcripción Kayak (Kay). De esta manera se forma el complejo AP-1. Ambos factores poseen un dominio de interacción proteína-proteína de zipper de leucina (Bogoyevitch & Kobe, 2006) (**Imagen 2**). Las versiones mutantes de falta de función de los factores de transcripción Kay y Jra poseen el fenotipo de apertura dorsal. Kay tiene contribución materna, además de su función en el correcto cerrado dorsal, está implicado en la ovogénesis y en la especificación del endodermo (Riesgo-Escovar & Hafen, 1997)

Cka (Conector de cinasa a AP-1) es una proteína de andamio que probablemente ayuda a la formación de un complejo entre Hep, Bsk y Jra/Kay. Se desconoce el mecanismo preciso de como ocurre esto, pues Hep se encuentra en el citoplasma y Jra en el núcleo, mientras que la localización de Kay fluctúa entre dichas regiones celulares (Kockel et al., 1997). Al eliminar la contribución materna de Cka, los embriones no completan su desarrollo debido a que muestran un fenotipo de apertura dorsal y las mutantes cigóticas de este gen mueren como pupas (Chen et al., 2002).



Entre los blancos transcripcionales del complejo AP-1 se encuentra *decapentaplegic (dpp)*, el cual es secretado de la hilera guía e induce a la amnioserosa y a la epidermis lateral a que cambien de forma (García-Fernández et al., 2007). Se cree que esto genera la formación de un gradiente ventral en el epitelio lateral, que induce cambios en la forma celular. De esta manera se lleva el mensaje a todo el epitelio lateral (Riesgo-escovar & Hafen, 1997).

Otro gen de respuesta de la vía Jnk es la fosfatasa *puckered (puc)*. El nombre proviene del fenotipo mutante: los embriones mueren con una pequeña línea fruncida con pequeñas aperturas en la línea dorsal media. *puc* es un regulador negativo de la vía (Glise & Noselli, 1997a; Martínez-Arias & Lawrence, 1985). El gen codifica para una fosfatasa de la familia PP2. Cuando se sobre expresa este gen, también se observa un fenotipo de apertura dorsal (Martín-Blanco et al., 1997).

Las células líderes están marcadas por la expresión de *puc* y *dpp*. Cuando alguno de los componentes positivos de la vía es eliminado, se pierde la expresión de estos marcadores (Glise et al., 1995). La amnioserosa y la epidermis lateral son derivados del ectodermo. El cerrado dorsal también requiere de la participación del factor de transcripción dominio ETS Anterior abierto (Aop) (Riesgo-Escovar & Hafen, 1997), es un regulador negativo durante este proceso y su sobreexpresión produce fallas en el cerrado dorsal (Ríos-Barrera & Riesgo-Escovar, 2013).

### Citoesqueleto y Microtúbulos

El cerrado dorsal requiere de la participación del citoesqueleto, así como del cambio estructural en las células epiteliales (Martin & Parkhurst, 2004). Las células de la hilera guía forman un borde líder hacia la apertura dorsal. En estas células se acumula dorsalmente acto-miosina y se forma un cable, además de que existe una gran cantidad de actina en los lamelopodios y filopodios dorsales. Estas últimas estructuras median el contacto inicial entre las células opuestas de cada hilera guía (Woolner, Jacinto, & Martin, 2005).

El espacio intracelular en células que no están en división puede remodelarse por medio de los microtubulos. Los microtúbulos participan en el cerrado dorsal, pero sólo en las células epiteliales durante de la última etapa del cierre con lo cual se sella el espacio ocupado por la amnioserosa (Jacinto et al., 2004). Los microtubulos de estas células se reorganizan de manera inusual a su distribución espacial normal, formando arreglos antiparalelos en dirección dorsal-ventral. Este es un claro ejemplo de cómo se reorganizan dichos

componentes celulares de manera transitoria para realizar un proceso celular (Jankovics & Brunner, 2006).

Más específicamente, durante el cerrado dorsal la red de microtubulos se reajusta (Kaltschmidt et al., 2002). La hilera guía durante el inicio del cerrado dorsal posee una red irregular de microtubulos, y mientras avanza el proceso, estas estructuras se reorganizan y forman un conjunto acentrosomal que se alinea a lo largo del eje dorsal/ventral. Aunque el conglomerado de microtubulos es estable, estos se mantienen dinámicos en su nivel individual y en la hilera guía forman protuberancias celulares (Jankovics & Brunner, 2006). Los microtúbulos son prescindibles para el cambio de forma del epitelio, pero contribuyen activamente al final del proceso al cierre del hueco epitelial ocupado por la amnioserosa mediante dos mecanismos diferentes en dos pasos seguidos. Al inicio del cierre los microtubulos en la hilera guía regulan la dinámica de las protuberancias celulares, pues ayudan a impulsar el contacto inicial entre las células de esta hilera, y en una fase más tardía se contraen y se encuentran adosados mediante su extremo (+) a las adhesiones celulares recién formadas, donde probablemente brindan la fuerza necesaria para conjuntar las hileras de células opuestas (Eltsov et al., 2015).

Existen proteínas que coordinan la interacción entre actina y microtubulos. Entre estas destacan las Spectraplakins (Suozi, Wu, & Fuchs, 2012). En vertebrados existen dos, ACF7 y BPAG1, en *Drosophila* existe un gen homólogo llamado *short stop* (*shot*). En la hilera guía une a los microtubulos y a la red de actina, estabiliza estos últimos e induce una red estable. Además induce la formación de filopodios para el contacto inicial entre la hilera guía de las regiones opuestas para poder dar inicio al cierre durante el cerrado dorsal (Takács et al., 2017)

En vertebrados la familia de proteínas Rho contiene a un grupo de pequeñas GTP-asas, las cuales son capaces de regular el citoesqueleto de actina. En *Drosophila*, los homólogos de estas y la expresión de alelos dominantes negativos de estas como *Drac1*, *Dcdc42* o *DrhoA1* en la región del ectodermo inducen un fenotipo de apertura dorsal (Harden et al., 1995; Harden et al., 1999; Riesgo-Escovar et al., 1996).

Las proteínas *Drac1*, *Dcdc42* y *DrhoA* se encuentran de manera diferencial en la hilera guía. Esto se comprobó mediante isoformas dominantes negativas, como *DracN17*, la cual irrumpe el ensamble de la actina y la miosina de manera más marcada que *Dcdc42N17* (Harden et al., 1999).

## Filopodios

Estudios como el de Jacinto et al., 2000, que utilizan estudios de imagenología en vivo, revelan la formación de filopodios que se proyectan dorsalmente a partir de la membrana apical de las células de la hilera líder durante el cerrado dorsal. Cuando los filopodios de las dos capas epiteliales se tocan y conjuntan, esto inicia la interdigitación durante el cierre. Los filopodios pueden ser eliminados del cerrado dorsal mediante la expresión de un alelo mutante dominante negativo de Cdc42 que conlleva a un fallo en la fusión del epitelio (Jacinto et al., 2000). La fusión epitelial es precisa si las láminas de fusión están bien segmentadas.

## Proteínas de membrana

Los cambios que ocurren a nivel membranal y en el citoesqueleto durante el cerrado dorsal requieren de proteínas efectoras como Cno (Cno) y ZO-1, las cuales poseen un dominio PDZ. Este dominio les ayuda a formar complejos en la membrana (Craven & Brecht, 1998; Miyamoto et al., 2007; Takahashi et al., 2002). Cno y ZO-1 interactúan bioquímicamente y genéticamente (Choi et al., 2011). En homocigocis *cno* y en dobles homocigotos *cno* y *polychaetoid* (gen que codifica para ZO-1), muestran un fenotipo claro de apertura dorsal (Takahashi et al., 2002).

Las uniones septadas en insectos son equivalentes a las uniones estrechas en las células epiteliales de vertebrados. Hay tres genes en *Drosophila* que se encargan de mantener estas estructuras: *disc large* (Perrimon, 1988), *coracle* (Fehon, Dawson, & Artavanis-Tsakonas, 1994) (Lamb, Ward, Schweizer, & Fehon, 1998) y *neurexina 4* (Baumgartner et al., 1996). Mutaciones en estos tres genes causan un fallo en el cerrado dorsal. *discs large* y *neurexina 4* son necesarios para la correcta localización de *coracle* (Hough, Woods, Park, & Bryant, 1997; Lamb et al., 1998).

## **Justificación**

El desarrollo en el modelo genético de *Drosophila melanogaster* comparte diversos fenómenos conservados con otros organismos, por ello es un buen modelo para entender procesos compartidos entre especies. *kayak* es un gen involucrado en distintos procesos del desarrollo y por su estrecha relación con *amfos* hace de este segundo gen un excelente candidato para entender cómo *kayak* desempeña sus tareas morfogénicas



# Hipótesis

*amfos* y *kayak* presentan los mismos fenotipos mutantes letales para el desarrollo embrionario, la interacción genética entre estos permite cuantificar la letalidad inducida por este fenómeno. La secuenciación de los alelos mutantes de *amfos* permite identificar las lesiones moleculares y esclarece los motivos estructurales que regulan la función de *amfos*

# Objetivos

General: Caracterizar y cuantificar los fenotipos embrionarios mutantes de *amfos*.

Específico 2: Comprobar y cuantificar la interacción genética entre *amfos* y *kay* mediante pruebas de complementación.

Específico 3: Caracterizar y cuantificar los fenotipos embrionarios mutantes de *amfos*.

Específico 4: Secuenciar el locus de *amfos* en los alelos mutantes y controles, para encontrar y describir las lesiones moleculares responsables de los fenotipos.

# Metodología

## Genética y cruzas de *amfos* y *kayak*

Se realizaron cruzas genéticas entre individuos o moscas que portan alelos de *amfos* y de *kayak* para analizar interacciones genéticas. Para esto se seleccionaron hembras vírgenes de genotipo *Thar<sup>1</sup>/Tm3, GFP* con machos *kay<sup>1</sup>/Tm3, GFP*. En una craza independiente se usaron hembras vírgenes del mismo genotipo con machos *kay<sup>2</sup>/Tm3, GFP*. Se utilizaron machos con diferentes alelos de *kay* para descartar que los resultados fueran alelo-específicos.

Además de cruzas con *Thar1*, también se realizaron cruzas con *l(3)7E103+21*. En este caso, se seleccionaron hembras vírgenes de *l(3)7E103+21/Tm3, GFP* con machos *kay<sup>1</sup>/Tm3,GFP* y con machos *kay<sup>2</sup>/Tm3*,

Además de estas cruzas, se usaron las mismas cepas de *amfos* y de *kay* para obtener embriones homocigotos mutantes para estudiar y cuantificar fenotipos embrionarios mutantes. Se usó como control la cepa *yellow, white (y,w)* porque los alelos mutantes de *kay* estudiados y uno de *amfos* (*l(3)7E103+21*) están en ese fondo mutante. Se

seleccionaron aquellos embriones que eran homocigotos, se podían distinguir fenotípicamente debido a que los parentales eran heterocigotos para los alelos de *amfos* y tenían también GFP en otro cromosoma, entonces los homocigotos para *amfos*, eran los embriones que no completaban su desarrollo embrionario y además no tenían GFP, para ello se separaron los embriones y se observaron al estereoscopio, el cual tiene adaptado una lámpara para fluorescencia.

## Preparación de cutículas

Con la finalidad de cuantificar el fenotipo de los alelos mutantes, los embriones se colocaron en medio de montaje para digerir los tejidos y observar las cutículas al microscopio. Se prepararon cutículas de embriones mutantes homocigotos de los alelos de *amfos* con los siguientes genotipos:

<i>I(3)7E103+21</i>	<i>Thar<sup>1</sup></i>	<i>Thar<sup>2</sup></i>
<i>Ki, mab<sup>1</sup></i>	<i>Ki, mab<sup>2</sup></i>	<i>I(3)7E103+21<sup>+/-</sup>, kay<sup>1+/-</sup></i>
<i>I(3)7E103+21<sup>+/-</sup>, kay<sup>2+/-</sup></i>	<i>Thar<sup>1+/-</sup>, kay<sup>1+/-</sup></i>	<i>Thar<sup>1+/-</sup>, kay<sup>2+/-</sup></i>

Los cuatro últimos genotipos fueron probados para analizar la interacción de *kay* con *amfos*. Se colocaron los embriones de los genotipos anteriores en cloro porcentaje 5%, durante 1 minuto para eliminar el corión. Después se enjuagaron con una solución de PBS con 0.3% Tritón. Se colocó en un portaobjetos y se añadió medio de montaje PVA que contiene ácido láctico, fenol y polivinil alcohol. Se dejan digerir durante dos días en una placa caliente para digerir los tejidos internos.

## Extracción de ADN

Se colectaron embriones mutantes homocigotos de los fenotipos:

*Thar<sup>2</sup>* 2) *Ki, mab<sup>2</sup>* 3) *I(3)7E103+21*. Para extraer el ADN se utilizó el protocolo con fenol-cloroformo como el agente principal para degradar proteínas y otros componentes celulares, descrito en (Sambrook, Fritsch, & Maniatis, 1989).

## Reacción en cadena de la polimerasa

De las extracciones de ADN con los genotipos específicos se realizó una amplificación por PCR de los alelos mutantes siguientes: *Thar<sup>2</sup>*; *Ki, mab<sup>2</sup>* y *I(3)7E103+21*. Se usaron los oligonucleótidos diseñados en el laboratorio de Genética de Transducción de Señales Foramfos, con Amfosnoti3, y Af1con Af3, con un amplicón esperado de 1200 bases

aproximadamente para cada par de primers. Para esta tarea se usó el kit de ThermoFisher Phire Tissue Direct PCR Master Mix, se siguieron las indicaciones de la casa comercial, el equipo utilizado para la reacción de PCR fue el miniPCR. La temperatura de alineamiento usada para el par de primers Foramfos- Amfosnoti3 fue de 64°C a 40 ciclos, con 1 minuto 20 segundos de extensión. En el caso del par de primers Af1-Af3, las condiciones fueron las mismas, con excepción de la temperatura de alineamiento fue de 55°C.

## Primers

Nombre	Secuencia
Foramfos	GACGAACAATGAGCCGACGTC
Amfosnoti3	GGCCGCTTTGCTTGCAGCACCAACAATATCG
Af1	GTTAGCACAATCAACAGTCTCG
Af3	GGAAGGCAACCAGTACGTCC

Se usaron los primers Foramfos-Amfosnoti3 para amplificar la zona 3', y el par Af1-Af3 para amplificar la región 5' (**figura 5a**). Los primers Af1-Af3 hibridan en otras regiones del genoma de *D. melanogaster* (**Tabla 1**), esto se realizó mediante un Blast de los primers

a Af1			
BLAST Hit Summary			
Description	Species	Score	E value
3R	Dmel	44.1047	5.31764e-05
2L	Dmel	32.2105	0.202398
X	Dmel	28.2458	3.16012
4	Dmel	28.2458	3.16012
3L	Dmel	28.2458	3.16012

b Af3			
BLAST Hit Summary			
Description	Species	Score	E value
3R	Dmel	40.14	0.000593044
3L	Dmel	28.2458	2.25723
2L	Dmel	28.2458	2.25723
X	Dmel	26.2635	8.91914
2R	Dmel	26.2635	8.91914

**Tabla 1. Regiones donde hibridan los primers Af1 y Af3.** Se muestran los resultados de realizar un Blast de los primers Af1 y Af3 contra el genoma de *D. melanogaster*. a) Las regiones donde se une el primer Af1, las cuales comprenden el brazo derecho del tercer cromosoma, el brazo izquierdo del cromosoma 2, el cromosoma X, el 4, y además el brazo izquierdo del cromosoma 3. b) El primer Af3 puede unirse al cromosoma 3 en el brazo derecho e izquierdo, en el cromosoma 2 en el brazo izquierdo, en el x, y también en el brazo derecho del cromosoma 2. En ambos primers la región más significativa es la del cromosoma 3 en el brazo derecho, donde se encuentra *amfos* o CG10055 como aparece en la base de datos flybase. El esquema de esta figura fue modificado de flybase

contra el genoma de la mosca de la fruta y la tabla 1 fue modificada de la base de datos flybase (Gramates et al., 2016); a pesar de unirse a otras regiones del genoma fueron utilizados pues eran los que al parecer tenían menos falsos positivos. Sin embargo, aún con ambos primers no se amplifica todo el locus. En este trabajo se inició una exploración inicial de la secuencia del locus solamente

## Purificación del producto de la PCR

Dos métodos diferentes fueron escogidos para purificar los productos de PCR. Los productos usados para la clonación se purificaron con el método casero llamado Freeze and Squeeze, que consiste en congelar la banda recuperada del gel de agarosa y exprimirla a temperatura ambiente después para recuperar el producto. El segundo método usado fue con el kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification de la compañía GE Healthcare, fue utilizado para recuperar las bandas y mandar a secuenciar.

## Preparación de células electrocompetentes

Con el fin de obtener más colonias transformantes se prepararon células electrocompetentes de *E. coli*. La transformación por electroporación es más eficiente que el choque térmico, lo cual era necesario por el tamaño del amplicón obtenido de 1200 bases. Para esto se inoculó 1 u.f.c De *E. coli* XL-1 blue con genotipo recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIq ZΔM15 Tn10 (Tetr )] en un litro de medio LB y se incubó a 37 °C. Después de que las células llegaran a una densidad óptica medida a OD600 de 0.6-1.0, para ello se utilizó un espectrofotómetro marca, se colocaron en hielo por una hora. Después se centrifugó a 4000 xg durante 15 min. Se removió el sobrenadante y las células se resuspendieron en 500 ml de ddH<sub>2</sub>O fría, se repite el paso de centrifugar y re-suspender, pero en 20 mL de ddH<sub>2</sub>O fría, de nuevo se centrifuga y re-suspende, pero esta última vez en glicerol frío al 15%, se repiten los mismos pasos, pero al final se re-suspende con 1 mL de glicerol al 15% todo el cultivo, y se congelan las células en alícuotas de 50 μL (Sambrook, Fritsch, & Maniatis, 1989).

## Ligación de producto de PCR

Debido a que la polimerasa del kit phire deja los extremos romos en los amplicones, se utilizó el kit de Invitrogen Zero Blunt Topo PCR Cloning Kit que es más eficaz para clonar

fragmentos con extremos romos. Se siguieron las indicaciones que sugería el manual de usuario

## Electroporación

Las células electrocompetentes fueron colocadas en una celda diseñada para este propósito, se les agregó el producto de la ligación, se pusieron en el electroporador y se les hizo pasar corriente. Inmediatamente se les añadió 1 mL de medio general LB, se incubaron a 37 °C por 45 min y se sembraron en una placa con un medio que contenía 50 mg/mL como marcador para las transformantes. El equipo utilizado fue el Multiporator de la marca Eppendorf

## Crecimiento de las colonias transformantes

Las colonias transformantes se sembraron en 3 mL en medio líquido LB adicionada de 3 microlitros de kanamicina. Después de 24 horas se centrifugaron para poder recuperar el pellet bacteriano.

## Miniprep

Soluciones usadas.

Solución 1: 50 mM glucosa, 25 mM tris- Cl pH8 y EDTA pH8

Solución 2: 0.2 NaOH y 1% DDS

Solución 3: 5M Acetato de potasio 60mL, ácido acético glacial 11.5 mL y 28.5 mL de H<sub>2</sub>O

Del crecimiento de las transformantes previamente descrito, se vació 1 mL en tubos de 1.5 mL, se centrifugó a 5 000 rpm durante 1 minuto. Se removió el sobrenadante, y el pellet bacteriano se resuspendió en 150 microlitros de la solución 1, posteriormente se añadieron 200 microlitros de la solución 2 y se mezcló invirtiendo el tubo durante un lapso de 5 a 10 segundos y finalmente se agregó 150 microlitros de la solución 3.

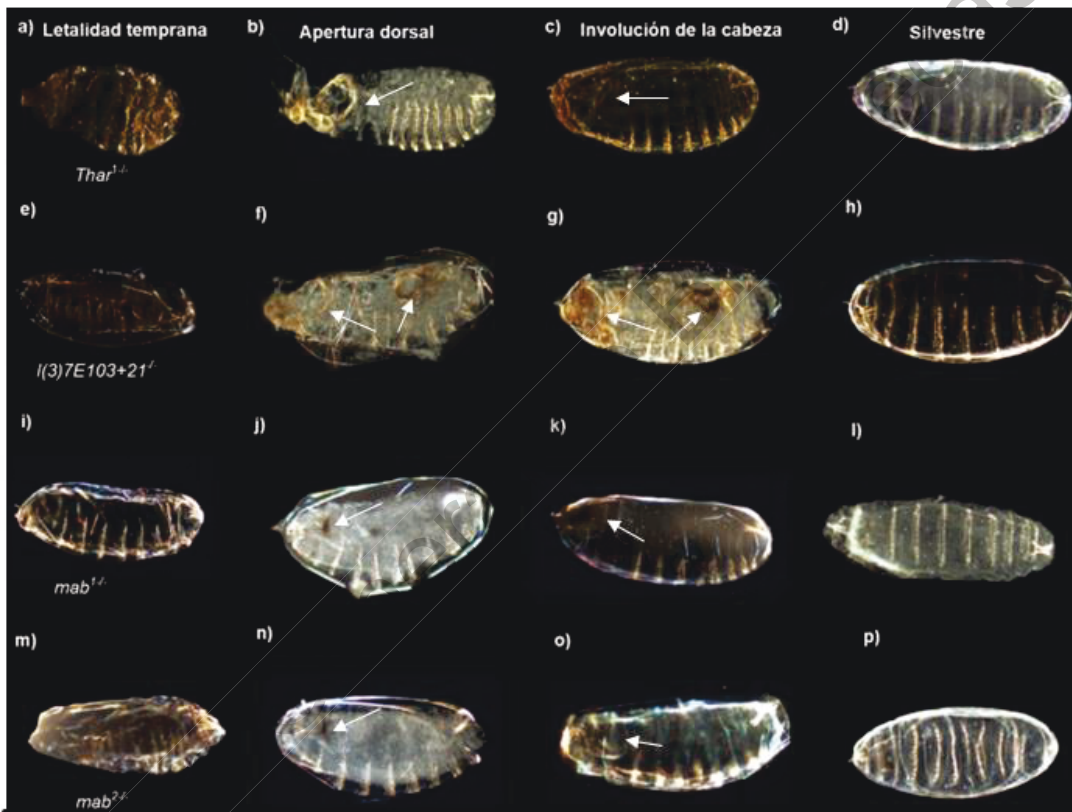
Se centrifugó a 5 000 rpm durante 5 min y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo, para precipitar el ADN plasmídico se añadió etanol en una proporción 2:1 y se dejó precipitar en hielo durante 10 minutos. En el paso final se centrifugó a 5 000 rpm durante 10 minutos y se eliminó el sobrenadante. Los pasos descritos fueron modificados de (Sambrook, Fritsch, & Maniatis, 1989)

## Secuenciación

Las muestras se mandaron a secuenciar a la unidad de servicio comercial, la unidad de proteogénomica del Instituto de neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

## Resultados

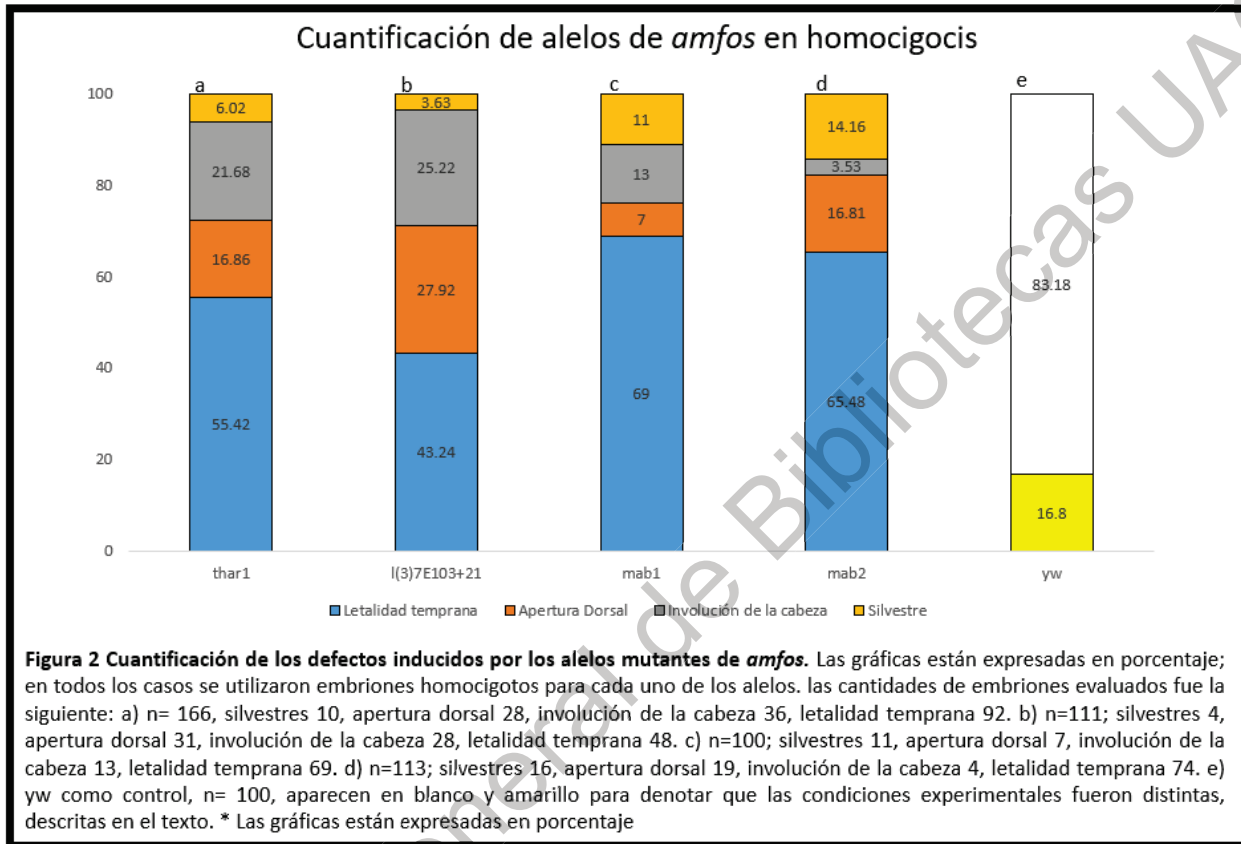
Los alelos de falta de función de *amfos* inducen letalidad embrionaria



**Figura 1. Los alelos de falta de función de *amfos* inducen letalidad embrionaria.** El plano mostrado es superior dorsal, inferior ventral, izquierda anterior y derecha posterior. a-d se muestran los defectos causados por *Thar*<sup>1-/-</sup>. a) Fenotipo de letalidad temprana, en donde no se observa una morfología clara, pues carece de los segmentos típicos del embrión. b) Fenotipo de apertura dorsal, con un hueco en esa zona (flecha). c) La involución de la cabeza ocurre de manera anormal; se observa una mancha negra en la región anterior (flecha). d) Embrión con morfología silvestre, que no completó el desarrollo y murió. e-h) Genotipos embrionarios de *l(3)7E103+21*<sup>-/-</sup> con defectos de letalidad temprana, apertura dorsal, involución de la cabeza y muerte silvestre, respectivamente. En el panel g) el embrión presentó conjuntamente involución de la cabeza y apertura dorsal (flechas). i-l) Mismos genotipos mutantes de *Ki,mab*<sup>1-/-</sup>. En este caso los fenotipos fueron menos severos. En j) se observa un pequeño hueco en la región dorsal, y k) tiene una zona pequeña necrosada en la región anterior (flecha). m-p) defectos presentes en el genotipo *Ki,mab*<sup>2-/-</sup>, similares al anterior y respectivamente.



El gen *amfos* se requiere para el desarrollo embrionario. Alelos mutantes del locus no completan el desarrollo embrionario y mueren. Para analizar los fenotipos letales en los embriones, se colectaron embriones homocigotos (con necrosis) de puestas de embriones y preparamos cutículas. El fenotipo mutante es variable, sugiriendo que *amfos* se requiere



en varias etapas del desarrollo embrionario, y que el fondo genético influencia el fenotipo final resultante (**figura 1**). En etapas tempranas de la embriogénesis no se alcanzan a diferenciar, ulteriormente, los segmentos embrionarios y la cutícula resultante, cuando está presente, muestra defectos en la segmentación (**figura 1a, e, i, m**). Dado que los embriones no fecundados fenocopian estos defectos, esta categoría es difícil de evaluar. Cuando los defectos son en la fase media y tardía del desarrollo embrionario, el fenotipo letal es de apertura dorsal (**figura 1b, f, j, n**) y de involución de la cabeza deficiente (**figura 1c, g, k, o**), respectivamente. Finalmente, hay un segmento de los embriones mutantes que no presentan defectos en la cutícula, ya que la morfología cuticular es de tipo silvestre (**figura 1d, h, l, p**), pero no sobreviven hasta la fase larvaria.

En la **figura 1** del panel **a** al **d**, se muestran ejemplos representativos de los defectos inducidos por el genotipo *Ki*, *Thar*<sup>1</sup> homocigoto mutante. En los paneles de la **figura 1 de e**

al h se muestran embriones con el genotipo  $I(3)7E103+21^{-/-}$ . En ocasiones, las cutículas de embriones mutantes pueden presentar más de un defecto; en la **figura 1 g** la cutícula mutante presenta defectos de apertura dorsal e involución de la cabeza. Los defectos de los homocigotos mutantes de los genotipos  $Ki, mab^1$  y  $Ki, mab^2$ , que van de la **figura 1 i a l** y de **m a p**, respectivamente, y presentan los mismos defectos, pero menos acusados que los otros dos alelos. Esto sugiere que los alelos  $mab^1$  y  $mab^2$  son más débiles que los de  $Thar^1$  y  $I(3)7E103+21$ , y por lo tanto, probablemente representan condiciones más hipomórficas que los segundos.

Establecer si un alelo es nulo o hipomorfo es posible mediante técnicas genéticas y moleculares. En el caso de un ensayo genético se realiza por cruza con deficiencias de la zona donde mapea el locus en estudio. Si en la descendencia la condición es igualmente letal entre el homocigoto mutante y el que tiene la deficiencia y el alelo mutante, entonces se trata de un alelo nulo, en cambio si la letalidad es menor o los fenotipos mutantes menos acusados entre el homocigoto y el que tiene el segmento faltante del cromosoma con el alelo mutante, entonces se trata de un alelo hipomorfo (Roote & Russell, 2012).

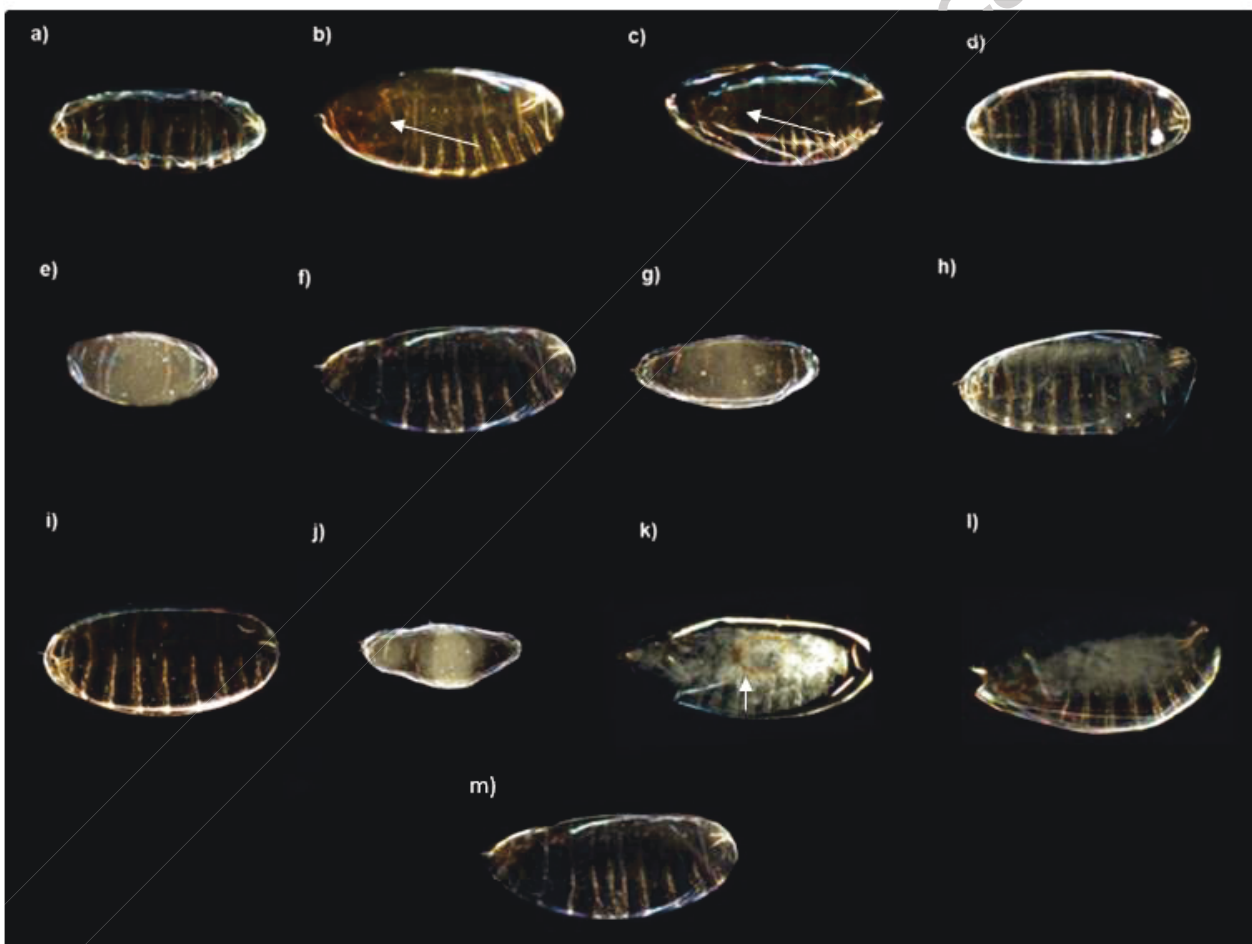
En el caso de *amfos*, para establecer si los alelos son nulos o hipomorfos, no se puede realizar un abordaje genético, pues no hay deficiencias para esa zona, ya que en el área circundante se encuentra el único gen de *Drosophila* que es triple-haplo letal (Roehrdanz & Lucchesi, 1980). Para saber si los alelos de *amfos* son nulos o hipomorfos, el único abordaje es el molecular, para ello sería necesario hacer una PCR cuantitativa para saber si hay menor transcripción en cada uno de los alelos o también mediante un Western Blot, para cuantificar la cantidad de proteína, si presente.

La **figura 2** muestra la cuantificación de los fenotipos de los alelos mutantes de *amfos*. En **2 a** se muestra la cuantificación de los fenotipos del alelo  $Thar^1$  y en **2 b** se muestran los de  $I(3)7E103+21$ . Estos dos alelos son los que inducen fenotipos de apertura dorsal e involución de la cabeza más notorios y frecuentes en comparación con  $mab^1$  y  $mab^2$ .  $I(3)7E103+21$  es el que presenta la mayor frecuencia de apertura dorsal con un 27.92%, e involución de la cabeza con un 25.22%, seguido de  $Thar^1$  con un 16.86% de apertura dorsal y un 21.68% de involución de la cabeza. Los barras **c** y **d** de la **figura 2** corresponden a la cuantificación de los fenotipos de los alelos  $mab^1$  y  $mab^2$ . Estos fueron los que presentaron fenotipos más discretos y menos frecuentes de apertura dorsal e involución de la cabeza, pero mayor frecuencia de cutículas de aspecto silvestre. En el alelo  $mab^1$  el 11% de las cutículas son silvestres, mientras que para  $mab^2$  el 14.16% son silvestres, comparados con  $Thar^1$  que presenta 6.02% de fenotipos de cutícula silvestres, y  $I(3)7E103+21$  que presenta



3.63%. Estos resultados son consistentes con una serie alélica de la siguiente manera:  $l(3)7E103+21 > Thar^1 > mab^2 > mab^1$ .

En la cepa control (**figura 2e**), que no porta alelos letales, hay algunos embriones con fenotipo de muerte embrionaria temprana, que pueden corresponder a huevos no fecundados, como se dijo arriba, pero no se encontraron cutículas con defectos de cerrado dorsal o involución de la cabeza. En esta cepa control, los demás embriones no presentan defectos, y eclosionan como larvas de primer estadio. Para evitar la eclosión y poder cuantificar el número de embriones que no se desarrollan en la cepa control (huevos no fecundados), a estas puestas no se les permitió llegar hasta el final del desarrollo. De manera diferente, en el caso de los alelos mutantes, las puestas se dejaron más de dos



**Figura 3. *amfos* interactúa genéticamente con *kay* mediante no complementación no alélica o letalidad sintética.** El plano mostrado es superior dorsal, inferior ventral, izquierda anterior y derecha posterior. Todas los dobles mutantes heterocigotos de *amfos* y *kay* mueren, aunque no todas las combinaciones de alelos muestran fenotipos de letalidad temprana (LT), apertura dorsal (AD), involución de la cabeza (IC) y muerte con morfología silvestre (S). Defectos de a-d genotipo *Thar*<sup>2+/-</sup>,*kay*<sup>2+/-</sup>: a) defecto LT, b) defecto AD, c) fenotipo IC, d) morfología S. e-f. Fenotipos de *Thar*<sup>2+/-</sup>,*kay*<sup>2+/-</sup>: e) Defecto LT, f) defecto S. g-i Fenotipos de *l(3)7E103+21*<sup>+/-</sup>, *kay*<sup>2+/-</sup>: g) LT, h) IC, i) S. j-k . Fenotipos de *l(3)7E103+21*<sup>+/-</sup>,*kay*<sup>2+/-</sup>: j) LT, k) AD, l) IC, m) S

días, tiempo suficiente para que hubiesen terminado el desarrollo.

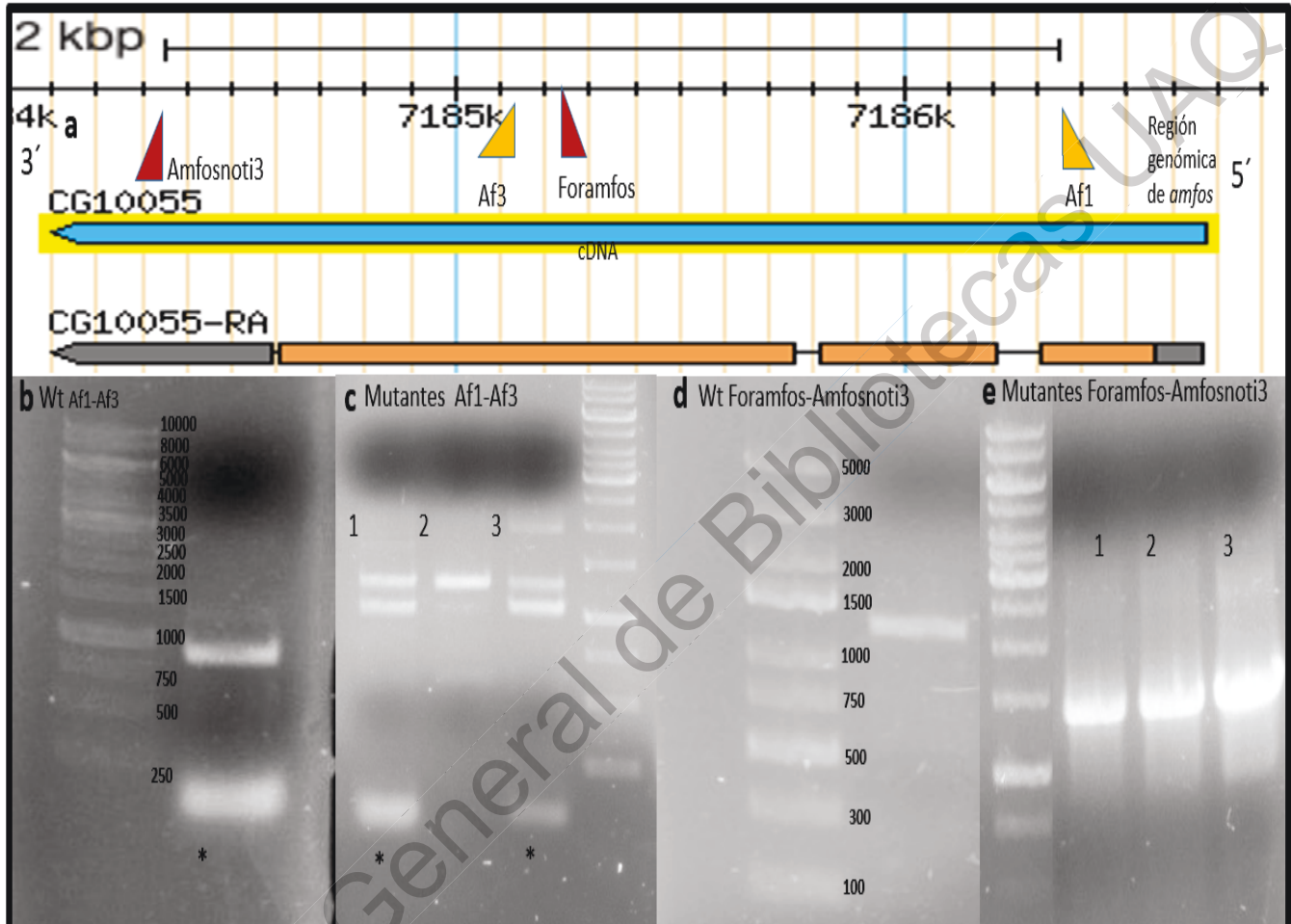
## *amfos* interactúa genéticamente con *kay* mediante no complementación no alélica o letalidad sintética

Normalmente, organismos que son heterocigotos parados *loci* [doble mutante heterocigoto ( $a/A, b/B$ )], y en donde los fenotipos son homocigotos recesivos, el organismo resultante es viable pues de ambos genes tiene una copia funcional que compensa la falta de función de la otra, o una copia funcional es suficiente para no presentar fenotipos mutantes para los dos genes. En el caso de la letalidad sintética o no complementación no alélica, el doble heterocigoto es letal y no completa su desarrollo, lo cual indica una relación muy estrecha entre estos genes (Nijman, 2011).

*amfos* y *kay* presentan este tipo de interacción genética poco común. En cruzas entre los heterocigotos de *amfos* y *kay* los descendientes doblemente heterocigotos mueren como embriones (Riesgo-Escovar, datos no publicados). Para estudiar este fenómeno se llevaron a cabo cruzas entre dos alelos de *amfos* y dos de *kay*.

En la **figura 3** del panel **a** al **d** se muestran ejemplos representativos de embriones mutantes con el genotipo  $Thar^{1+/-}; kay^{1+/-}$  en **3a** se observa un embrión con letalidad temprana, en **3 b, c** y **d** embriones con defectos de apertura dorsal, involución de la cabeza defectuosa y muerte con morfología silvestre, respectivamente. Los paneles de **la figura 3 e** y **f** muestran cutículas representativas de embriones con genotipo  $Thar^{1+/-}, kay^{2+/-}$ , con fenotipos de letalidad embrionaria y muerte con morfología silvestre, respectivamente. No se encontraron embriones con apertura dorsal ni con involución de la cabeza deficiente. La **figura 3** de **g** a **l** muestran embriones de genotipo  $l(3)7E103+21+/-, kay^{1+/-}$ , con fenotipos de letalidad temprana, involución de la cabeza deficiente y muerte con morfología silvestre, en ese orden. En la **figura 3 j** a **m**, se muestran embriones representativos de genotipo  $l(3)7E103+21+/-, kay^{2+/-}$ , con fenotipos de letalidad temprana, cerrado dorsal, involución de a cabeza defectuosa y morfología silvestre, en ese orden.

En casi todas las cruzas se obtuvieron los cuatro fenotipos embrionarios mutantes esperados (letalidad temprana, apertura dorsal, involución de la cabeza defectuosa y letalidad embrionaria sin fenotipo cuticular), presentes en mutantes homocigotas de *amfos* o de *kay*, aunque en menores proporciones del total. En todas las combinaciones



**Figura 5.** *amfos* se encuentra en el brazo derecho del tercer cromosoma de *D. melanogaster* a) El gen CG10055 predicho por Flybase tiene un tamaño de 2574 bases corresponde a la zona mapeada para *amfos*, y está en el cromosoma tres del brazo derecho, se encuentra entre *sas* y *lap*, y codifica para un solo transcrito y una única proteína. Los pares de primers Af1-Af3 y Foramfos-Amfosnoti3 amplifican el locus de *amfos*. b) Los primers Af1-Af3 se unen al extremo 5' de *amfos* y amplifican esa región en el organismo silvestre. c) Con los primers Af-Af3 se amplificó la zona 5' de *amfos* en los genotipos: 1. *Thar*<sup>1-/-</sup>, *Ki,mab2*<sup>1-/-</sup>, y 3. *l(3)7E103+21*<sup>1-/-</sup>. d) El par de primers Foramfos-Amfosnoti3 amplifican la región 3' de *amfos*; se muestra el amplicón a partir de embriones silvestres. e) Amplicones a partir de los mutantes con los genotipos 1. *Thar*<sup>1-/-</sup>, *Ki,mab2*<sup>1-/-</sup> 3. *l(3)7E103+21*<sup>1-/-</sup>. En todos los gels excepto c el carril de la izquierda son los marcadores de peso. Con asterisco se marcan las amplificaciones espurias y en el texto se dan posibles explicaciones a las bandas extras que aparecen en b y c.

heteroalélicas de alelos mutantes entre *amfos* y *kay* hubo letalidad sintética 100% penetrante. En la **figura 4** se muestra la cuantificación de los defectos observados por estas interacciones entre alelos de *kay* y *amfos*. 4a muestra la cuantificación de *Thar*<sup>1+/-</sup>, *kay*<sup>1+/-</sup> (Letalidad temprana [Lt]=78.78%, Apertura dorsal [Ad]=3.03%, Involución de la cabeza

[lc]=2.27%, Silvestre[S]= 15.9) ; **4 b** muestra los resultados de *Thar1*<sup>+/-</sup>,*kay2*<sup>+/-</sup>(Lt=97.24% S=2.75%); en **4 c** está la cuantificación de embriones *l(3)7E103+21*<sup>+/-</sup>,*kay1*<sup>+/-</sup>(Lt=82% lc=4.76% S=12.38%) y **4 d** es la cuantificación de embriones *l(3)7E103+21*<sup>+/-</sup>,*kay2*<sup>+/-</sup>(Lt=89.75% Ad=3.84% lc=2.56% S=3.84%) En estos casos, los fenotipos mutantes más acusados fueron con *Thar1*<sup>+/-</sup>,*kay2*<sup>+/-</sup>, seguido de *l(3)7E103+21*<sup>+/-</sup>,*kay2*<sup>+/-</sup>; es decir, los fenotipos que involucran el alelo *kay2*. Esto puede deberse a que *kay2*, es un alelo de *kay* con pérdida de función para algunas isoformas y de ganancia de función para otras isoformas de *kay*, mientras que *kay1* es un alelo de falta de función para todas (Alfonso-González, 2018).

## *amfos* se encuentra en el brazo derecho del tercer cromosoma de *D. melanogaster*

En el laboratorio se mapeó a *amfos* en el brazo derecho del tercer cromosoma de la mosca, entre los genes *lap* y *sas*. Dado que el genoma de *D. melanogaster* está secuenciado, y en la base de datos Flybase se encuentran anotados y mapeados todos los genes predichos en el genoma, el sitio correspondiente a *amfos* es la unidad de transcripción CG10055. En la **figura 5 a** se muestra el locus que tiene una longitud de 2573 nucleótidos. Se diseñaron los pares de primers Af1-Af3 que abarcan del nucleótido 66 al 1358 y los Foramfos-Amfosnoti3 que cubren del nucleótido 1249 al 2514, como se muestra en el esquema modificado de Flybase (Gramates et al., 2016) Estos primers sirvieron para amplificar por PCR la zona genómica de *amfos* a partir de ADN purificado de embriones mutantes y controles.

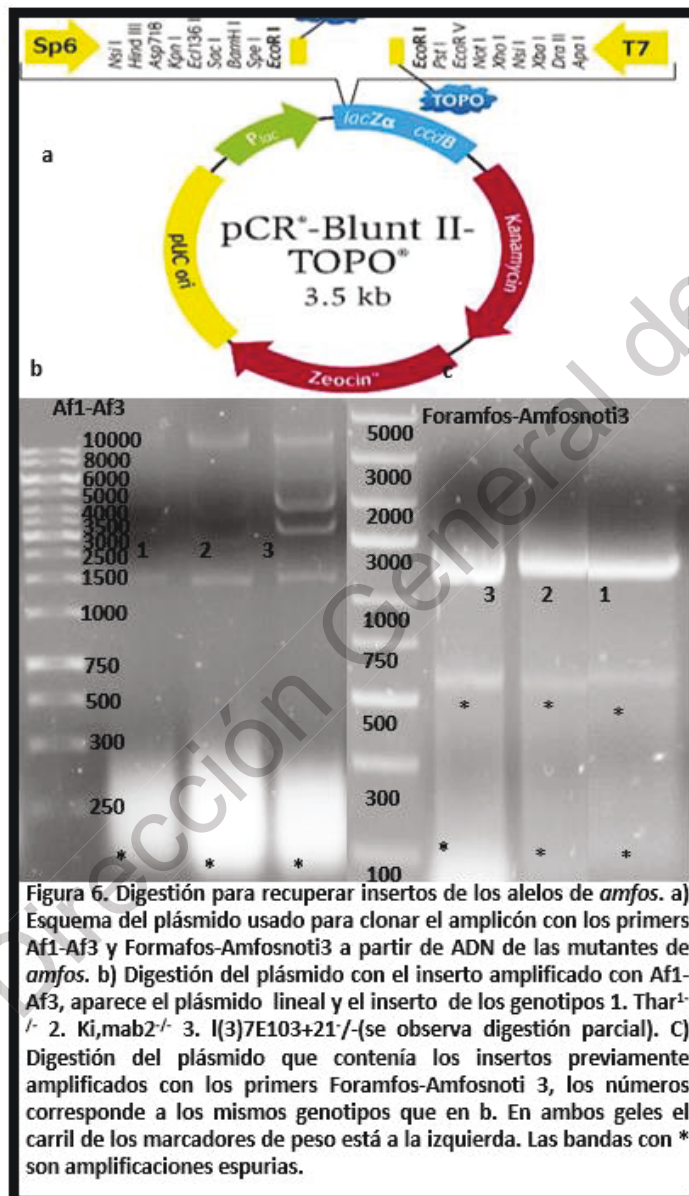
La amplificación con el par de primers Af1-Af3 se realizó con una temperatura de alineamiento de 55°C a 40 ciclos. Con esta temperatura de alineamiento se amplificó la zona 5´de *amfos*. Sin embargo, con este par de primers se obtuvieron dos bandas empleando ADN tanto de cepas silvestres como de mutantes (*Ki*, *Thar*<sup>1</sup> ; *Ki*, *mab2* y *l(3)7E103+21* (**figura 5 B y C**). Una de las bandas corresponde en tamaño al amplicón esperado de 1249 bases. Con Foramfos-Amfosnoti3 se amplificó la zona 3´de *amfos*, correspondiente a 1265 bases. La temperatura de alineamiento fue de 64°C y se hicieron 40 ciclos, amplificando de ADN de embriones con los siguientes genotipos: *Ki*<sup>-/-</sup>, *Thar*<sup>1</sup><sup>-/-</sup>, *Ki*<sup>-/-</sup>, *mab2*<sup>-/-</sup>, *l(3)7E103+21*<sup>-/-</sup> y controles (**figura 5 d y e**). En este caso sólo se obtuvo un amplicón del tamaño esperado de 1200 bases aproximadamente. Es importante remarcar que los primers Af1-Af3, en todos los genotipos probados, incluyendo el silvestre,



amplificaron 2 bandas, el esperado 1290 y una banda de alrededor 1100. Esto probablemente se debe porque a que los primers pueden hibridar en otras regiones del genoma de *D. melanogaster*. Se escogieron, sin embargo, esos primers porque la región a la que se unen tiene un alto contenido de GC y no hibridan en muchas otras regiones (ver metodología). Para comprobar que los amplicones son los esperados, así como para buscar lesiones moleculares en los alelos de *amfos*, éstos se secuenciaron.

## Clonación de los alelos de *amfos*

Con la finalidad de obtener una cantidad suficiente para secuenciar los amplicones de

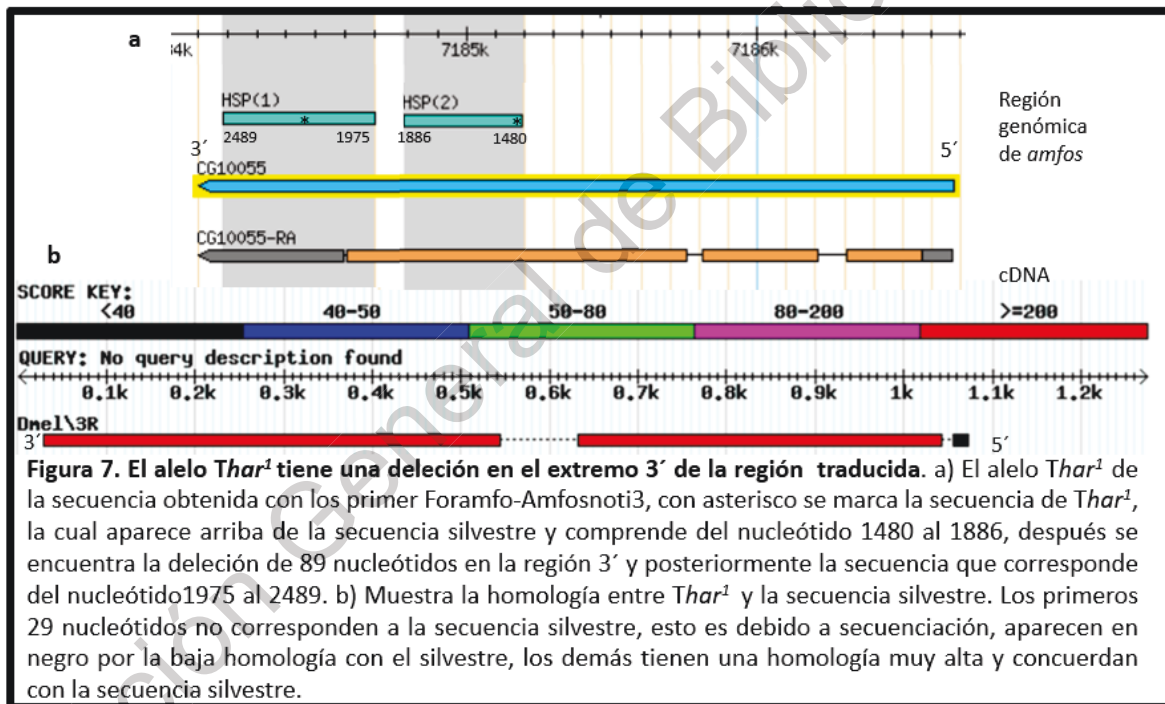


de *amfos*, se ligaron los amplicones al vector de clonación PCR-Blunt-II TOPO. Los amplicones ligados se obtuvieron a partir de DNA genómico de *Thar*<sup>1</sup>, *l(3)7E103+21* y *mab*<sup>2</sup>. Este plásmido comercial utilizado para estos fines tiene como marcadores de selección zeocina y kanamicina. En este trabajo se utilizó kanamicina (figura 6 a). Después de la ligación, se transformaron células bacterianas por electroporación y se seleccionaron en medio sólido. Colonias resistentes al antibiótico se crecieron en medio líquido con kanamicina a una concentración de 0.0001 microgramos por mililitro. A partir de estos cultivos líquidos se purificaron los plásmidos. Para poder recuperar el inserto se digirió el vector con la enzima de restricción EcoRI y después se separó en un gel de agarosa. Se muestran los resultados de la digestión y posterior liberación

del inserto que previamente fue amplificado con los primers AF1-AF3 (**figura 6 b**). Se puede observar un patrón de bandas con algunas que corresponden al peso aproximado del amplicón y del vector. En estos plásmidos en principio se clonó la banda de mayor peso molecular que aparece en **5 c**. Sin embargo, debido al patrón de bandas supernumerarias, no se continuó trabajando con estos plásmidos.

Con los amplicones obtenidos a partir de los primers Foramfos-Amfosnoti3, se realizó el mismo procedimiento. En este caso el patrón de bandas obtenido fue mucho más claro. En estos experimentos con las digestiones se obtuvieron sólo el vector y el inserto. En el caso obtenido a partir del ADN de *Thar<sup>1</sup>* se observó un amplicón con un peso molecular un poco menor al de los demás alelos (**figura 6 c**).

### El alelo *Thar<sup>1</sup>* tiene una deleción en el extremo 3'

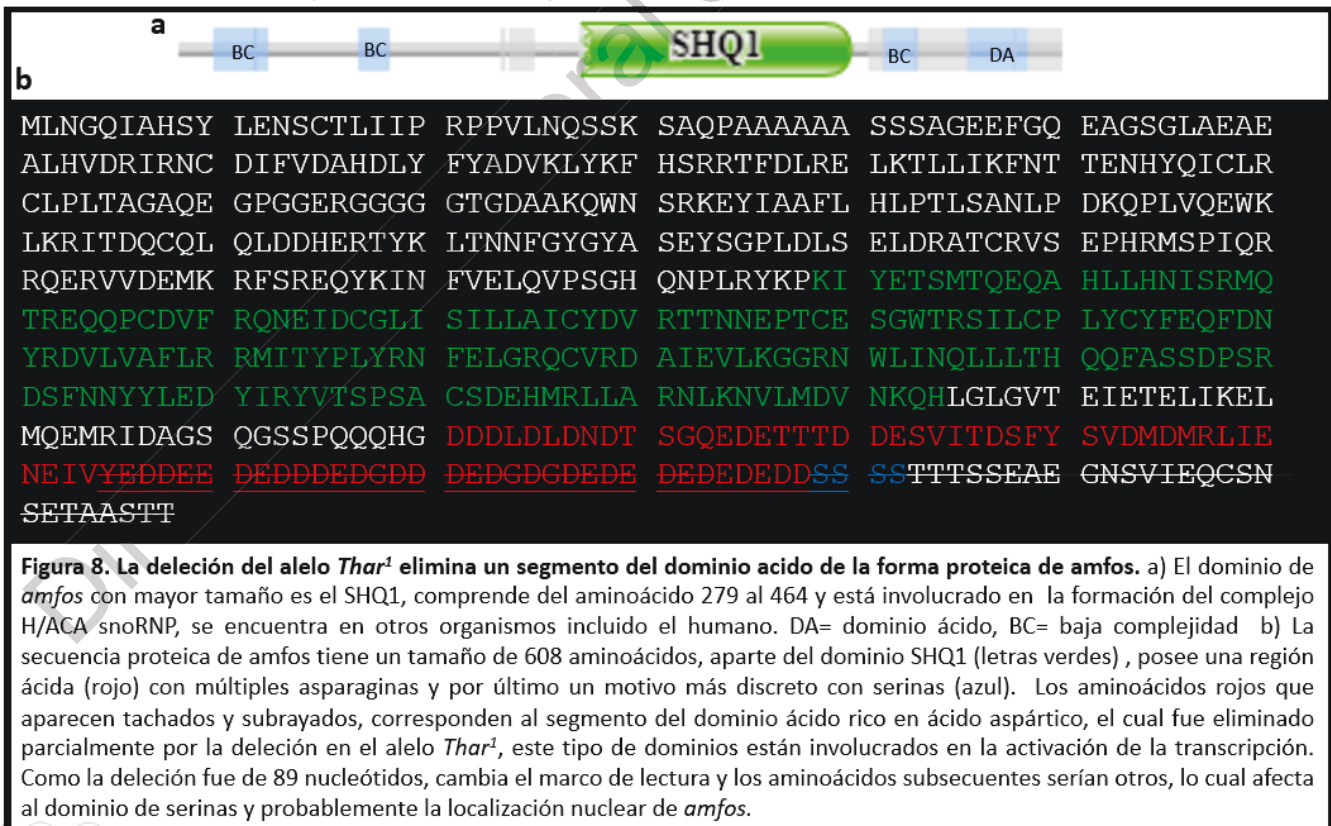


Para revelar los defectos del alelo *Thar<sup>1</sup>*, se mandó a secuenciar el segmento 3' que va del nucleótido 1480 al 2489, y la región deletada comprende del 1886 al 1975. Se muestra la localización de esta deleción en un esquema de la primers Foramfos-Amfosnoti3 a una unidad comercial de secuenciación. Este amplicón corresponde a parte de la región del extremo 3' del marco de lectura abierto, y a la secuencia trailer 3' no traducida. Se realizó un Blast en la base de datos Flybase (Gramates, L. Sian et al., 2016). Se encontró una diferencia significativa entre la secuencia amplificada a partir de *Ki*, *Thar<sup>1</sup>* y la secuencia

control. La lesión en este alelo consiste de una deleción de 89 nucleótidos. La región amplificada en la región genómica de *amfos* y con el ADN complementario correspondiente, marcando las regiones no codificantes y el marco de lectura abierto. La deleción cae al final del marco de lectura abierto (**figura 7 a**).

Fuera de la deleción descrita arriba, la secuencia obtenida de *Thar*<sup>1</sup> posee una homología muy alta en comparación con la silvestre, lo cual comprueba que la selección de primers, y los pasos subsiguientes hasta obtener la secuencia fueron correctos. También que en esta secuencia del extremo 3' del alelo *Thar*<sup>1</sup> sólo existe una deleción y que no hay algún otro defecto como pequeñas inserciones o alguna inversión (**figura 7 b**). Esto también es evidencia que el mapeo de *amfos* realizado en el laboratorio fue el correcto.

Del extremo más 5' no se puede asegurar nada, pues no se obtuvo la secuencia de esa región, y por lo tanto existe la posibilidad de que los defectos encontrados en este alelo sean por algún defecto en la región 5' del marco de lectura abierto o en la región 5' no traducida o en el promotor. Sin embargo, la deleción identificada podría ser, por si sola, responsable de los fenotipos mutantes en *Thar*<sup>1</sup>, pues en esta región se encuentran un dominio ácido y uno de serinas (ver abajo), según UniProtKB, los cuales están alterados por la deleción (Consortium, 2018).





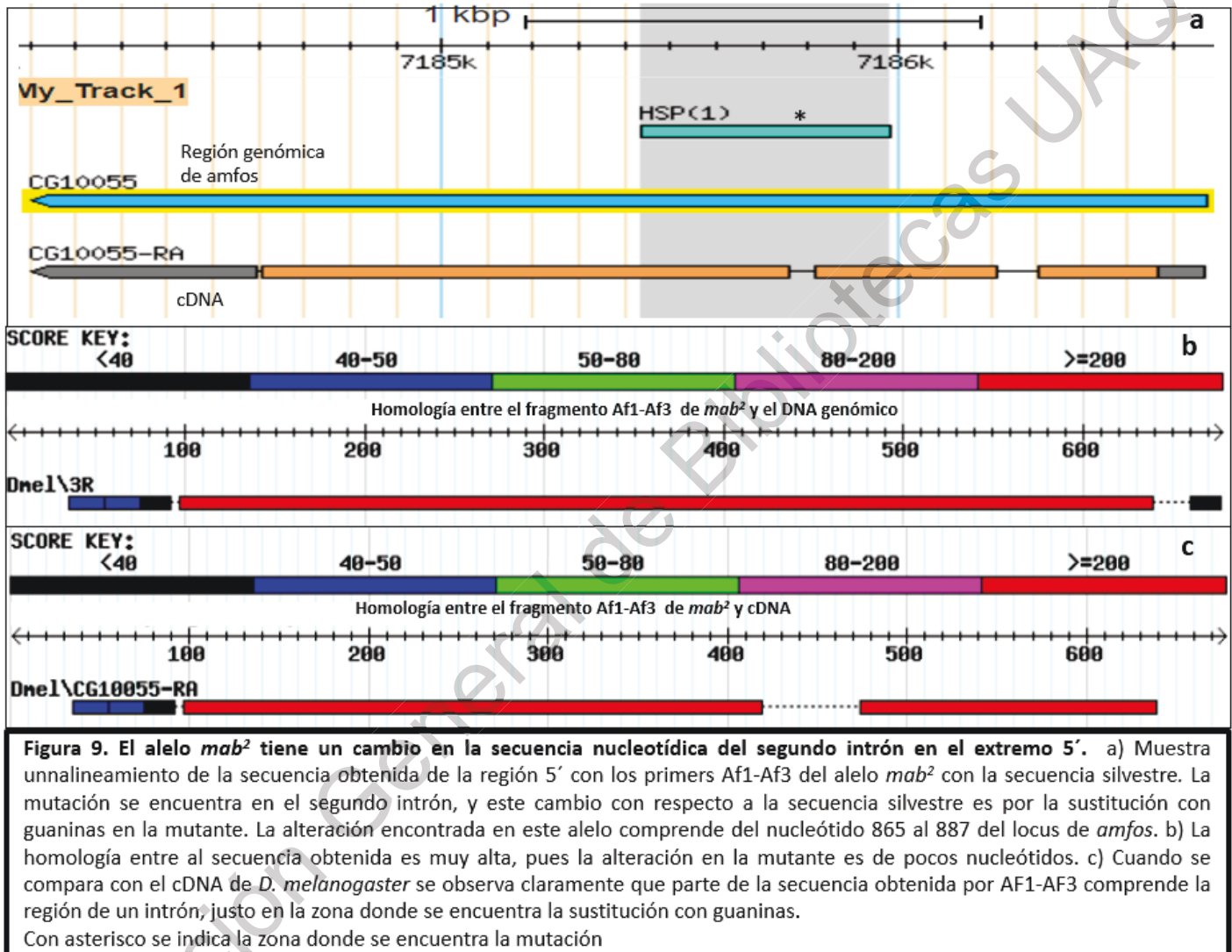
## Dominios predichos de Amfos. La delección del alelo *Thar*<sup>1</sup> altera la secuencia a partir de la segunda mitad del dominio ácido predicho de la proteína codificada por *amfos*

El gen *amfos* codifica para una proteína con un dominio evolutivamente conservado, denominado SHQ1. En humanos hay una proteína que consiste enteramente de este dominio (Grozdanov, Roy, Kittur, & Meier, 2009; Walbott et al., 2011). Está descrito que este dominio ayuda en el ensamblaje de la ribonucleoproteína H/ACA. Dicha familia proteica desempeña diversas funciones celulares, como el procesamiento de RNA ribosomal, modificación de ARNs pequeños nucleares y la estabilización de la telomerasa. Existe evidencia in vivo e in vitro que la proteína SHQ1 en conjunto con ribonucleoproteínas H/ACA interactúan para la acumulación estable de RNA telomérico y RNA H/ACA (Grozdanov, Roy, & Meier, 2009).

Existen otros dominios en Amfos, los cuales podrían estar involucrados en su función en el cerrado dorsal. Además del dominio SHQ1, posee un dominio ácido rico en ácido aspártico (Consortium, 2019). Se sabe que estos dominios ácidos están implicados en la activación de la transcripción y pueden encontrarse en proteínas que no son factores de transcripción. Aunque no existe un motivo estructural bien definido para estos dominios, una gran cantidad de aminoácidos ácidos es un buen indicador (Melcher, 2000).

Además, en el final de la estructura primaria de Amfos, casi en el extremo carboxilo-terminal, se encuentra un motivo de poli-serinas (Consortium, 2019). Existe evidencia de que estos motivos están implicados en la localización subnuclear de otras proteínas, como en el caso de Jmjd6 y Tra2 $\beta$  (Li et al., 2013) (Wolf et al., 2013).

Diversas bases de datos incluyen diferentes predicciones para las funciones de la proteína Amfos. En el caso de PFM, sólo reporta el dominio SHQ1, y los dominios correspondientes a la región ácida y el pequeño motivo de serinas no aparecen; es por ello que se modificó el esquema de Amfos obtenido en PFM (El-Gebali et al., 2019) (figura 8a).



Los primeros aminoácidos de Amfos no codifican para ningún dominio conocido, después se encuentra el dominio SHQ1 previamente descrito y posteriormente se encuentra el dominio ácido. En la forma proteica del alelo *Thar*<sup>1</sup> y su dominio ácido está parcialmente interrumpido por una deleción, lo cual sugiere que el fallo para completar la embriogénesis se debe a este defecto. El dominio de poli serinas también está afectado, pues la deleción de 89 nucleótidos cambia el marco de lectura.

## El alelo *mab*<sup>2</sup> tiene un cambio en la secuencia nucleotídica del segundo intrón en el extremo 5´

Mediante los primers Af1-Af3 se obtuvo una secuencia por PCR a partir de ADN genómico. Estos primers amplifican la región 5´ de *amfos*, y se probaron en el alelo *mab*<sup>2</sup>. Se encontró un defecto que consiste en un cambio por guaninas en la secuencia mutante de parte de la secuencia silvestre. Este cambio consta de 22 nucleótidos, que abarcan del 865 al 887 (**figura 9**). La alteración encontrada en el alelo *mab*<sup>2</sup> está localizada en el segundo intrón. La secuencia de la región codificante aledaña posee una alta homología con la secuencia silvestre, es por ello que la única lesión encontrada en este alelo en la región 5´ se debe a la sustitución con guaninas en el alelo mutante (**Figura 9 a y b**).

Con la finalidad de esquematizar donde se encuentra la mutación de *mab*<sup>2</sup> de manera precisa, se realizó un Blast de la secuencia obtenida por los primers Af1-Af3 contra el cDNA de *Drosophila*. Debido a que la secuencia abarca al segundo intrón, en el esquema aparece un hueco faltante, es en esa zona donde se encuentra el cambio de nucleótidos (**figura 9 C**).

El cambio en este alelo es más discreto que en comparación con *Thar*<sup>1</sup>. Esto puede explicar parcialmente porqué los fenotipos letales son menos notorios en *mab*<sup>2</sup>. Sin embargo, es necesario secuenciar por completo el locus para determinar si el fenotipo se debe a este cambio ó si se posee algún otro que se encuentre en la región codificante y afecte algún dominio funcional de la proteína como en el caso de *Thar*<sup>1</sup>.

## Discusión de resultados

### Alelos mutantes de *amfos*

Las series alélicas son muy útiles para poder clasificar y entender la naturaleza del defecto de los alelos con los cuales se está trabajando. Los resultados mostrados aquí indican que el alelo más extremo es *I(3)7E103+21*, seguido de *Thar*<sup>1</sup>. No se cuenta con información molecular de *I(3)E103+21*, pero si de *Thar*<sup>1</sup>. La lesión molecular de *Thar*<sup>1</sup> es consistente con que el locus CG10055 codifique para *amfos*, y con el mapeo genético efectuado previamente.

Dado que los fenotipos mutantes de *Thar*<sup>1</sup> son muy semejantes en tipo y abundancia a *I(3)7E103+21*, y que este último no porta la mutación *Ki*<sup>1</sup>, como los otros tres alelos estudiados aquí (*mab*<sup>1</sup> y *mab*<sup>2</sup> tienen los mismos fenotipos mutantes, pero menos acusados

y menos frecuentes), es razonable suponer que los defectos embrionarios descritos aquí se deben a *amfos* y no a *Ki*. No existen reportes de defectos embrionarios de *Ki* en la literatura (Gramates et al., 2016). El hecho de que los alelos de *amfos* presenten diversos fenotipos indica que el gen es pleiotrópico (un gen que causa fenotipos no relacionados) se requiere en diversos procesos. Un dato muy relevante es la interacción genética con el locus *kayak*, que codifica para el homólogo en la mosca de los genes *fos* de vertebrados. Debido a que no se obtuvo la secuencia del extremo 5' de *amfos* no se puede aseverar nada sobre el estado de dicha región, la cual comprende el dominio SHQ1. Para responder la pregunta sobre si el dominio SHQ1 de *amfos* está implicado en el cerrado dorsal o si en *D. melanogaster* también cumple la función de ensamblar ribonucleoproteínas, es necesario hacer experimentos que permitan eliminar este dominio. Una opción sería utilizar la técnica de CRISPR/Cas9, y generar mutantes en donde se elimine de manera precisa este dominio, esta técnica es ampliamente usada en distintos modelos, incluyendo a la mosca de la fruta (revisado en Bassett & Liu, 2014)

Los fenotipos mutantes inducidos por el alelo *mab*<sup>2</sup> son menos frecuentes en comparación con los alelos *Thar*<sup>1</sup> y *I(3)7E103+21*, los cuales presentan la mayor cantidad de especímenes con apertura dorsal e involución de la cabeza deficiente. Debido a que la mutación encontrada en el alelo *mab*<sup>2</sup> está en el segundo intrón esto podría afectar con menor severidad y explicaría las diferencias encontradas en la serie alélica.

Se sabe que la exportación del mRNA está acoplado a la remoción de intrones. La evidencia de ello es que los mRNAs que son generados a partir de splicing son exportados con mayor eficiencia que sus contrapartes generadas a partir de cDNA (Luo & Reed, 2002). La menor eficiencia en la exportación del mensajero podría explicar porque el alelo de *mab*<sup>2</sup> tiene menos fenotipos mutantes, aunque la forma proteica fuera silvestre. Si no se exporta con la eficiencia adecuada, esto impediría que la función normal se desempeñase, lo que resulta en la letalidad embrionaria. Es necesario obtener la secuencia de la región 3' para descartar que las lesiones se deban a otros cambios en el alelo mutante.

Si no se explicasen los defectos en *mab*<sup>2</sup> por una deficiencia en el procesamiento del transcrito primario, cabrían otras explicaciones. Muchos intrones contienen RNAs no codificantes, como snoRNAs (Tycowski, Shu, & Steitz, 1993) y precursores de miRNA (Rearick et al., 2011). El escenario donde los defectos causados en el alelo *mab*<sup>2</sup> sean por miRNAs parece menos probable, pues los RNAs de esta naturaleza se encargan de regular a nivel pos-transcripcional mediante la degradación del mensajero del cual fueron transcritos (Westholm & Lai, 2011), y eliminar al supuesto miRNA que degradase a *amfos*

induciría a que el transcrito fuese más abundante en el caso del mutante de *mab*<sup>2</sup>; de esta manera se induciría que el alelo *mab*<sup>2</sup> fuese de ganancia de función. Si tenemos en cuenta que *Thar*<sup>1</sup> es un alelo de pérdida de función y que causa los mismos fenotipos que *mab*<sup>2</sup>, aunque con mayor severidad; entonces sería complicado pensar en que el mismo fenotipo fuese causado por alelos del mismo gen si unos fuesen de ganancia de función y otros de pérdida de función.

## Interacción *amfos-kay*

A pesar de la importancia de las predicciones de interacciones por algoritmos computacionales, la prueba experimental es fundamental para entender realmente la función de un gen. No existen reportes a partir de algoritmos de que *amfos* participe en la vía de la cinasa de Jun, por ejemplo, aunque esto es claro por el fenotipo de apertura dorsal, involución de la cabeza y letalidad temprana que presentan los alelos hipomorfos homocigotos de *amfos* y las interacciones genéticas en los dobles mutantes heterocigotos de *kay* con *amfos*.

A pesar de que en este trabajo no se muestra evidencia de la interacción física de *amfos* con *kay*, una posibilidad es pensar que así ocurre, pues la interacción genética entre estos dos loci es incluso más estrecha que la ocurre entre *kay* y *jra*, que interaccionan físicamente formando hetero-oligómeros. Por otra parte, Flybase predice que *amfos* se une a otras proteínas (Gramates et al., 2016). Se sabe que la letalidad sintética o no complementación no alélica suele ocurrir entre genes que desempeñan procesos fundamentales para la supervivencia y suelen tener funciones genéticas altamente reguladas, como en el desarrollo (Nijman, 2011). Este motivo hace interesante analizar a *amfos* y *kay* en conjunto. El paradigma establecido para mutaciones en la señalización del cerrado dorsal establece que los mutantes que mueren con un fallo en este proceso y dejan cutículas con huecos en la zona dorsal y que no se deben a fallos en loci que codifican para proteínas del citoesqueleto, es debido a fallos en la vía de la cinasa de Jun, o a la vía de *dpp*, regulada esta última por la vía de la cinasa de Jun (Ríos-Barrera & Riesgo-Escovar, 2013). Esto aplica perfectamente para *amfos*, pues la letalidad sintética con *kay* es una clara evidencia de su participación en la vía de la cinasa de Jun.

Está predicho que *Amfos* puede encontrarse en el núcleo y en el citoplasma (Gramates et al., 2016). Lo mismo ocurre con *Kay*, puesto que está comprobado que se encuentra en ambas regiones (Ríos-Barrera & Riesgo-Escovar, 2013); por ello es posible pensar que

estas proteínas pueden interactuar en ambos ambientes celulares. La no complementación no alélica es consistente con que pueden trabajar en el núcleo sinérgicamente.

En el núcleo Kay actúa como factor de transcripción y se une al DNA mediante su dominio de “agarre de tijeras” vecino al dominio de zipper de leucinas (Riese, Tremml, & Bienz, 1997). Amfos posee un dominio ácido (Gramates et al., 2016). Estos dominios están implicados en la activación de la transcripción, pues ayudan a estabilizar a la maquinaria transcripcional (Melcher, 2000). La interpretación más parsimoniosa según los datos obtenidos es que *amfos* ayuda a que *kay* pueda desempeñar sus funciones como factor de transcripción, esto según la interacción genética y la delección de los 89 nucleótidos. Teniendo esta información en cuenta y en conjunto con el resultado de la combinación heteroalélica *Thar<sup>1+/-</sup>*, *kay<sup>1+/-</sup>*, así como la delección parcial del dominio ácido rico en ácido aspártico en *Thar<sup>1</sup>*, es razonable especular que los embriones mueren debido a que *amfos* y *kayak* no se encuentran lo suficientemente balanceados como para poder activar la transcripción y así activar los genes de respuesta de la vía de la cinasa de Jun.

Otra posibilidad que podría explicar fenotipos mutantes es que Amfos no se encuentra en la región subnuclear apropiada, pues el dominio de poli-serinas predicho por UniProt (Consortium, 2018), puede estar involucrado en la localización de algunas proteínas (Wolf et al., 2013) (Li et al., 2013). Este dominio está ausente en *Thar<sup>1</sup>*. Esta posibilidad es menos plausible, pues el dominio de serinas en los casos citados es más extenso, aunque no se puede descartar la posibilidad, debido a que dicho dominio es bastante variable en su estructura. Se puede también proponer que la relación Amfos-Kay se deba a otras razones: uno podría regular transcripcionalmente al otro, por ejemplo.

## Conclusiones

El gen *amfos* es necesario para el desarrollo embrionario de *D. melanogaster*, esto es evidente, pues los alelos de falta de función impiden que la mosca de la fruta pueda completar su ciclo de vida y el embrión muere con fenotipos claros y cuantificables que incluyen letalidad temprana apertura dorsal e involución de la cabeza deficiente. Cuantificar los fenotipos de los alelos permitió realizar la serie alélica  $I(3)7E103+21 > Thar1 > mab2 > mab1$ , la cual está ordenada del alelo más fuerte al más débil. La interacción entre *amfos* y *kayak* ocurre entre todos los alelos probados, con lo cual se comprueba que la interacción genética entre estos genes no es alelo específica; este resultado es contundente, pues la



letalidad sintética o no complementación no alélica solo ocurre entre genes que tienen una función muy estrecha, es por este motivo que los dobles heterocigotos de *amfos* y *kayak* no complementan. En este trabajo se encontraron dos lesiones moleculares una en el alelo *Thar*<sup>1</sup> con una deleción que elimina un dominio involucrado en la activación de la transcripción, y el otro cambio en la secuencia de nucleótidos encontrado fue el alelo *mab*<sup>2</sup> tiene un cambio en el extremo 5', estos cambios explican parcialmente los defectos en esos alelos, aunque es necesario secuenciar los alelos por completo para obtener la evidencia de si existen otras lesiones en estos.

## Función(es) de *amfos*

Un claro ejemplo de que existen genes que fueron aislados durante la época cuando surge la genética del desarrollo y a la fecha no se ha entendido la función es el gen *amfos*. Alelos mutantes de *amfos* fueron aislados independientemente en varias mutagénesis en los ochentas. Sin embargo, nunca fueron caracterizados (Lewis et al., 1980; Kaufman et al., 1990; Jürgens et al., 1984). A pesar de ello han pasado más de treinta años de haberse aislado los alelos mutantes, no se ha publicado nada sobre este gen, vital en el desarrollo. Se debe de continuar con la caracterización de *amfos*, pues el fenotipo de letalidad embrionaria hace evidente su importancia en el desarrollo. Conocer el mecanismo por el cual actúa el gen de este estudio también serviría para entender mejor los ortólogos en otros organismos, como el humano (Gramates et al., 2016).

*Drosophila melanogaster* es un excelente modelo genético para explorar si *amfos* tiene funciones similares a sus ortólogos. Algunas de las cualidades del modelo de *D. melanogaster* es que se pueden realizar estudios que serían complicados en otros organismos. La facilidad con la que se pueden obtener nuevos alelos por distintas técnicas de mutagénesis, así como la fina manipulación genética, hacen que este sistema sea muy ventajoso (Tolwinski, 2017).

Un ortólogo en humanos de *amfos* es SHQ1, que desempeña tareas fundamentales como el ensamblaje de la enzima telomerasa con el RNA templado y el ensamblaje de otras ribonucleoproteínas encargadas de procesar el pre-mRNA durante el empalme ó splicing (Grozdanov et al., 2009) (Walbott et al., 2011). Esto sugiere que *Amfos* podría requerirse para el procesamiento de RNAs. El dominio SHQ1 que posee podría estar más relacionado con el ensamble de ribonucleoproteínas diferentes a la telomerasa, porque los telómeros en *D. melanogaster* son mantenidos por los retrotransposones HeT-A, TART y Tahre y no por una telomerasa (Mason, Frydrychova, & Biessmann, 2008).



Es necesario estudiar si *amfos* es capaz de regular ribonucleoproteínas como SHQ1, e identificar las posibles dianas. Las dianas de SHQ1 se requieren en el procesamiento de pre-mRNAs durante el splicing (Grozdanov et al., 2009). Teniendo en cuenta el fenotipo letal embrionario inducido por los alelos mutantes de *amfos* y en adición a ello, las tareas que realiza su ortólogo, es posible imaginar escenarios donde Amfos regula de manera indirecta el procesamiento de genes del desarrollo.

## Perspectivas

En experimentos futuros es necesario estudiar la localización de *amfos* y saber si varía en distintos momentos del desarrollo, con la finalidad de caracterizar mejor su mecanismo de acción. También es importante comprobar la unión física entre Kay y Amfos, estudiar si co-localizan en vivo en el núcleo y/o en el citoplasma en las mismas regiones del embrión.

A pesar de que los picos de expresión de *amfos* ocurren durante el desarrollo, según Flybase (Gramates et al., 2016), no se puede eliminar la posibilidad de que sea requerido en otras fases como la larvaria o en el adulto, es por ello importante obtener alelos que muestren defectos, pero permitan el desarrollo temprano, para así analizar si *amfos* tiene otras funciones que no podemos analizar debido a la letalidad embrionaria. Alternativamente, se pueden generar clones de células homocigotas mutantes en tejidos seleccionados, en un organismo heterocigoto, en diferentes estadios del desarrollo.

Finalmente, explorar la relevancia de genes compartidos en distintos organismos es de gran importancia para entender cómo es que en diferentes sistemas pueden funcionar de maneras similares o si es el caso, entender como un gen que inicialmente tenía una función en organismos menos derivados, terminó implicado en otros procesos y saber si estos fenómenos a pesar de parecer tan diferentes podrían tener algún aspecto en común.

## Referencias

- Alfonso-Gonzalez, C. (2018). ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS KAYAK-RA, KAYAK-RG Y KAYAK-RF EN LA EMBRIOGÉNESIS DE *Drosophila melanogaster*. *Universidad Autónoma de Querétaro*.
- Andreu, M. J., Gonzalez-Perez, E., Ajuria, L., Samper, N., Gonzalez-Crespo, S., Campuzano, S., & Jimenez, G. (2012). Mirror represses pipe expression in follicle cells to initiate dorsoventral axis formation in *Drosophila*. *Development*, 139(6), 1110–1114. <https://doi.org/10.1242/dev.076562>
- Arn, E. A., Cha, B. J., Theurkauf, W. E., & Macdonald, P. M. (2003). Recognition of a bicoid mRNA localization signal by a protein complex containing Swallow, Nod, and

RNA binding proteins. *Developmental Cell*, 4(1), 41–51.  
[https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00397-0](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00397-0)

- Bassett, A. R., & Liu, J. L. (2014). CRISPR/Cas9 and Genome Editing in *Drosophila*. *Journal of Genetics and Genomics*, 41(1), 7–19.  
<https://doi.org/10.1016/j.jgg.2013.12.004>
- Baumgartner, S., Littleton, J. T., Broadie, K., Bhat, M. A., Harbecke, R., Lengyel, J. A., ... Bellen, H. J. (1996). A *Drosophila* neurexin is required for septate junction and blood-nerve barrier formation and function. *Cell*, 87(6), 1059–1068.  
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81800-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81800-0)
- Beckingham, K. M., Armstrong, J. D., Texada, M. J., Munjaal, R., & Baker, D. A. (2005). *Drosophila melanogaster*—the model organism of choice for the complex biology of multi-cellular organisms. *Gravitational and Space Biology Bulletin : Publication of the American Society for Gravitational and Space Biology*, 18(2), 17–29. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16038090>
- Benton, R., Palacios, I. M., & Johnston, D. S. (2002). *Drosophila* 14-3-3 / PAR-5 Is an Essential Mediator of PAR-1 Function in Axis Formation. *Developmental Cell*, 3, 659–671.
- Berleth, T., Maya, B., Gudrun, T., Daniel, B., Sibyll, R., Gabriella, F., ... Christiane, N.-V. (1988). The role of localization of bicoid RNA in organizing the anterior pattern of the *Drosophila* embryo. *The EMBO Journal*, 7(6), 1749–1756.  
<https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1988.tb03004.x>
- Bienz, M. (1997). Endoderm induction in *Drosophila*: the nuclear targets of the inducing signals. *Current Biology*, 324(5926), 440–441.  
[https://doi.org/10.1126/science.324\\_440d](https://doi.org/10.1126/science.324_440d)
- Biswas, R., Stein, D., & Stanley, E. R. (2005). *Drosophila* Dok is required for embryonic dorsal closure. *Development*, 133(2), 217–227. <https://doi.org/10.1242/dev.02198>
- Bogoyevitch, M. A., & Kobe, B. (2006). Uses for JNK: the Many and Varied Substrates of the c-Jun N-Terminal Kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(4), 1061–1095. <https://doi.org/10.1128/mubr.00025-06>
- Brendza, R. P., Serbus, L. R., Duffy, J. B., & Saxton, W. M. (2000). A Function for Kinesin I in the Posterior Transport of oskar mRNA and Staufen Protein, 289(5487), 2120–2122.
- Campos-Ortega, J. A., & Hartenstein, V. (1985). *The Development of Drosophila melanogaster*.
- Casanova, J., & Struhl, G. (1989). Localized surface activity of torso, a receptor tyrosine kinase, specifies terminal body pattern in *Drosophila*. *Genes and Development*, 3(12 B), 2025–2038. <https://doi.org/10.1101/gad.3.12b.2025>
- Cavener, D. R., Ottelson, D. C., & Kaufman, T. C. (1986). A rehabilitation of the genetic map of the 84B-D region in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 114(1), 111–123.
- Cha, B. J., Koppetsch, B. S., & Theurkauf, W. E. (2001). In vivo analysis of *drosophila* bicoid mRNA localization reveals a novel microtubule-dependent axis specification pathway. *Cell*, 106(1), 35–46. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00419-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00419-6)

- Chasan, R., Jin, Y., & Anderson, K. V. (1992). Activation of the easter zymogen is regulated by five other genes to define dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo, *616*, 607–616.
- Chen, B., Chu, T., Harms, E., Gergen, J. P., & Strickland, S. (1998). Mapping of *Drosophila* Mutations Using Site-Specific Male Recombination. *Genetics Society of America*, *17*, 1–7. Retrieved from papers2://publication/uuid/AE5B9C4F-45F2-48FE-B912-5824CA39DE72
- Chen, H.-W., Marinissen, M. J., Oh, S.-W., Chen, X., Melnick, M., Perrimon, N., ... Hou, S. X. (2002). CKA, a Novel Multidomain Protein, Regulates the JUN N-Terminal Kinase Signal Transduction Pathway in *Drosophila*. *Molecular and Cellular Biology*, *22*(6), 1792–1803. <https://doi.org/10.1128/mcb.22.6.1792-1803.2002>
- Cho, P. F., Gamberi, C., Cho-Park, Y. A., Cho-Park, I. B., Lasko, P., & Sonenberg, N. (2006). Cap-Dependent Translational Inhibition Establishes Two Opposing Morphogen Gradients in *Drosophila* Embryos. *Current Biology*, *16*(20), 2035–2041. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.08.093>
- Choi, W., Jung, K.-C., Fanning, A. S., Peifer, M., Beitel, G. J., Bhat, M. A., & Nelson, K. S. (2011). The single *Drosophila* ZO-1 protein Polychaetoid regulates embryonic morphogenesis in coordination with Canoe/afadin and Enabled. *Molecular Biology of the Cell*, *22*(12), 2010–2030. <https://doi.org/10.1091/mbc.e10-12-1014>
- Chou, T., & Perrimon, N. (1996). The Autosomal FLP-DFS Technique for Generating Germline Mosaics in. *Genetics*, *144*, 1673–1679.
- Cohen, S. M., & Jürgens, G. (1990). Mediation of *Drosophila* head development by gap-like segmentation genes. *Letters To Nature*, *346*, 818–822. <https://doi.org/10.1038/346183a0>
- Consortium, T. U. (2018). UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), D506–D515. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1049>
- Craven, S. E., & Bretz, D. S. (1998). PDZ proteins organize synaptic signaling pathways. *Cell*, *93*, 495–498.
- Doerflinger, H., Benton, R., Torres, I. L., Zwart, M. F., & St Johnston, D. (2006). *Drosophila* Anterior-Posterior Polarity Requires Actin-Dependent PAR-1 Recruitment to the Oocyte Posterior. *Current Biology*, *16*(11), 1090–1095. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.04.001>
- Driever, W., & Nüsslein-Volhard, C. (1988). A gradient of bicoid protein in *Drosophila* embryos. *Cell*, *54*(1), 83–93. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90182-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90182-1)
- El-Gebali, S., Mistry, J., Bateman, A., Eddy, S. R., Luciani, A., Potter, S. C., ... Finn, R. D. (2019). The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), D427–D432. <https://doi.org/10.1093/nar/gky995>
- Eltsov, M., Dubé, N., Yu, Z., Pasakarnis, L., Haselmann-Weiss, U., Brunner, D., & Frangakis, A. S. (2015). Quantitative analysis of cytoskeletal reorganization during epithelial tissue sealing by large-volume electron tomography. *Nature Cell Biology*, *17*(5), 605–614. <https://doi.org/10.1038/ncb3159>
- Ephrussi, A., Dickinson, L. K., & Lehmann, R. (1991). Oskar Organizes the Germ Plasm and Directs Localization of the Posterior Determinant Nanos. *Cell*, *66*(1), 37–50.

[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90137-N](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90137-N)

- Ephrussi, A., & St. Johnston, D. (2004). Seeing Is Believing: The Bicoid Morphogen Gradient Matures. *Cell*, *116*(2), 143–152. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00037-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00037-6)
- Erickson, M. R. S., Galletta, B. J., & Abmayr, S. M. (1997). *Drosophila* myoblast city encodes a conserved protein that is essential for myoblast fusion, dorsal closure, and cytoskeletal organization. *Journal of Cell Biology*, *138*(3), 589–603. <https://doi.org/10.1083/jcb.138.3.589>
- Fan, Y., Tang, C., Klein, J. D., Peng, J. C., Yang, X., & Qu, C. (2016). c-Fos Repression by Piwi Regulates *Drosophila* Ovarian Germline Formation and Tissue Morphogenesis. *PLoS Genetics*, *12*(9), e1006281. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006281>
- Fehon, R. G., Dawson, I. A., & Artavanis-Tsakonas, S. (1994). A *Drosophila* homologue of membrane-skeleton protein 4.1 is associated with septate junctions and is encoded by the coracle gene. *Development (Cambridge, England)*, *120*(3), 545–557. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8162854>
- Fernandez, R., Takahashi, F., Liu, Z., Steward, R., Stein, D., & Stanley, E. R. (2000). The *Drosophila* Shark tyrosine kinase is required for embryonic dorsal closure. *Genes and Development*, *14*(5), 604–614.
- Ferrandon, D., Koch, I., Westhof, E., & Nu, C. (1997). RNA–RNA interaction is required for the formation of specific bicoid mRNA 3' UTR–STAU-FEN ribonucleoprotein particles. *The EMBO*, *16*(7), 1751–1758.
- Finkelstein, R., & Perrimon, N. (1990). The orthodenticle gene is regulated by bicoid and torso and specifies *Drosophila* head development. *Letters To Nature*, *346*, 485–488. <https://doi.org/10.1038/346183a0>
- 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. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6411748>
- Forrest, K. M., Clark, I. E., Jain, R. A., & Gavis, E. R. (2004). Temporal complexity within a translational control element in the nanos mRNA. *Development*, *131*(23), 5849–5857. <https://doi.org/10.1242/dev.01460>
- Frohnhofer, H. G., & Nusslein-Volhard, C. (1986). Organization of anterior pattern in the *Drosophila* embryo by the maternal gene bicoid. *Nature*, *324*, 120–126. <https://doi.org/10.1038/320129a0>
- Fujioka, M., Emi-Sarker, Y., Yusibova, G. L., Goto, T., & Jaynes, J. B. (1999). Analysis of an even-skipped rescue transgene reveals both composite and discrete neuronal and early blastoderm enhancers, and multi-stripe positioning by gap gene repressor gradients. *Development*, *126*(11), 2527–2538. <https://doi.org/10.1126/science.1145893>
- Galindo, R. L., Edwards, D. N., Gillespie, S. K., & Wasserman, S. A. (1995). Interaction of the pelle kinase with the membrane-associated protein tube is required for transduction of the dorsoventral signal in *Drosophila* embryos. *Development*, *121*(7),

2209–2218. Retrieved from  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7635064](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7635064)

Gao, Q., & Finkelstein, R. (1998). Targeting gene expression to the head: the *Drosophila* orthodenticle gene is a direct target of the Bicoid morphogen. *Development*, 125(21), 4185–4193. Retrieved from  
<http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=9753673&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers3://publication/uuid/B4DFBC6D-0319-4159-9295-0CCCCCE9A3740>

García-Fernández, B., Martínez-Arias, A., & Jacinto, A. (2007). Dpp signalling orchestrates dorsal closure by regulating cell shape changes both in the amnioserosa and in the epidermis. *Mechanisms of Development*, 124(11–12), 884–897.  
<https://doi.org/10.1016/j.mod.2007.09.002>

Garlana, R. A., Gonda, R. L., Green, A. B., Pileggi, R. M., & Stronach, B. (2010). Regulation of mixed-lineage kinase activation in JNK-dependent morphogenesis. *Journal of Cell Science*, 123(18), 3177–3188. <https://doi.org/10.1242/jcs.063313>

Gavis, E. R., & Lehmann, R. (1992). Localization of nanos RNA controls embryonic polarity. *Cell*, 71(2), 301–313. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90358-J](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90358-J)

Giesen, K., Lammel, U., Langehans, D., Krukkert, K., Bunse, I., & Klämbt, C. (2003). Regulation of glial cell number and differentiation by ecdysone and Fos signaling. *Mechanisms of Development*, 120(4), 401–413. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(03\)00009-1](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(03)00009-1)

Glise, B., Bourbon, H., & Noselli, S. (1995). hemipterous encodes a novel drosophila MAP kinase kinase, required for epithelial cell sheet movement. *Cell*, 83(3), 451–461. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90123-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90123-X)

Glise, B., & Noselli, S. (1997a). c signalling pathways in *Drosophila* morphogenesis: Glise, B. and Noselli, S. *Genes Dev.* 11, 1738–1747  
Glise, B. (1997). Coupling of JUN amino-terminal kinase and decapentaplegic signalling pathways in. *Trends in Genetics*, 13(10), 392. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9525\(97\)90012-3](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9525(97)90012-3)

Glise, B., & Noselli, S. (1997b). Coupling of Jun amino-terminal kinase and decapentaplegic signalling pathways in *Drosophila* morphogenesis. *Trends in Genetics*, 13(10), 392. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9525\(97\)90012-3](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9525(97)90012-3)

González-Reyes, A., Elliot, H., & Johnston, D. S. (1995). Polarization of both major body axes in *Drosophila* by gurken-torpedo signalling. *Nature*.

Gramates, L. S., Marygold, S. J., Santos, G. dos, Urbano, J.-M., Antonazzo, G., Matthews, B. B., ... Zhou, P. (2016). FlyBase at 25: looking to the future. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D663–D671. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1016>

Grossniklaus, U., Cadigan, K. M., & Gehring, W. J. (1994). Three maternal coordinate systems cooperate in the patterning of the *Drosophila* head. Gehring, W. Jd. *Development (Cambridge, England)*, 120, 3155–3171. Retrieved from  
<http://dev.biologists.org/content/develop/120/11/3155.full.pdf>



- Grozdanov, P. N., Roy, S., Kittur, N., & Meier, U. T. (2009). SHQ1 is required prior to NAF1 for assembly of H/ACA small nucleolar and telomerase RNPs. *Rna*, *15*(6), 1188–1197. <https://doi.org/10.1261/rna.1532109>
- Hachet, O., & Ephrussi, A. (2004). Splicing of oskar RNA in the nucleus is coupled to its cytoplasmic localization. *Nature*, *428*(6986), 959–963. <https://doi.org/10.1038/nature02483>
- Harden, N., Loh, H. Y., Chia, W., & Lim, L. (1995). A dominant inhibitory version of the small GTP-binding protein Rac disrupts cytoskeletal structures and inhibits developmental cell shape changes in *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)*, *121*(3), 903–914. Retrieved from <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=7720592&retmode=ref&cmd=prlinks>
- Harden, N., Ricos, M., Ong, Y. M., Chia, W., & Lim, L. (1999). Participation of small GTPases in dorsal closure of the *Drosophila* embryo: distinct roles for Rho subfamily proteins in epithelial morphogenesis. *Journal of Cell Science*, *112* ( Pt 3, 273–284. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9885281>
- Harding, K., Hoey, T., Warrior, R., & Levine, M. (1989). Autoregulatory and gap gene response elements of the even-skipped promoter of *Drosophila*. *EMBO Journal*, *8*(4), 1205–1212.
- Hashimoto, C., Hudson, K. L., & Anderson, K. V. (1988). The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell*, *52*(2), 269–279. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90516-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90516-8)
- Hildreth, P. E., & Lucchesi, J. C. (1963). Fertilization in *Drosophila*. I. Evidence for the regular occurrence of monospermy. *Developmental Biology*, *278*, 262–278.
- Hough, C. D., Woods, D. F., Park, S., & Bryant, P. J. (1997). Organizing a functional junctional complex requires specific domains of the *Drosophila* MAGUK Discs large. *Genes and Development*, *11*(23), 3242–3253. <https://doi.org/10.1101/gad.11.23.3242>
- Illmensee, K., & Mahowald, A. P. (1974). Transplantation of Posterior Polar Plasm in *Drosophila*. Induction of Germ Cells at the Anterior Pole of the Egg (cytoplasmic determinants/transplantation of cytoplasm/germ-line mosaics/insect embryogenesis), *71*(4), 1016–1020.
- Jacinto, A., Wood, W., Balayo, T., Turmaine, M., Martinez-Arias, A., & Martin, P. (2000). Dynamic actin-based epithelial adhesion and cell matching during *Drosophila* dorsal closure. *Current Biology*, *10*(22), 1420–1426. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00796-X](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00796-X)
- Jacinto, A., Wood, W., Woolner, S., Hiley, C., Turner, L., Wilson, C., ... Martin, P. (2002). Dynamic analysis of actin cable function during *Drosophila* dorsal closure. *Current Biology*, *12*(14), 1245–1250. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00955-7](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00955-7)
- Jacinto, A., Woolner, S., & Martin, P. (2004). Dynamic Analysis of Dorsal Closure in *Drosophila*. *Developmental Cell*, *3*(1), 9–19. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(02\)00208-3](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(02)00208-3)
- Jaeger, J. (2011). The gap gene network. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *68*(2), 243–274. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0536-y>

- Jankovics, F., & Brunner, D. (2006). Transiently Reorganized Microtubules Are Essential for Zippering during Dorsal Closure in *Drosophila melanogaster*. *Developmental Cell*, 11(3), 375–385. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.07.014>
- Jürgens, G., Wieschaus, E., Nüsslein-Volhard, C., & Kluding, H. (1984). Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster* II. Zygotic loci on the third chromosome. *Roux's Arch Dev Biol*, 193(5), 283–295. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1007/BF00848157>
- Kaltschmidt, J. A., Lawrence, N., Morel, V., Balayo, T., García Fernández, B., Pelissier, A., ... Martinez Arias, A. (2002). Planar polarity and actin dynamics in the epidermis of *Drosophila*. *Nature Cell Biology*, 4(12), 937–944. <https://doi.org/10.1038/ncb882>
- Kaufman, T. C., Seeger, M. A., & Olsen, G. (1990). Molecular and genetic organization of the antennapedia gene complex of *Drosophila melanogaster*. *Advances in Genetics*, 27(C), 309–362. [https://doi.org/10.1016/S0065-2660\(08\)60029-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2660(08)60029-2)
- Kidd, S. (1992). Characterization of the *Drosophila cactus* locus and analysis of interactions between cactus and dorsal proteins. *Cell*, 71(4), 623–635. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90596-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90596-5)
- Kiehart, D. P., Crawford, J. M., Venakides, S., Aristotelous, A., & Edwards, G. S. (2017). Cell Sheet Morphogenesis: Dorsal Closure in *Drosophila melanogaster* as a Model System. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 33(1), 169–202. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-111315-125357>
- Kiehart, D. P., Galbraith, C. G., Edwards, K. A., Rickoll, W. L., & Montague, R. A. (2000). Multiple Forces Contribute to Cell Sheet Morphogenesis for Dorsal Closure in *Drosophila*. *The Journal of Cell Biology*, 149(2), 471–490. Retrieved from <https://doi.org/10.1083/jcb.149.2.471>
- Kiyokawa, E., Hashimoto, Y., Kobayashi, S., Sugimura, H., Kurata, T., & Matsuda, M. (1998). Activation of Rac1 by a Crk SH3-binding protein, DOCK180. *Genes & Development*, 12(21), 3331–3336. <https://doi.org/10.1101/gad.12.21.3331>
- Kockel, L., Zeitlinger, J., Staszewski, L. M., Mlodzik, M., & Bohmann, D. (1997). Jun in *Drosophila* development: redundant and nonredundant functions and regulation by two MAPK signal transduction pathways. *Genes & Development*, 11(13), 1748–1758. <https://doi.org/10.1101/gad.11.13.1748>
- Lamb, R. S., Ward, R. E., Schweizer, L., & Fehon, R. G. (1998). *Drosophila* coracle, a Member of the Protein 4.1 Superfamily, Has Essential Structural Functions in the Septate Junctions and Developmental Functions in Embryonic and Adult Epithelial Cells. *Molecular Biology of the Cell*, 9(December), 3505–3519.
- Lehmann, R., & Nüsslein-Volhard, C. (1991). The maternal gene nanos has a central role in posterior pattern formation of the *Drosophila* embryo. *Development (Cambridge, England)*, 112(3), 679–691. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1935684>
- Lehmann, Ruth, & Nüsslein-Volhard, C. (1986). Abdominal segmentation, pole cell formation, and embryonic polarity require the localized activity of oskar, a maternal gene in *Drosophila*. *Cell*, 47(1), 141–152. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90375-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90375-2)



- Lewis, R. A., Kaufman, T. C., Denell, R. E., & Tollerico, P. (1980). Genetic analysis of the Antennapedia gene complex (ANT-C) and adjacent chromosomal regions of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, *95*(2), 367–381.
- Li, S. J., Qi, Y., Zhao, J. J., Li, Y., Liu, X. Y., Chen, X. H., & Xu, P. (2013). Characterization of nuclear localization signals (NLSs) and function of NLSs and phosphorylation of serine residues in subcellular and subnuclear localization of Transformer-2 $\alpha$  (Tra2 $\beta$ ). *Journal of Biological Chemistry*, *288*(13), 8898–8909. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.456715>
- Little, S. C., Tkačik, G., Kneeland, T. B., Wieschaus, E. F., & Gregor, T. (2011). The formation of the bicoid morphogen gradient requires protein movement from anteriorly localized mRNA. *PLoS Biology*, *9*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000596>
- Luo, M. -j., & Reed, R. (2002). Splicing is required for rapid and efficient mRNA export in metazoans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*(26), 14937–14942. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.26.14937>
- Ma, X., Shao, Y., Zheng, H., Li, M., Li, W., & Xue, L. (2013). Src42A modulates tumor invasion and cell death via Ben/dUev1a-mediated JNK activation in *Drosophila*. *Cell Death and Disease*, *4*(10), 1–7. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.392>
- Mahowald, A. P. (1963). Ultrastructural differentiations during formation of the blastoderm in the *Drosophila melanogaster* embryo. *Developmental Biology*, *8*(2), 186–204. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(63\)90041-1](https://doi.org/10.1016/0012-1606(63)90041-1)
- Mahowald, A. P. (1971). Polar granules of *Drosophila*. III. The continuity of polar granules during the life cycle of *Drosophila*. *Journal of Experimental Zoology*, *176*(3), 329–343. <https://doi.org/10.1002/jez.1401760308>
- Mahowald, & Hardy. (1985). Genetics of *Drosophila* Embryogenesis. *Annual Reviews*, 149–1477.
- Martín-Blanco, E., Gampel, A., Ring, J., Virdee, K., Kirov, N., Tolkovsky, A. M., & Martínez-Arias, A. (1997). puckered encodes a phosphatase that mediates a feedback loop regulating JNK activity during dorsal closure in *Drosophila*. *Genes & Development*, *12*(4), 557–570. <https://doi.org/10.1101/gad.12.4.557>
- Martín-Blanco, E., Pastor-Pareja, J. C., & García-Bellido, A. (2000). JNK and decapentaplegic signaling control adhesiveness and cytoskeleton dynamics during thorax closure in *Drosophila*. *PNAS*, *97*(14), 1–6. Retrieved from <papers2://publication/uuid/2E4F5451-28E4-41AF-946D-FECB3DB3F37C>
- Martin, P., & Parkhurst, S. M. (2004). Parallels between tissue repair and embryo morphogenesis. *Development*, *131*(13), 3021–3034. <https://doi.org/10.1242/dev.01253>
- Martínez-Arias, A., & Lawrence, P. A. (1985). Parasegments and compartments in the *Drosophila* embryo. *Nature*, *313*(6004), 639–642. <https://doi.org/10.1038/313639a0>
- Mason, J. M., Frydrychova, R. C., & Biessmann, H. (2008). *Drosophila* telomeres: An exception providing new insights. *BioEssays*, *30*(1), 25–37. <https://doi.org/10.1002/bies.20688>
- Melcher, K. (2000). The strength of acidic activation domains correlates with their affinity for both transcriptional and non-transcriptional proteins. *Journal of Molecular Biology*,

301(5), 1097–1112. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4034>

Miyamoto, H., Nihonmatsu, I., Kondo, S., Ueda, R., Togashi, S., Hirata, K., ... Yamamoto, D. (2007). canoe encodes a novel protein containing a GLGF/DHR motif and functions with Notch and scabrous in common developmental pathways in *Drosophila*. *Genes & Development*, 9(5), 612–625. <https://doi.org/10.1101/gad.9.5.612>

Mlodzik, M., Gibson, G., & Gehring, W. J. (1990). Effects of ectopic expression of caudal during *Drosophila* development. *Development*, 109(2), 271–277.

Montell, D. J., Keshishian, H., & Spradling, A. C. (1991). Laser ablation studies of the role of the *Drosophila* oocyte nucleus in pattern formation. *Science*, 254(5029), 290–293. <https://doi.org/10.1126/science.1925585>

Mundorf, J., Frommolt, P., Wagle, P., Külshammer, E., Uhlirva, M., & Kilinc, M. (2015). Interplay among *Drosophila* transcription factors Ets21c, Fos and Ftz-F1 drives JNK-mediated tumor malignancy. *The Company of Biologist*, 8(10), 1279–1293. <https://doi.org/10.1242/dmm.020719>

Murata, Y., & Wharton, R. P. (1995). Binding of pumilio to maternal hunchback mRNA is required for posterior patterning in *drosophila* embryos. *Cell*, 80(5), 747–756. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90353-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90353-4)

Nelson, M. R., Leidal, A. M., & Smibert, C. A. (2004). *Drosophila* Cup is an eIF4E-binding protein that functions in Smaug-mediated translational repression. *EMBO Journal*, 23(1), 150–159. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600026>

Neuman-Silberberg, F. S., & Schüpbach, T. (1993). The *drosophila* dorsoventral patterning gene *gurken* produces a dorsally localized RNA and encodes a TGF $\alpha$ -like protein. *Cell*, 75(1), 165–174. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(05\)80093-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(05)80093-5)

Nijman, S. M. B. (2011). Synthetic lethality: General principles, utility and detection using genetic screens in human cells. *FEBS Letters*, 585(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.11.024>

Nolan, K. M., Barrett, K., Lu, Y., Hu, K.-Q., Vincent, S., & Settleman, J. (1998). Myoblast city, the *Drosophila* homolog of DOCK180/CED-5, is required in a Rac signaling pathway utilized for multiple developmental processes. *Genes and Development*, 12(21), 3337–3342. <https://doi.org/10.1101/gad.12.21.3337>

Noselli, S. (1998). JNK Signaling and Morphogenesis in *Drosophila*. *Elsevier*, 33–38(1).

Noselli, S., & Agné, F. (1999). Roles of the JNK signaling pathway in *Drosophila* morphogenesis. *Current Opinion in Genetics and Development*, 466–472.

Pasakarnis, L., Frei, E., Caussin, E., Affolter, M., & Brunner, D. (2016). Amnioserosa cell constriction but not epidermal actin cable tension autonomously drives dorsal closure. *Nature Cell Biology*, 18(11), 1161–1172. <https://doi.org/10.1038/ncb3420>

Payre, F. (2004). Genetic control of epidermis differentiation in *Drosophila*. *International Journal of Developmental Biology*, 48(2–3), 207–215. <https://doi.org/10.1387/ijdb.15272387>

Perrimon, N. (1988). The maternal effect of lethal(1)discs-large-1: A recessive oncogene of *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology*, 127(2), 392–407.

[https://doi.org/10.1016/0012-1606\(88\)90326-0](https://doi.org/10.1016/0012-1606(88)90326-0)

- Polaski, S., Whitney, L., Barker, B. W., & Stronach, B. (2006). Genetic analysis of slipper/mixed lineage kinase reveals requirements in multiple Jun-N-terminal kinase-dependent morphogenetic events during *Drosophila* development. *Genetics*, *174*(2), 719–733. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.056564>
- Price, J. V., Clifford, R. J., & Schüpbach, T. (1989). The maternal ventralizing locus torpedo is allelic to faint little ball, an embryonic lethal, and encodes the *Drosophila* EGF receptor homolog. *Cell*, *56*(6), 1085–1092. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90641-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90641-7)
- Rearick, D., Prakash, A., McSweeney, A., Shepard, S. S., Fedorova, L., & Fedorov, A. (2011). Critical association of ncRNA with introns. *Nucleic Acids Research*, *39*(6), 2357–2366. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1080>
- Reed, B. H., Wilk, R., Schöck, F., & Lipshitz, H. D. (2004). Integrin-dependent apposition of *Drosophila* extraembryonic membranes promotes morphogenesis and prevents anoikis. *Current Biology*, *14*(5), 372–380. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.02.029>
- Rickoll, W. L., & Counce, S. J. (1980). Morphogenesis in the embryo of *Drosophila melanogaster* - Germ band extension. *Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology*, *188*(3), 163–177. <https://doi.org/10.1007/BF00849045>
- Ricos, M. G., Harden, N., Sem, K. P., Lim, L., & Chia, W. (1999). Dcdc42 acts in TGF-beta signaling during *Drosophila* morphogenesis: distinct roles for the Drac1/JNK and Dcdc42/TGF-B cascades in cytoskeletal regulation. *Journal of Cell Science*, *112*(8), 1225–1235.
- Riese, J., Tremml, G., & Bienz, M. (1997). D-Fos, a target gene of Decapentaplegic signaling required during *Drosophila* endoderm induction. *Development*, *3361*, in press.
- Riesgo-escovar, J. R., & Hafen, E. (1997). *Drosophila* JN kinase regulates expression of decapentaplegic via the ETS-domain protein AOP and the AP-1 transcription factor DJUN during dorsal closure: Riesgo-Escovar, J. and Hafen, E. *Genes Dev.* *11*, 1717–1727. *Genes & Development*, *13*(10), 1717–1727. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9525\(97\)90015-9](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9525(97)90015-9)
- Riesgo-Escovar, J. R., & Hafen, E. (1997). Common and Distinct Roles of DFos and DJun During *Drosophila* Development. *Science*, *278*(5338), 669–672. <https://doi.org/10.1126/science.278.5338.669>
- Riesgo-Escovar, Juan R., Jenni, M., Fritz, A., & Hafen, E. (1996). The *Drosophila* jun-N-terminal kinase is required for cell morphogenesis but not for DJun-dependent cell fate specification in the eye. *Genes and Development*, *10*(21), 2759–2768. <https://doi.org/10.1101/gad.10.21.2759>
- Ríos-Barrera, L. D., & Riesgo-Escovar, J. R. (2013). Regulating cell morphogenesis: The *drosophila* jun N-terminal kinase pathway. *Genesis*, *51*(3), 147–162. <https://doi.org/10.1002/dvg.22354>
- Rivera-Pomar, R., & Jäckle, H. (1996). From gradients to stripes in *Drosophila* embryogenesis: Filling in the gaps. *Trends in Genetics*, *12*(11), 478–483. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(96\)10044-5](https://doi.org/10.1016/0168-9525(96)10044-5)

- Rivera-Pomar, R., Lu, X., Perrimon, N., Taubert, H., & Jäckle, H. (1995). Activation of posterior gap gene expression in the *Drosophila* blastoderm. *Nature*.
- Roehrdanz, R. L., & Lucchesi, J. C. (1980). Mutational events in the triplo- and haplo-lethal region (83DE) of the *Drosophila melanogaster* genome. *Genetics*, *95*(2), 355–366.
- Roote, J., & Russell, S. (2012). Toward a complete *Drosophila* deficiency kit. *Genome Biology*, *13*(3), 6–8. <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-3-149>
- Roth, S., Stein, D., & Nüsslein-Volhard, C. (1989). A gradient of nuclear localization of the dorsal protein determines dorsoventral pattern in the *Drosophila* embryo. *Cell*, *59*(6), 1189–1202. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90774-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90774-5)
- Rushlow, C. A., Han, K., Manley, J. L., & Levine, M. (1989). The Graded Distribution of the dorsal Morphogen Is Initiated by Selective Nuclear Transport in *Drosophila*, *59*, 1165–1177.
- Saffman, E. E., & Lasko, P. (1999). Germline development in vertebrates and invertebrates. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *55*(9), 1144–1163. <https://doi.org/10.1007/s000180050363>
- Schnorrer, F., Bohmann, K., & Nusslein-Volhard, C. (2000). The molecular motor dynein is involved in targeting swallow and bicoid RNA to the anterior pole of *Drosophila* oocytes. *Nature Cell Biology*, *2*(4), 185–190. <https://doi.org/10.1038/35008601>
- Sen, J., Goltz, J. S., Stevens, L., & Stein, D. (1998). Spatially restricted expression of pipe in the *Drosophila* egg chamber defines embryonic dorsal-ventral polarity. *Cell*, *95*(4), 471–481. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81615-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81615-3)
- Simpson-Brose, M., Treisman, J., & Desplan, C. (1994). Synergy between the hunchback and bicoid morphogens is required for anterior patterning in *Drosophila*. *Cell*, *78*(5), 855–865. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(94\)90622-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(94)90622-X)
- Spradling, A. C. (1993). Germline cysts: Communes that work. *Cell*, *72*(5), 649–651. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90393-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90393-5)
- Stein, D. S., & Stevens, L. M. (2014). Maternal control of the *Drosophila* dorsal-ventral body axis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, *3*(5), 301–330. <https://doi.org/10.1002/wdev.138>
- Steward, R., Ambrosio, L., & Schedl, P. (1985). Expression of the dorsal gene. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, *50*, 223–228. <https://doi.org/10.1101/SQB.1985.050.01.028>
- Steward, Ruth. (1989). Relocalization of the dorsal protein from the cytoplasm to the nucleus correlates with its function. *Cell*, *59*(6), 1179–1188. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90773-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90773-3)
- Stronach, B., & Perrimon, N. (2001). Investigation of leading edge formation at the interface of amnioserosa and dorsal ectoderm in the *Drosophila* embryo. *Development*, *128*(15), 2905–2913. Retrieved from data:jacinto:Journals:Development:Stronach Perrimon 01.pdf
- Stronach, Beth, & Perrimon, N. (2002). Activation of the JNK pathway during dorsal closure in *Drosophila* requires the mixed lineage kinase, slipper. *Genes and Development*, *16*(3), 377–387. <https://doi.org/10.1101/gad.953002>



- Su, Y.-C., Treisman, J. E., & Skolnik, E. Y. (1998). The Drosophila Ste20-related kinase misshapen is required for embryonic dorsal closure and acts through a JNK MAPK module on an evolutionarily conserved signaling pathway. *Genes and Development*, 12(15), 2371–2380. <https://doi.org/10.1101/gad.12.15.2371>
- Suozi, K. C., Wu, X., & Fuchs, E. (2012). Spectraplakins: Master orchestrators of cytoskeletal dynamics. *Journal of Cell Biology*, 197(4), 465–475. <https://doi.org/10.1083/jcb.201112034>
- Takács, Z., Jankovics, F., Vilmos, P., Lénárt, P., Röper, K., & Erdélyi, M. (2017). The spectraplakins Short stop is an essential microtubule regulator involved in epithelial closure in Drosophila. *Journal of Cell Science*, 130(4), 712–724. <https://doi.org/10.1242/jcs.193003>
- Takahashi, K., Matsuo, T., Katsube, T., Ueda, R., & Yamamoto, D. (2002). Direct binding between two PDZ domain proteins Canoe and ZO-1 and their roles in regulation of the Jun N-terminal kinase pathway in Drosophila morphogenesis. *Mechanisms of Development*, 78(1–2), 97–111. [https://doi.org/10.1016/s0925-4773\(98\)00151-8](https://doi.org/10.1016/s0925-4773(98)00151-8)
- Tolwinski, N. (2017). Introduction: Drosophila—A Model System for Developmental Biology. *Journal of Developmental Biology*, 5(3), 9. <https://doi.org/10.3390/jdb5030009>
- Tycowski, K. T., Shu, M. D., & Steitz, J. A. (1993). A small nucleolar RNA is processed from an intron of the human gene encoding ribosomal protein S3. *Genes and Development*, 7(7 A), 1176–1190. <https://doi.org/10.1101/gad.7.7a.1176>
- Underwood, E. M., Caulton, J. H., Allis, C. D., & Mahowald, A. P. (1980). Developmental fate of pole cells in Drosophila melanogaster. *Developmental Biology*, 77(2), 303–314. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(80\)90476-5](https://doi.org/10.1016/0012-1606(80)90476-5)
- Vogt, P. K. (2001). Jun, the oncoprotein. *Oncogene*, 20(19 REV. ISS. 2), 2365–2377. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204443>
- Walbott, H., Machado-Pinilla, R., Liger, D., Blaud, M., Réty, S., Grozdanov, P. N., ... Leulliot, N. (2011). The H/ACA RNP assembly factor SHQ1 functions as an RNA mimic. *Genes and Development*, 25(22), 2398–2408. <https://doi.org/10.1101/gad.176834.111>
- Warn, R. M., & Magrath, R. (1983). F-Actin Distribution During The Cellularization Of The Drosophila Embryo Visualized With FL-Phalloidin. *Experimental Cell Research*, 143, 103–114.
- Warn, R. M., Magrath, R., & Webb, S. (1984). Distribution of F-actin during cleavage of the Drosophila syncytial blastoderm. *Journal of Cell Biology*, 98(1), 156–162. <https://doi.org/10.1083/jcb.98.1.156>
- Westholm, J. O., & Lai, E. C. (2011). Mirtrons: MicroRNA biogenesis via splicing. *Biochimie*, 93(11), 1897–1904. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.06.017>
- Wolf, A., Mantri, M., Heim, A., Müller, U., Fichter, E., Mackeen, M. M., ... Böttger, A. (2013). The polyserine domain of the lysyl-5 hydroxylase Jmjd6 mediates subnuclear localization. *Biochemical Journal*, 453(3), 357–370. <https://doi.org/10.1042/bj20130529>
- Woolner, S., Jacinto, A., & Martin, P. (2005). The small GTPase Rac plays multiple roles in

epithelial sheet fusion - Dynamic studies of *Drosophila* dorsal closure. *Developmental Biology*, 282(1), 163–173. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.03.005>

Wu, Y. C., & Horvitz, H. R. (1998). *C. elegans* phagocytosis and cell-migration protein CED-5 is similar to human DOCK180. *Nature*, 392(6675), 501–504. <https://doi.org/10.1038/33163>

Zalokar, M. (1976). Autoradiographic Study of Protein and RNA Formation Development of *Drosophila* Eggs during. *Developmental Biology*, 437, 425–437.

Zeitlinger, J., & Bohmann, D. (1999). Thorax closure in *Drosophila* : involvement of Fos and the JNK pathway. *Development*, 3956, 3947–3956.

Zeitlinger, J., Kockel, L., Peverali, F. A., Jackson, D. B., Mlodzik, M., & Bohmann, D. (1997). Defective dorsal closure and loss of epidermal decapentaplegic expression in *Drosophila* fos mutants. *EMBO Journal*, 16(24), 7393–7401. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.24.7393>

Zhao, T., Graham, O. S., Raposo, A., & St Johnston, D. (2012). Growing microtubules push the oocyte nucleus to polarize the *Drosophila* dorsal-ventral axis. *Science*, 336(6084), 999–1003. <https://doi.org/10.1126/science.1219147>

Zimyanin, V. L., Belaya, K., Pecreaux, J., Gilchrist, M. J., Clark, A., Davis, I., & St Johnston, D. (2008). In Vivo Imaging of oskar mRNA Transport Reveals the Mechanism of Posterior Localization. *Cell*, 134(5), 843–853. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.06.053>