



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**PROPIEDAD DE LA FACULTAD
DE QUÍMICA DE LA U.A.Q.**

**"CARACTERIZACIÓN DEL GEN *acal*
EN *Drosophila melanogaster*"**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

FABIOLA SARAI ESPINOSA GÓMEZ

DIRIGIDA POR

Dr. JUAN RAFAEL RIESGO ESCOVAR

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2007.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“CARACTERIZACIÓN DEL GEN *acal*
EN *Drosophila melanogaster*”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

FABIOLA SARAI ESPINOSA GÓMEZ

DIRIGIDA POR

Dr. JUAN RAFAEL RIESGO ESCOVAR

SINODALES

Dr. JUAN RAFAEL RIESGO ESCOVAR
DIRECTOR

Dra. ROSALIA REYNOSO CAMACHO
SINODAL

Dra. GUADALUPE GARCIA ALCOCER
SINODAL

Dra. MA. TERESA PEÑA RANGEL
SINODAL

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
ÍNDICE DE CUADROS	iii
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 <i>Drosophila melanogaster</i>	3
II.2 Ciclo de vida	3
II.3 Embriogénesis de <i>Drosophila melanogaster</i>	5
II.3.1 Divisiones del blastodermo sincisial	5
II.3.2 Gastrulación	5
II.3.3 Extensión de la banda germinal	7
II.3.4 Retracción de la banda germinal	8
II.3.5 Segmentación de la banda germinal	8
II.3.6 Cerrado Dorsal	10
II.3.7 Involución de la cabeza	13
II.4 Vía JNK	13
II.5 Mutaciones y elementos transponibles	16
II.6 Elementos transponibles en <i>Drosophila</i>	17
II.7 Sitio de inserción del transposón P{SUPor-P} KG09113	20
III. HIPÓTESIS	22
IV. OBJETIVOS	23
IV.1 General	23
IV.2 Específicos	23
V. METODOLOGÍA	24
V.1 Materiales	24
V.1.1 Reactivos	25
V.2 Métodos	26

VI. RESULTADOS	36
VII. DISCUSIONES	51
VIII. CONCLUSIONES	54
IX. BIBLIOGRAFIA	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i> .	4
2	Etapas del desarrollo embrionario de <i>Drosophila melanogaster</i> .	9
3	Proceso de cerrado dorsal en la embriogénesis de <i>Drosophila</i> .	12
4	Vía de Señalización de Tipo MAPK.	15
5	Fenómeno de disgénesis híbrida.	18
6	Mecanismo de transposición.	19
7	Sitio de inserción del Transposón P{SUPor-P} KG09113.	21
8	Embrión control de P{SUPor-P} KG09113, sin anomalías Fenotípicas.	38
9	Cutículas de embriones con el alelo mutante F40 derivado de la escisión del transposón P{SUPor-P} KG09113.	39
10	Cutículas de embriones con el alelo mutante F46b derivado de la escisión del transposón P{SUPor-P} KG09113.	40
11	Cutículas de embriones con el alelo mutante F40 derivado de la escisión del transposón P{SUPor-P} KG09113.	41
12	Flanqueo de la zona aledaña a la inserción transposón P{SUPor-P} KG09113.	47
13	Amplificación por PCR para las líneas alélicas generadas.	48
14	Southern blot.	49

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Alelos generados por la escisión del transposón en la línea KG09113 (F10, F14, F21, F40, F46b y F53).	37
2	Porcentajes de apertura y número de segmentos afectados que presentan los embriones de la línea F40.	42
3	Número de segmentos afectados en F40.	42
4	Porcentajes de apertura y número de segmentos afectados que presentan los embriones de la línea F46b.	43
5	Frecuencia de segmentos afectados en la línea F46b	43
6	Porcentajes de apertura y número de segmentos afectados que presentan los embriones de la línea F53.	44
7	Frecuencia de segmentos afectados en la línea F53.	44
8	Complementación Parcial (CP) entre las líneas estudiadas, por la presencia de filiales con las alas planas, sin cromosoma balanceador.	45
9	Cantidades encontradas en las pruebas de complementación en las diferentes líneas estudiadas.	46
10	Porcentajes la complementación que se observa en las diferentes líneas estudiadas.	46

RESUMEN

Actualmente las alteraciones genéticas tienen un papel fundamental en el campo de la investigación, ya que suelen desembocar en el descubrimiento de nuevos genes. Dichas alteraciones en algunos genes repercuten en el buen desarrollo de los organismos. Durante la embriogénesis de *Drosophila melanogaster* ocurre un proceso llamado cerrado dorsal, que consiste en el cambio en la forma de las células de un epitelio derivado del ectodermo: las células del epitelio lateral. Esto ocurre hacia la mitad de la embriogénesis de *Drosophila*. Este epitelio forma una monocapa y al cambiar de forma cubre la parte dorsal del embrión. Individuos homocigotos mutantes del gen *aca1* no llegan a la etapa adulta, tienen defectos en el cerrado dorsal y, en consecuencia son letales embrionarios con un fenotipo de apertura dorsal característico. Mediante la observación del fenotipo con el análisis de cutículas se caracterizó el fenotipo mutante del gen *aca1* en el cerrado dorsal y, de acuerdo con el grado de lesión se generó una serie alelica. Mediante técnicas de biología molecular como PCR y Southern blot se caracterizó la zona de la inserción, caracterizando molecularmente escisiones imprecisas de la zona. Pruebas de complementación entre las series originadas indican que hay diferencia en los alelos generados.

I. INTRODUCCION

Tanto la biología celular como la genética del desarrollo se centran en entender los mecanismos por los cuales una célula acaba convirtiéndose en un organismo multicelular. Estos procesos morfogenéticos requieren la diferenciación de múltiples tipos celulares y la organización de células siguiendo patrones elaborados. Así, hoy en día las alteraciones genéticas en estos procesos juegan un papel fundamental en el campo de la investigación, ya que desembocan en el descubrimiento de nuevos genes. Dichas alteraciones en algunos genes repercuten en el buen desarrollo de los organismos. *Drosophila melanogaster* es un díptero que ofrece grandes ventajas para la realización de diversos estudios de biología, y ha sido crítico para comprender las bases genéticas del desarrollo animal, misma que sabemos tiene patrones universales. Otra de las ventajas de *Drosophila* se basa en la facilidad para introducir y combinar mutaciones en su genoma. De esta forma, el fenotipo mutante nos permite inferir la posible función de un gen durante el desarrollo. La posibilidad de insertar nuevo material genético en el genoma de *Drosophila* ha permitido la generación de diversas colecciones de mutantes, por lo que en la actualidad existen una gran cantidad de cepas de laboratorio usadas para la investigación. En el laboratorio de genética de transducción de señales del INB se aisló una nueva mutante con deficiencia en el cerrado dorsal, un proceso que ocurre durante la embriogénesis de *Drosophila melanogaster*. El cerrado dorsal, es un proceso que consiste en el cambio en la forma de las células de un epitelio derivado del ectodermo: las células del epitelio lateral; esto ocurre hacia la mitad de la embriogénesis de *Drosophila*. Este epitelio se encuentra a ambos lados del embrión formando una monocapa y al cambiar de forma cubre la parte dorsal del embrión, englobando e internalizando a las células de la amnioserosa, un epitelio extraembrionario. Al final del proceso el embrión está cerrado por la parte dorsal. Individuos homocigotos mutantes del gen *acal* no llegan a la etapa adulta, fallando en el cerrado dorsal, y en consecuencia son letales embrionarios con un agujero dorsal característico. Estas líneas mutantes, se generaron a través de la escisión de elementos P en el genoma de la mosca.

Los elementos P son segmentos de DNA transponibles que se movilizan dentro del genoma usando una fuente de transposasa. Para mantener las líneas en heterocigosis y obtener individuos viables heterocigotos se utiliza un cromosoma balanceador. Los cromosomas balanceadores son cromosomas que tienen múltiples rearrreglos y marcadores, y por lo tanto, son incapaces de aparearse y sufrir recombinación con sus homólogos durante la meiosis. En este trabajo se caracterizó fenotípicamente a los alelos de *acaI* y se estudió molecularmente la zona aledaña a la inserción del elemento P original, como parte de la caracterización del gen *acaI* en el proceso de cerrado dorsal.

II. ANTECEDENTES

II.1 *Drosophila melanogaster*

En la actualidad la investigación de la biología del desarrollo se ha enfocado a sistemas y modelos cuyo desarrollo embrionario es más fácil de estudiar que los modelos de mamíferos. Por esta y muchas otras razones, *Drosophila melanogaster* es uno de los organismos más estudiados, particularmente a nivel genético y genómico. A *Drosophila* se le conoce como la mosca de la fruta o del vinagre porque se siente atraída a la fruta madura o en fermentación y al vinagre. Además ha sido uno de los modelos mejor estudiados genéticamente. Recientemente se publicó la secuencia completa del genoma de *Drosophila* y ha posibilitado que se potencie la información acumulada, lo que junto con la colección de mutantes existente, amplía el campo para hacer análisis genético. Las ventajas, como organismo genético modelo, además de la localización genética y el genoma secuenciado se centran fundamentalmente en un tiempo de generación corto, una abundante descendencia y en un fácil mantenimiento debido a sus reducidas dimensiones. *Drosophila* tiene un tamaño aproximado de 3 mm de largo (Adams y col., 2000).

II.2 Ciclo de vida

El ciclo de vida de *Drosophila* incluye cuatro fases: huevo, larva, pupa y adulto. Debido a lo anterior, en *Drosophila* se puede estudiar procesos de proliferación y diferenciación en varias etapas del ciclo de vida. El ciclo de vida comienza cuando los adultos se aparean y ocurre la fecundación del huevo. Este da paso al desarrollo embrionario, que generalmente dura 24 horas a 25°C, y termina con la eclosión de la larva de 1er estadio. Esta sufre después dos mudas para pasar a larva de segundo y tercer estadio (en este último pasa aproximadamente de 3 a 4 días); después inicia la metamorfosis con la formación de la prepupa (de una hora

de duración) y el estadio de pupa que dura de 4 a 5 días. Finalmente de la pupa emerge el adulto (Figura 1) (Manning, 2003).

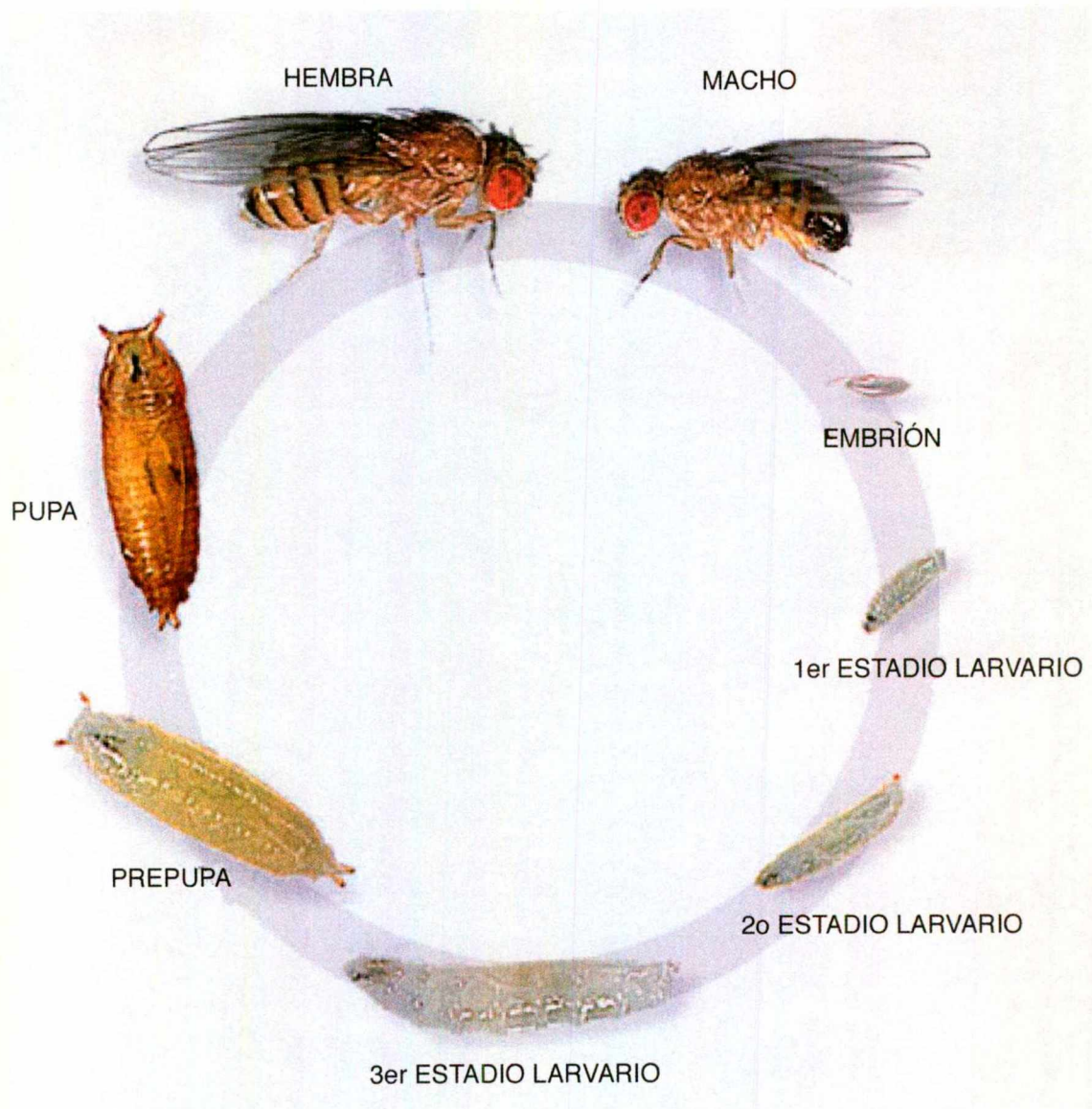


Figura 1. CICLO DE VIDA DE *Drosophila melanogaster*. Después de la fertilización del huevo se forma el embrión, que eclosiona en una larva, y esta madura pasando a través de sus diferentes estadios larvarios, hasta convertirse en pupa, en donde sufre la metamorfosis para dar origen a una mosca adulta (Weigmann y col., 2003).

II.3 Embriogénesis de *Drosophila melanogaster*

La corta duración del proceso de embriogénesis de *Drosophila* ha favorecido la investigación en este sistema, además de la facilidad de estudio del mismo. Por eso hoy día la embriogénesis de *Drosophila* es uno de los modelos de desarrollo mejor entendidos. La embriogénesis es un proceso continuo y corto en el cual ocurren cambios marcados desde que el huevo es fertilizado. Este proceso embrionario está organizado para su estudio en diferentes etapas (Ver figura 2), siendo estas un tanto artificiales y utilizadas con el objetivo de entender mejor el proceso embrionario (Mendoza, 2004). En seguida se detallan las etapas más importantes en el desarrollo embrionario de *Drosophila*:

II.3.1 Divisiones del blastodermo sincisial

Después de la fertilización, ocurren trece divisiones nucleares antes de la celularización, en lo que se conoce como la etapa del blastodermo sincisial. Existe una sincronía entre las primeras 7, y que conducen a un sincisio de 128 núcleos; durante las siguientes tres divisiones, los núcleos se aproximan a la superficie del huevo para formar el blastodermo sincisial. Después llevan a cabo cuatro ciclos mas de división en la periferia hasta que ocurre la celularización (cada núcleo se rodea de membrana plasmática), formando células somáticas que dan origen al blastodermo celular (Brody, 1996, Campos-Ortega y Hartenstein, 1997).

II.3.2 Gastrulación: cambios de forma celulares

En la gastrulación la formación de las capas germinales ocurre por la invaginación gradual de un bloque de células medio-ventrales, las cuales terminan formando una estructura tubular en el interior del embrión. Como resultado de la gastrulación, el embrión contiene cuatro primordios, que son: el mesodermo, el ectodermo, el intestino medio anterior y el intestino medio posterior, que forman juntos estos dos

últimos el endodermo. Estos primordios dan origen en conjunto a las tres capas germinales (Nazario, 2004).

En la gastrulación ocurren tres movimientos morfogenéticos principales:

1. La invaginación de la capa ventral,
2. La invaginación del intestino anterior y
3. La invaginación del intestino posterior.

Los cambios de forma celular posibilitan la formación del surco ventral, implicado en la formación del mesodermo (invaginación del surco ventral), y las invaginaciones del endodermo (invaginación anterior y posterior del intestino). Las células en la región medio ventral se constriñen apicalmente durante la formación del surco ventral. Una parte de la célula en la superficie del embrión se constriñe, conduciendo su citoplasma basamente (hacia el interior del embrión), adquiriendo la forma de una cuña con el extremo estrecho señalado en dirección apical (hacia el exterior del embrión). A consecuencia de este cambio de forma celular, las células adyacentes migran hacia el interior, desarrollando el surco. En el segundo paso la parte externa del surco ventral forma un canal estrecho transversal. Las células polares que son las células más posteriores del embrión y forman la línea germinal, se mueven en dirección anterodorsal, delimitadas por células del blastodermo. Posteriormente, estas células se hunden al interior del embrión en dirección rostral/ventral como una continuación del surco ventral para formar la invaginación amnioproctodeal. Al mismo tiempo ocurren cambios de forma en la parte dorsal media del embrión, así como la formación del surco cefálico. En el último paso de este proceso ocurre una compleja remodelación de la invaginación amnioproctodeal que conduce a la formación del primordio del intestino posterior (Campos-Ortega y Hartenstein, 1997).

Existen otros siete movimientos morfogenéticos que ocurren después de la invaginación del surco ventral y que son los siguientes:

1. formación del surco cefálico,
2. formación del los dobleces transversales dorsales,
3. extensión de la banda germinal,
4. retracción de la banda germinal,
5. segmentación,
6. cerrado dorsal e
7. involución de la cabeza (Campos-Ortega, 1997).

Además de estos procesos, otros tipos de movimientos celulares permiten la formación de las traqueas, los discos imaginales y la segregación de los neuroblastos del ectodermo (Mendoza, 2004). A continuación se describirán algunos de estos procesos.

II.3.3 Extensión de la banda germinal

La extensión de la banda germinal trae consigo un cambio drástico en el primordio ectodérmico y mesodérmico ya que estos se alargan y doblan, proceso que dura aproximadamente 105 minutos. Este alargamiento hace que se comprima a la amnioserosa. La amnioserosa es un tejido extraembrionario, y es el tejido más dorsal del embrión. Este proceso ocurre muy rápido durante la fase inicial y más lento al final. En la fase rápida aparece una indentación en el lado de la apertura amnioproctodeal, llamada doblez paraproctodeal. Durante la fase lenta, un grupo de células se invaginan en la extremidad anteroventral del huevo para formar el estomodeum (primordio anterior del endodermo), extendiéndose caudalmente para eventualmente establecer contacto con el primordio del intestino medio anterior endodermal. En esta elongación, el intestino delantero se divide en varios dominios, que darán origen al esófago y al proventrículo. En este proceso se incorporarán al intestino células ectodérmicas (Campos-Ortega y Hartenstein, 1997).

El ectodermo de la banda germinal está dividido en dos regiones definidas; una es medio ventral y consta de células largas -los neuroblastos- y la epidermis ventrolateral y la otra es lateral; la epidermis y las placodas traqueales derivan de esta región lateral. La neurogénesis es el desarrollo del sistema nervioso central. Este proceso empieza con la segregación de los neuroblastos de la capa ectodermal y ocurre en la fase rápida de la extensión de la banda germinal. Los neuroblastos se delaminan del epitelio y comienzan a dividirse para producir células madre ganglionares, que continúan proliferando para finalmente diferenciarse posteriormente en neuronas (Brody, 1996 y Campos-Ortega, 1997).

II.3.4 Retracción de la banda germinal

En este proceso morfogénético la banda germinal se retrae a la parte ventral. Durante este proceso el intestino posterior que se localiza en el extremo posterior del embrión se alarga y se fusiona con la parte anterior del intestino medio. Los segmentos que darán origen al árbol traqueal completo se unen y se forman las gónadas. Dado que se retrae la banda germinal del lado dorsal del embrión al final de la retracción este queda solo cubierto dorsalmente por las células de la amnioserosa. También se observa por primera vez claramente la metamerización del embrión (Campos-Ortega y Hartenstein 1997).

II.3.5 Segmentación de la banda germinal

La segmentación de la banda germinal se completa al final de la retracción de la misma. Se forman los canales ventrales y dorsales, correspondientes a los límites segmentales, siendo estos límites los sitios futuros de uniones musculares. Al final de la embriogénesis cada segmento podrá ser identificado de acuerdo a la cantidad y tipo de denticulos ventrales que contenga. En la segmentación también tiene lugar la segregación de los discos imaginales. Los discos imaginales son sacos de células que darán origen a estructuras adultas durante la metamorfosis (Campos-Ortega y Hartenstein 1997).


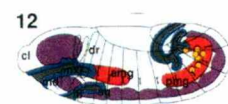

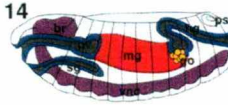
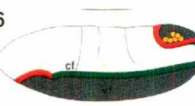
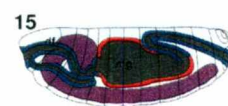
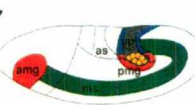

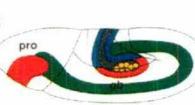
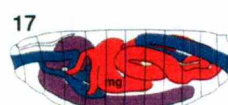


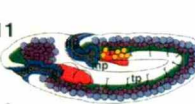
Etapa	Tiempo (hr:min)	Cambio Morfogénético	Etapa	Tiempo (hr:min)	Cambio Morfogénético
1-4 	0 – 2:10	Divisiones nucleares del blastodermo	12 	7:20 – 10:20	Retracción de la banda germinal
5 	2:10 – 2:50	Celularización del blastodermo	14 	10:20 – 13:00	Cerrado Dorsal – involución de la cabeza
6 	2:50 – 3:10	Gastrulación	15 		
7 			16 	13:00 – 22:00	Diferenciación
8 	3:10 – 7:20	Elongación de la banda germinal	17 		
9 			22	Eclosión a larva de primer estadio	
10 					
11 					

Figura 2. Etapas del desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster*. Se ilustran los eventos que ocurren desde la fertilización del huevo hasta la diferenciación (Hartenstein, 1993).

II.3.6 Cerrado Dorsal

El cerrado dorsal de *Drosophila* es un proceso morfogenético que ocurre aproximadamente entre 8 y 12 horas después de fertilizado el huevo y corresponde a las etapas 12-15 de la embriogénesis (Scuderi y Letsou, 2005).

Este proceso de cerrado dorsal consiste en el cambio en la forma de las células de un epitelio derivado del ectodermo: las células del epitelio lateral. Este epitelio se encuentra a ambos lados del embrión formando una monocapa. Estas células laterales del epitelio cambian de forma estirándose, de forma que cubren la parte dorsal del embrión, englobando e internalizando a las células de la amnioserosa, hasta encontrarse en la parte media dorsal del mismo. La amnioserosa, está expuesta en la parte dorsal del embrión después de la retracción de la banda germinal; estas células se delaminan y sufren apoptosis durante el cerrado dorsal. Al final de este proceso el embrión está cubierto en su aspecto dorsal (ver Figura 3) (Riesgo-Escovar y Hafen, 1997).

El proceso del cerrado dorsal se ha estudiado como un modelo de cambio de forma celular y de la manera en que esto se regula. Por lo tanto se han propuesto dos categorías de genes que intervienen en este proceso:

1. Genes estructurales del citoesqueleto. Estos genes codifican para proteínas del citoesqueleto.
2. Genes de vías de comunicación celular. Estos genes forman parte de las vías transductoras que controlan el cambio de forma (Riesgo-Escovar y Hafen, 1997).

Al inicio de este proceso las células más dorsales de la epidermis lateral se elongan en el eje dorso-ventral; esto está asociado con la acumulación apical de actina y miosina-II no muscular. Esta línea de células limitantes o más dorsales de la

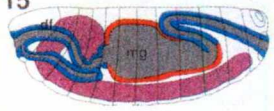
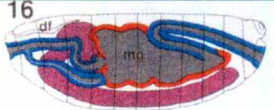
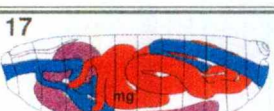
15			
16		13:00 –22:00	Diferenciación
17			
		22	Eclosión a larva de primer estadio

Figura 2. Etapas del desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster*. Se ilustran los eventos que ocurren desde la fertilización del huevo hasta la diferenciación (Hartenstein, 1993).

II.3.6 Cerrado Dorsal

El cerrado dorsal de *Drosophila* es un proceso morfogenético que ocurre aproximadamente entre 8 y 12 horas después de fertilizado el huevo y corresponde a las etapas 12-15 de la embriogénesis (Scuderi y Letsou, 2005).

Este proceso de cerrado dorsal consiste en el cambio en la forma de las células de un epitelio derivado del ectodermo: las células del epitelio lateral. Este epitelio se encuentra a ambos lados del embrión formando una monocapa. Estas células laterales del epitelio cambian de forma estirándose, de forma que cubren la parte dorsal del embrión, englobando e internalizando a las células de la amnioserosa, hasta encontrarse en la parte media dorsal del mismo. La amnioserosa, está expuesta en la parte dorsal del embrión después de la retracción de la banda germinal; estas células se delaminan y sufren apoptosis durante el cerrado dorsal. Al final de este proceso el embrión está cubierto en su aspecto dorsal (ver Figura 3) (Riesgo-Escovar y Hafen, 1997).

epidermis se denominan Leading edge (LE) o células de la hilera guía. También forman estructuras ricas en fosfotirosina en forma de nodos que al parecer son uniones adherentes que contribuyen a la organización del citoesqueleto en las células LE. Esta acumulación actúa como un aparato contráctil, controlando la elongación de las células en dirección antero-posterior. La elongación se inicia en las células LE y después se transmite a células más ventrales de la epidermis. Las células LE generan filopodia y lamelipodia, estructuras ricas en actina que contactan a la amnioserosa y se desplazan sobre ella hasta tocar las células LE del lado opuesto. Estos eventos requieren cambios regulados de la fisiología interna de las células epiteliales, así como del citoesqueleto y la membrana plasmática, y además la interacción y adhesión de vías de señalización involucradas en este proceso. Sin embargo no hay división celular, siendo todas las células del epitelio lateral celular postmitótico (Harden, 2002).

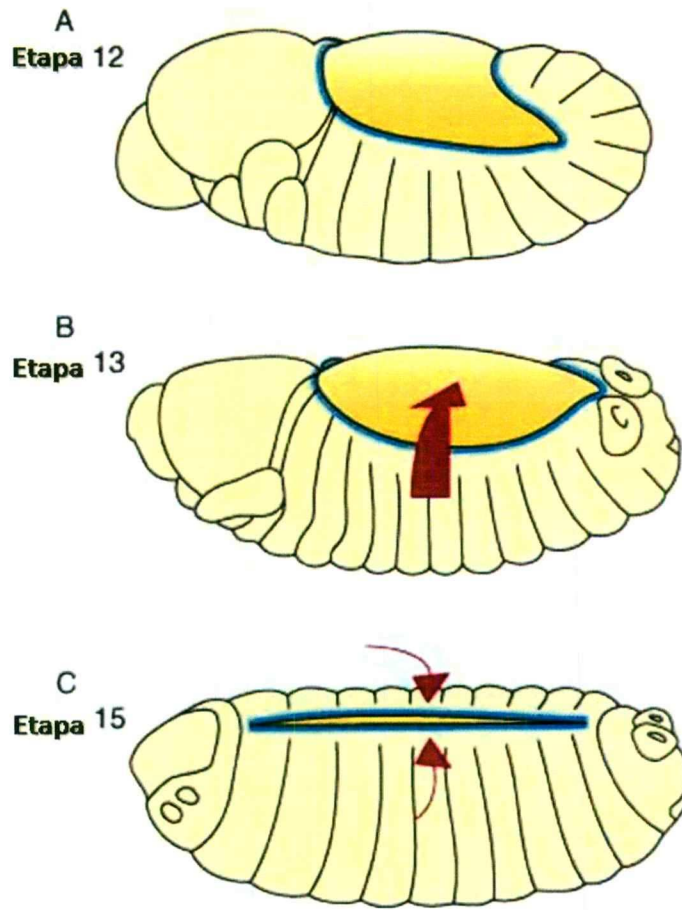


Figura 3. Proceso de cerrado dorsal en la embriogénesis de *Drosophila*. (A) Retracción de la banda germinal, dejando al descubierto a la amnioserosa por la parte dorsal (amarilla). (B) activación y elongación de las células del leading edge (hilera guía) (azul). Después las células más ventrales del epitelio lateral se alargan, también hacia la parte dorsal del embrión (flecha). (C) Finalmente, las células del leading edge se unen y sellan al embrión por la parte dorsal media (Zeitlinger, 2002).

Se ha demostrado que los cambios de forma de las células epidermicas ocurridos en el cerrado dorsal son regulados por vías de señalización. El cerrado dorsal esta regulado por genes de la vía DJNK (Jun N-terminal cinasa) y Dpp/TGF- β (factor de crecimiento- β) (Scuderi y Letsou, 2005).

Justo antes del cerrado dorsal, la vía DJNK se activa transitoriamente en la amnioserosa, posiblemente a través de la activación de DRac1, resultando en la contracción de la amnioserosa y la formación focal de complejos de adhesión con células vecinas del LE (Xia y Karin, 2004).

Después, la vía DJNK se activa en las células del LE e inicia el cambio de forma en estas células; activando la expresión de genes blanco, como dpp, el ligando de la vía de Dpp/TGF- β , que señala a las células ventrales al LE al cambio de forma (Riesgo-Escovar y Hafen, 1997).

II.3.7 Involución de la cabeza

Esta etapa coincide parcialmente con el cerrado dorsal; aquí el ectodermo anterior migra hacia el interior, comenzando con la invaginación estomodeal. Este proceso dura aproximadamente 5 horas, y estos movimientos afectan a los segmentos gnatales. Estos segmentos inician la formación del atrio, que consiste en las estructuras derivadas de los segmentos labial, mandibular y maxilar. Estos segmentos formarán en parte la apertura de la parte anterior del intestino delantero. La involución de la cabeza termina con el acortamiento del puente dorsal sobre el lóbulo procefálico y el clypeolabrum. Al final de este proceso, el embrión está formado y pronto a salir del huevo como larva de primer estadio (Campos-Hortega y Hartenstein, 1997).

II.4. Vía JNK

La transducción de señales involucra la comunicación entre células a través de moléculas secretadas como neurotransmisores, hormonas, factores de crecimiento o feromonas entre otras; estas moléculas son secretadas por células y que mandan señales a otras. Una cascada de transducción de señales es el proceso por el cual las moléculas señalizadoras (ligandos) se unen a receptores en las células blanco,

induciendo un cambio conformacional que internaliza la señal. Esta señal se va a transducir por medio de moléculas intermediarias que participan en las cascadas intracelulares, que en algunos casos activan genes específicos de respuesta inmediata para el crecimiento, la división y la diferenciación celular (Alberts y col., 1996).

La vía JNK pertenece a la familia del tipo MAPK ó cinasas activadas por mitogénos. La vía de JNK está conservada evolutivamente (Xia y Karin, 2004). Esta vía de tipo MAPK se piensa que se activa a través de un ligando que se une a un receptor de membrana de tipo tirosina cinasa; esta unión dimeriza el receptor, que puede ahora fosforilarse de manera cruzada y generar sitios de unión para proteínas adaptadoras. Estas, a su vez, se unen a proteínas que intercambian GDP por GTP en proteínas tipo ras, y estas proteínas tipo ras activan a su vez a cinasas, dando una serie de fosforilaciones en cascada que finalmente hacen que la MAPK fosforilada se trasloque al núcleo y regule factores de transcripción, mismos que inducirán la expresión de genes de respuesta inmediata (Gomperts y col., 2003, Harden, 2002).

La vía de JNK fue descubierta en células en cultivo de vertebrados y en levaduras como mediador de la respuesta al estrés celular. En respuesta a la activación de esta cascada, JNK puede fosforilar factores de transcripción como Jun (Zeitlinger y col., 1997).

Se sabe, como se dijo antes, que la vía JNK se requiere durante la embriogénesis de *Drosophila* para llevar a cabo el cerrado dorsal. Por esto *Drosophila* es un organismo conveniente para la disección genética de la vía de señalización JNK (ver Figura 4) (Riesgo-Escovar y col., 1996).

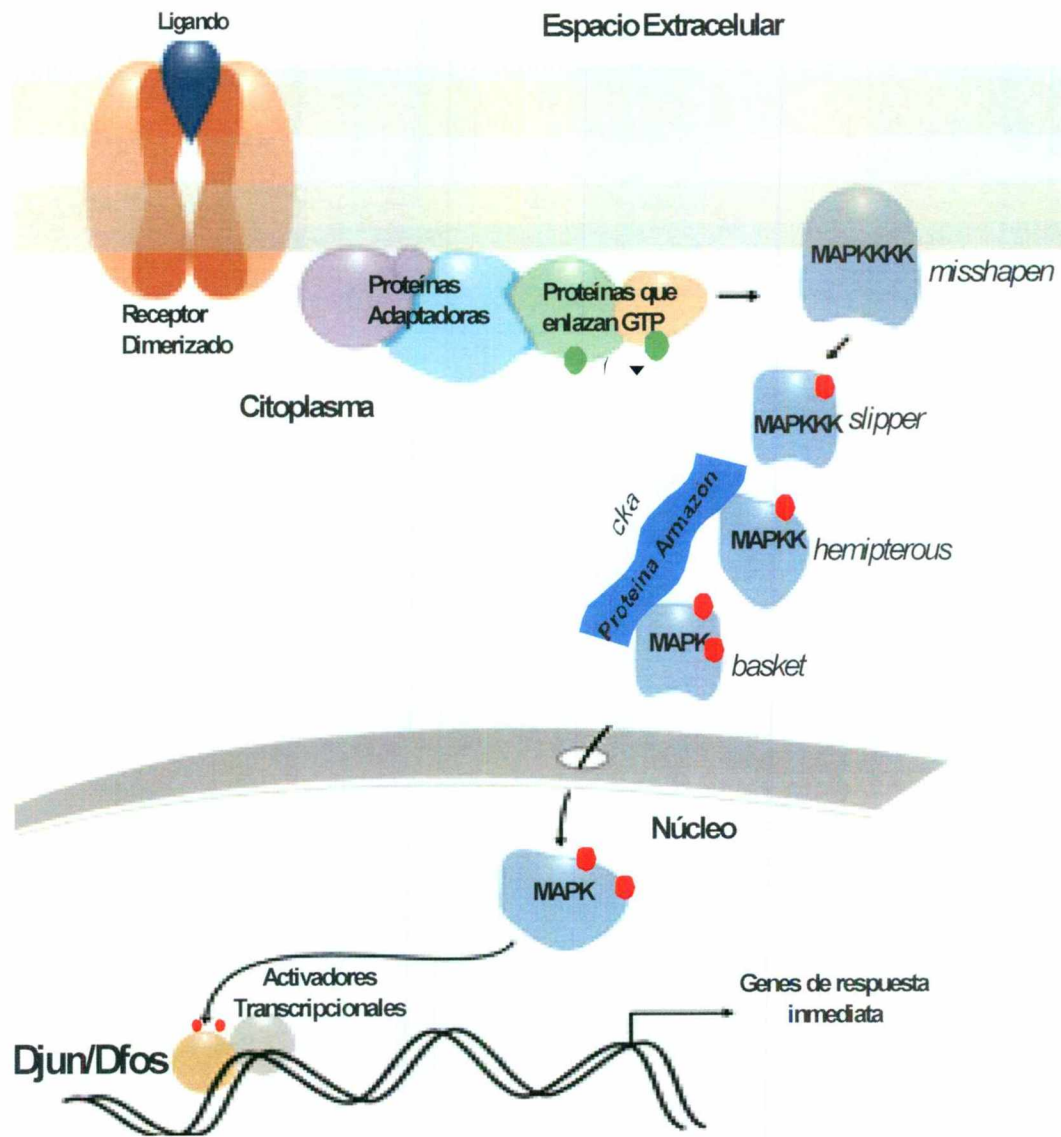


Figura 4. VIA DE SEÑALIZACIÓN JNK DE TIPO MAPK. La vía de señalización de tipo MAPK dirige la señal extracelular al núcleo a través de una serie de fosforilaciones en cascada, que activan a factores de transcripción, que finalmente regulan la transcripción de genes de respuesta inmediata. Del lado derecho se muestran los nombres de algunos de los genes homólogos en *Drosophila* para la vía.

II.5 Mutaciones y elementos transponibles

La mutación es un proceso biológico que ha estado presente desde que apareció la vida en nuestro planeta. Como tal es ciertamente un fenómeno atractivo y digno de ser estudiado. Los organismos tienden a presentar y a sufrir cambios de un estado hereditario a otro. Una mutación es cualquier cambio en el material genético que provoque una variación respecto a un alelo silvestre. En una mutación, el alelo de un gen sufre un cambio, convirtiéndose en un alelo diferente. Como consecuencia, una célula u organismo mutante puede presentar una variación fenotípica debido a la mutación. Estas mutaciones pueden ser tan sutiles que requieran de técnicas bioquímicas refinadas para poder detectar una diferencia en el fenotipo debido al alelo silvestre. Por otra parte pueden ser tan dramáticas como para provocar defectos morfológicos graves e incluso la muerte. Dichas mutaciones se pueden utilizar con dos propósitos: (1) para estudiar el proceso de mutación en si mismo, y (2) para analizar una función biológica desde un punto de vista genético (Griffiths y col., 2000).

Ya que *Drosophila* es un modelo fácil de manejar en este aspecto, se han realizado estudios a gran escala utilizando y/o generando cepas mutantes. La principal ventaja de esta aproximación es que permite el análisis de genes importantes para un determinado proceso sin que sea necesario un conocimiento a priori sobre su identidad o naturaleza molecular. En "screenings" o tamizajes genéticos convencionales, el genoma se mutageniza utilizando agentes químicos como el etil metano sulfonato (EMS) que provoca mutaciones puntuales con alta frecuencia o radiación ionizante para crear mutaciones que generalmente implican rearrreglos cromosómicos. Cada uno de estos mutágenos produce típicamente mutaciones que reducen o eliminan la función génica (Amorós, 2001).

Otra forma de crear mutaciones es mediante la inserción de transposones como los elementos P. Una ventaja de este método es que es muy fácil identificar el gen mutado usando al elemento P como etiqueta (Johnston, 2002).

Estos elementos transponibles son también conocidos como elementos genéticos móviles; son segmentos de DNA que pueden moverse a diferentes posiciones en el genoma, alterando el DNA original dentro de un organismo. La estructura mínima de un transposon consta de un gen de transposasa-enzima necesaria para la transposición; rodeado de repeticiones invertidas. Esta enzima corta en un sitio blanco y en los extremos del elemento transponible. Cada extremo del elemento transponible se liga, por su cadena sencilla, a cada extremo protuberante del corte en escalón del DNA. Algunos transposones pueden duplicar una copia del elemento en el sitio blanco, dejando una copia en el sitio original. En otros casos, la transposición implica la escisión directa del elemento y su reintegración en un sitio nuevo. Cuando los elementos se sitúan en medio de genes, interrumpen la secuencia codificadora e inactivan la expresión de este gen; de igual forma pueden bloquear la expresión de otros genes en el mismo operón si están aguas abajo del promotor del operón en organismos en donde existen los operones. Se han hallado transposones en bacteriófagos, bacterias, hongos, plantas superiores, virus, insectos y vertebrados (Griffiths y col., 2000).

II.6 Elementos transponibles en *Drosophila*

Hoy en día se piensa que muchas mutaciones espontáneas y reorganizaciones cromosómicas en *Drosophila* están causadas por elementos transponibles. Hasta el 10% del cromosoma de *Drosophila* puede estar compuesto por familias de secuencias de DNA repetitivo dispersas que pueden moverse como elementos discretos. Los elementos P se descubrieron como resultado del estudio de la disgénesis híbrida, un fenómeno que ocurre cuando hembras de estirpes de laboratorio de *Drosophila melanogaster* sin elementos P se aparean con machos procedentes de poblaciones naturales con elementos P. En tales cruzamientos, los stocks de laboratorio se dice que poseen un citotipo M, y los stocks naturales un citotipo P. En un entrecruzamiento M (hembra) X P (macho), la descendencia muestra un espectro de fenotipos sorprendentes que se manifiestan en la línea germinal, incluyendo esterilidad, tasa alta de mutación y una alta frecuencia de

aberraciones cromosómicas y fenómenos de no disyunción. Esta descendencia híbrida se denomina disgénica, o biológicamente deficiente. No se observa ningún efecto de disgénesis híbrida en la crucea recíproca de M (machos) X P (hembras) o en M x M o en P X P. La naturaleza inestable y la reversión de las mutaciones causada por la disgénesis híbrida, sugirió que ésta estaba causada por inserciones de un elemento móvil. Los elementos P codifican para una enzima transposasa y al represor de la transposasa. Ambos productos génicos provienen del mismo gen, por splicing alternativo. La transposasa es responsable de la movilización de los elementos P, mientras que el represor impide la producción de transposasa, bloqueando así la transposición del elemento (ver Figura 5) (Griffiths y col., 2000).

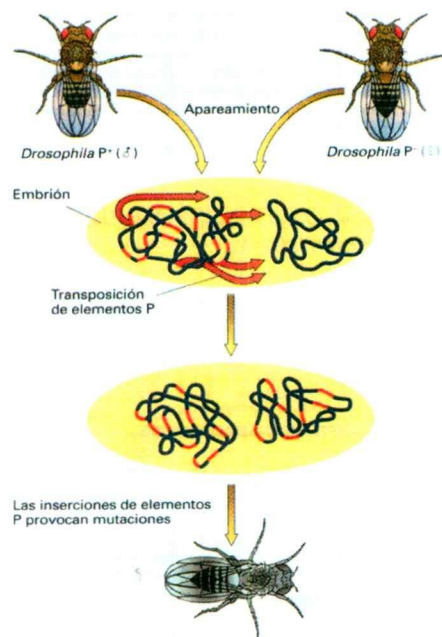


Figura 5. El fenómeno conocido como disgénesis híbrida es el resultado de la movilización de secuencias de DNA denominadas elementos P en los embriones de *Drosophila* (Griffiths y col., 2000).

Los elementos P silvestres varían de tamaño desde 0.5 Kb cuando se trata de fragmentos de elemento P hasta el de tipo silvestre de 2.9 Kb de longitud; constan de una repetición invertida de 31 pb en sus extremos, y además llevan un gen con

cuatro exones que codifica a la transposasa y al inhibidor de la misma (Ver figura 6) (Mendoza, 2004).

Los elementos P de *Drosophila* son útiles en el sentido de que se pueden realizar análisis genéticos dirigidos, como recuperar selectivamente líneas con genes mutados por inserción de elementos P. El elemento P se ha modificado para facilitar el análisis genético, introduciendo un segundo gen usado como marcador para identificar fácilmente su presencia. Estos marcadores pueden ser genes para color de ojos, de manera que así es más fácil seleccionar las transformantes. **Posteriormente** se puede obtener información molecular clonando el punto de inserción (Engels, 1996; Griffiths y col. 2000).

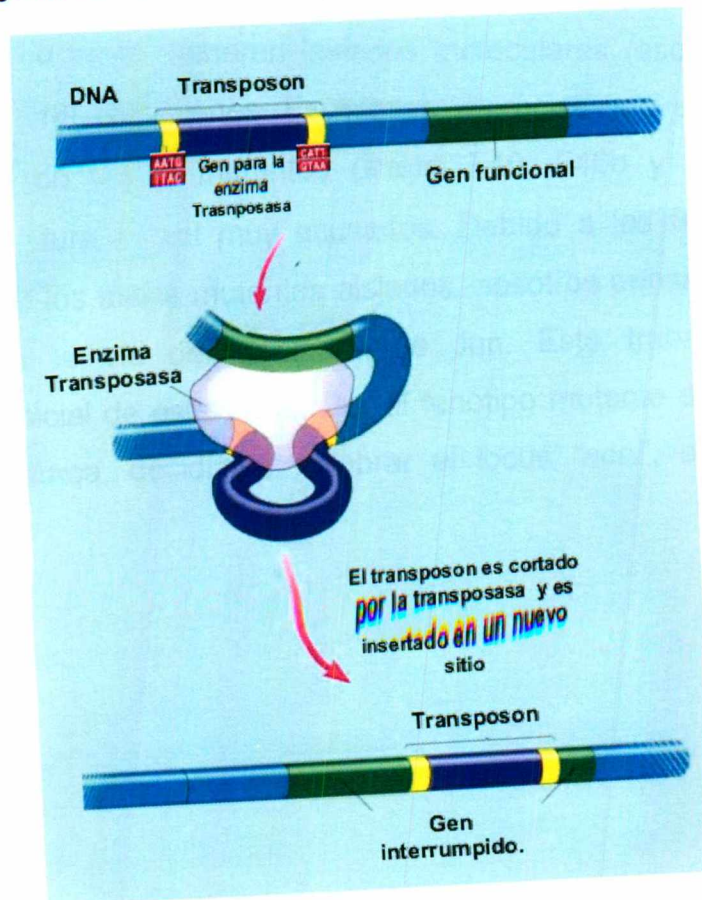


Figura 6. Mecanismo de transposición. Corte de la cadena en el sitio blanco y unión de la secuencia transponible a sitios nuevos.

D. Melanogaster
CROMOSOMA 2
BRAZO DERECHO

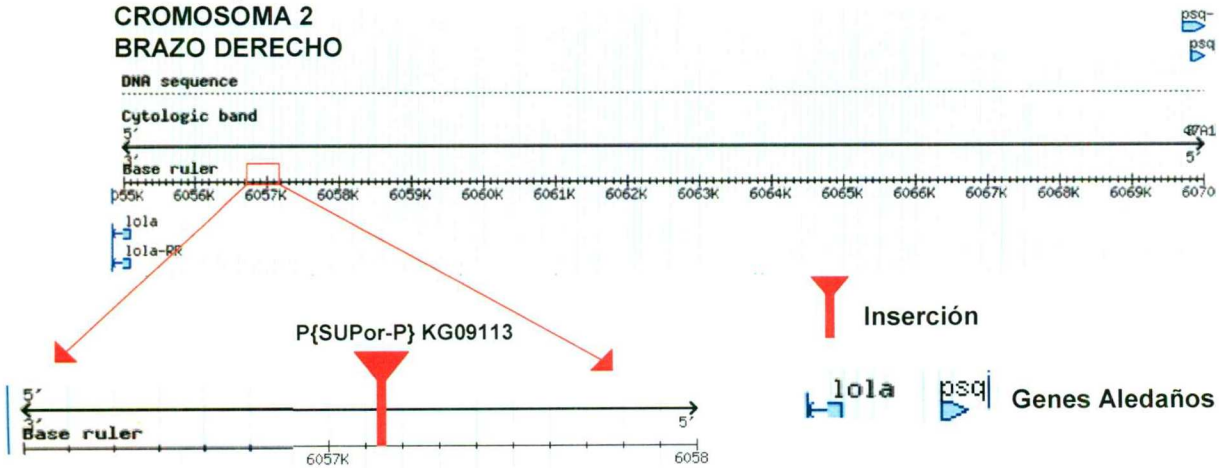


Figura 7. Sitio de inserción del transposón P{SUPor-P} KG09113 en el genoma de *Drosophila*. Este se halla insertado en el brazo derecho del segundo cromosoma (Tomado de Flybase, 2005).

IV. OBJETIVOS

IV.1 General

Caracterizar el gen *acal* y observar el fenotipo de cerrado dorsal en las líneas mutantes F53, F46b y F40 del locus.

IV.2 Específicos

- Analizar los fenotipos mutantes mediante el ensayo de cutículas.
- Realizar pruebas de complementación.
- Determinar lesiones moleculares mediante Southern blot.
- Realizar ensayos de PCR para poder determinar la precisión de la escisión caracterizando los alelos mutantes del gen.

V.1.1 Reactivos

Acetato de sodio

Ácido propiónico

Agar

Agarosa

Bromuro de etidio

CO₂ para anestesiar moscas

Etanol

Fenol

Heptano

Hipoclorito de sodio

Jugo de uva

Levadura

Metanol

Medio Hoyer

d-Nucleótidos

Oligonucleótidos.

Piloncillo

Proteinasa K

Radiactividad ³²P-dCTP

Oligos

Taq polimerasa

DNA genómico

MgCl₂

EDTA

Triton

Columnas de purificación de DNA

Kit de marcaje para sonda

Solución de hibridación

NaOH

Membrana de nitrocelulosa

HCl

Buffer de corrida

TAE

Marcadores de peso molecular

NaCl

SDS

RNA asa

Enzimas de restricción

V.2 Métodos

V.2.1 Preparación del medio de cultivo para moscas

50 grs de levadura activa y seca de panadero, 50 grs. de azúcar (piloncillo), 8 grs. de agar. Disolver estos ingredientes en 500 ml de agua desionizada, meter la mezcla al autoclave y dejar enfriar a 55°C, luego agregar 5 ml de ácido propiónico. Agregar 7 grs de grenetina, mezclar bien y alicuotar en tubos o frascos. Guardar los tubos no empleados a 4°C. Al utilizar los tubos, espolvorear la superficie del alimento con levadura seca activa granulada.

V.2.2 Preparación de placas de puesta de embriones de *Drosophila*

Disolver en 250 ml de agua bidestilada, 10 grs de agar y 4.2 de piloncillo. Esterilizar en autoclave. Dejar enfriar a 55-60°C grados y agregar 5 ml de ácido propiónico, y 250 ml de jugo de uva. Mezclar y verter en cajitas Petri de plástico, dejar enfriar, tapar y guardar a 4°C hasta su uso.

V.2.3 Mantenimiento de las cepas mutantes de *acal*

Dado que moscas con alelos mutantes de *acal* son debiles, aun en heterocigosis, se hicieron cruzas de machos heterocigotos para *acal* con hembras virgenes con cromosomas balanceadores. Este tipo de cromosoma no es capaz de aparearse o recombinarse con su homólogo durante la meiosis, ademas de ser letal en homocigosis y tener marcadores dominantes. Cruzamos a estas hembras con machos heterocigotos. Como en machos no hay recombinación meiótica, esto nos permite mantener el gen de interés en el cromosoma original. Para poder llevar un control de las cruzas se usa la siguiente nomenclatura, que indica las características de los progenitores:



F40 = Es un alelo mutante (escisiones que presentan fenotipos de apertura dorsal) tambien puede ser F46b ó F53.

Cyo = balanceador del cromosoma dos marcado con alas curvas.

Gla = Mutación dominante de ojos anormales

y⁺ = alelo dominante en la pigmentación de la cutícula de la mosca adulta.

yw = ojos blancos y cutícula amarilla.

Estas parejas se colocaron en tubos con alimento. Cada tubo se etiquetó de manera independiente. Se separaron los parentales antes de que empezaran a emerger los descendientes para no confundirlos, aproximadamente de 7 a 9 días después de realizar la crusa. En cultivos hechos a temperatura de laboratorio (entre 20 y 25°C) se colectaron descendientes antes de 20 días a partir de la fecha en que se inició la crusa. De la crusa se obtuvieron 3 tipos de moscas de los cuales sólo se eligieron aquellos que presentaban los fenotipos de ojos normales y alas curvas (machos y hembras heterocigotos con balanceador). Este tipo de cruzas se repitió sucesivamente eligiendo tanto hembras vírgenes del balanceador como

machos de cada línea mutante para nuevas cruzas hasta tener una población de heterocigotos considerable que permitiera poder llevar a cabo los experimentos de preparación de cutículas homocigotas mutantes y pruebas moleculares.

V.2.4 Preparación de cutículas

Esta técnica permite recuperar cutículas embrionarias en donde se pueden estudiar fenotipos en procesos morfogenéticos. Fenotipos mutantes como fallas en el cerrado dorsal, las cutículas se pueden caracterizar físicamente con ayuda de microscopia de campo oscuro.

a) Obtención de embriones (puestas)

En un vaso de precipitados de plástico con orificios pequeños en la base, se colocaron aproximadamente 50-100 moscas heterocigotas adultas (hembras y machos) de la línea a estudiar, y se cubrió el vaso con una caja petri, la cual contenía una base de agarosa y jugo de uva, en forma sólida y en la superficie un poco de levadura en polvo.

Se invirtió el vaso y se colocó en un medio ambiente adecuado para su desarrollo (temperatura = 25°C, humedad = 50%). Después de cada 24 horas de incubación se cambio la caja Petri por una limpia, con un poco de levadura seca activa en polvo. Las cajas con las puestas de 24 horas se dejaron en las condiciones mencionadas arriba y se esperó a que los embriones se terminaran de desarrollar, hasta que se observaron embriones muertos (aproximadamente otras 24 horas).

b) Recolección de embriones

Para coleccionar los embriones, a la caja se le agrego agua destilada. Con un pincel de pelo de camello se despegan los embriones, después se filtran con una malla de poro adecuado para retener los embriones. Los embriones se enjuagaron varias

veces hasta que la levadura queda disuelta. El embrión de *Drosophila* tiene dos membranas protectoras, la membrana corionica y la membrana vitelina las cuales fueron removidas con los siguientes tratamientos: una vez recolectados se pasaron a una solución 1:1 de hipoclorito de sodio con agua destilada, hasta que se decorionan. Se saca la malla de la solución y se enjuagan nuevamente con agua destilada, se quita el exceso de agua con un papel absorbente, y se transfieren los embriones a un vial de 1.5 ml con 750 μ l de heptano con la ayuda del pincel remojado en heptano.

c) Fijación y montaje

Una vez recolectados los embriones y puestos en heptano se adicionaron 750 μ l de metanol y de solución de EGTA 0.5 M (1 μ l por cada 10 μ l de metanol), y se agitó vigorosamente por 30 segundos con objeto de que se rompan las membranas vitelinas. Se removió todo el líquido y se lavan 3 veces con metanol, después una vez con agua desionizada y se montaron en un portaobjetos con medio de Hoyer. Este medio sirve para digerir los tejidos blandos. Se dejaron sobre una plancha caliente y se observaron al microscopio después de 24 horas y se tomaron fotografías.

V.2.5 Análisis de DNA por PCR (Reacción en cadena de polimerasa)

Esta técnica permite amplificar fragmentos de DNA a partir de muestras reducidas con la ayuda de oligos de secuencias conocidas, ó primers; estos se diseñaron alrededor de la zona de la escisión, con el fin de poder analizar molecularmente el grado de deleción hecha en la zona por las escisiones realizadas.

Se obtuvieron embriones de puestas de la misma manera antes mencionada. La recolección y decorionación fue de la siguiente manera: a) Sobre un portaobjetos se colocó una cinta con la parte adhesiva hacia arriba y con la ayuda de unas pinzas se transfirieron los embriones homocigotos mutantes de la caja Petri hacia la

superficie de la cinta, b) Se arrastro el embrión sobre la cinta para quitarle el corion; el embrión ya libre del corion es transparente. Se toma entonces cada embrión decorionado con mucho cuidado y se transfirió a un tubo de eppendorf de 0.5 ml.

a) Extracción de DNA de embriones

Una vez decorionados se colocaron 5 embriones en el tubo eppendorf de 0.5 ml, se maceraron con la punta de una pipeta que contiene 20 μ l de SB (Tris HCl 10 mM pH 8.2, EDTA 1 mM, NaCl 25 mM, Triton X-100 20% v/v); a esto se agrega proteinasa K a una concentración de 200 μ g/ml, se incuban a 37°C por 30 minutos, se inactivo la proteinasa K calentando a 95°C durante 2 minutos y se centrifuga la muestra 3 minutos a 2000 rpm.

b) PCR (Reacción en cadena de polimerasa)

En un vial para PCR de 0.2 ml se adicionaron 2 μ l de la preparación de DNA, 0.6 μ l de MgCl₂ 50 mM, 2.0 μ l de buffer 10X, 0.25 μ l de dNTPs 10mM, cada uno 1 μ l del oligo Acal 1, 1 μ l del oligo Acal 2, 0.5 μ l de Taq y 12.65 μ l de H₂O para PCR.

Oligos	Secuencia
Acal 1	5' gag gga aag aag aag cag agg 3'
Acal 2	5' ggg aac aaa ttc gag agg cat g 3'

Los tubos se colocaron en el equipo de PCR y se llevó a cabo el experimento de PCR con las siguientes condiciones para el termociclador:

1	94°C	1'
2	94°C	30''
3	58°C	50''
4	72°C	50''

- 5 30 ciclos (pasos 2 al 4)
- 6 72°C 5'

Después, se analizaron los productos de la PCR por medio de una electroforesis para comprobar que se ha amplificado el fragmento esperado. Este fragmento es de aproximadamente de 800 pb.

c) Electroforesis

Las muestras se colocaron en un gel de agarosa 0.8% en TAE 1X, y se añade bromuro de etidio 10 mM a una concentración de 2.2 μ l / 50 ml de gel. Los fragmentos de DNA se separan de acuerdo al peso molecular en la matriz sólida por la acción de un campo eléctrico. Las muestras se mezclan con un buffer de corrida 6X que contiene colorantes que permitirán ver el recorrido de la muestra, se cargan en los carriles del gel. Se usan marcadores de peso molecular para comparar con las bandas experimentales. La electroforesis se realiza a 100 Volts durante 45 a 60 minutos. Después se observa el gel con una lámpara de luz UV, para identificar los fragmentos separados, y se tomaron fotografías.

V.2.6 Southern Blot

Esta técnica incluye la purificación, digestión, transferencia del DNA y finalmente hibridación con una sonda marcada con radiactividad.

a) Purificación de DNA genómico

Se tomaron entre 20 y 30 moscas adultas anestesiadas con CO₂, se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 ml con la ayuda de un pincel, se colocó el tubo en hielo y se homogenizaron las moscas con un pistilo de plástico limpio, inicialmente sin buffer. Después se terminó de homogenizar agregando el buffer; el buffer es una mezcla 1:1 de buffer de homogenado (NaCl 80 mM, sacarosa 160 mM, EDTA 8 mM

pH 8, Tris 25 mM-HCl pH 8) y buffer de lisis (EDTA 100 mM pH 9, SDS 1%, Tris 200 mM-HCl pH 9). La cantidad de buffer depende de la cantidad de moscas que se utilice, a razón de 10 μ l por mosca. Se agregan 2 μ l de la enzima Proteinasa K y se incubo a 60°C durante 30 minutos y se dejo enfriar. Se hizo una extracción con 300 μ l de fenol, mezclando por 2 minutos y se centrifuga a 14000 rpm por 20 minutos, se extrajo la fase acuosa (superior) con una punta recortada y se psuo en un vial nuevo, se repitió la operación. Una vez que están en el vial nuevo, se le agrego 600 μ l de etanol al 100 % (de preferencia mantenido a -20 °C) y 30 μ l de Acetato de potasio 3M. Se observó la aparición de fibras del DNA genómico. Se centrifugo nuevamente y se decanto el sobrenadante, se adicionaron 500 μ l de etanol al 70 % para eliminar el exceso de sales. Se centrifugo y se decanto, se resuspendió en 20 μ l de agua para PCR.

b) Digestión del DNA

Se tomaron 10 μ l de DNA, se colocaron en un vial nuevo de 0.5 ml. A esto se le añadió 1.5 μ l de buffer 10X de digestión, 0.5 μ l de RNAsas, 1 μ l de enzima de restricción (MSP I, SAU 3, Hinp 1) y 2 μ l de agua desionizada estéril usada para PCR. Se incubo a 37 °C toda la noche o al menos por dos horas. El objetivo es que las enzimas de restricción corten de manera específica en diferentes partes del genoma originando fragmentos de distinto peso molecular (la cantidad de fragmentos de distinto peso molecular depende de la frecuencia de la secuencia de corte de la enzima en el DNA). Posteriormente se preparo un gel de agarosa al 0.8 % en TAE 1X y con 4,4 μ l /100 ml de buffer de bromuro de etidio a una concentración de 10mg/ml. Se dejó correr la electroforesis con las muestras de la digestión y buffer de cargado a 50 volts de corriente constante. Cuando las muestras recorrieron 2/3 partes del gel, se detuvo la electroforesis y se observo el gel en el transluminador con luz UV (el bromuro de etidio es un agente intercalante se mete entre el DNA y fluoresce con luz UV, permite observar el DNA). Así se comprueba que la digestión del DNA se llevó a cabo.

c) Transferencia del DNA del gel de agarosa a la membrana de nitrocelulosa

Después de la electroforesis, el gel se deposita en un recipiente donde se lava por 10 minutos en una solución de HCl 0.2 N, se enjuaga con agua desionizada. El siguiente paso consistió en la desnaturalización del DNA contenido en el gel. El gel se mantuvo en constante agitación por 45 minutos en una solución de NaCl 1.5 M y NaOH 0.5 M. El gel se enjuaga otra vez con agua desionizada, y se neutraliza agregando una solución de Tris (pH 7.4) 1 M y NaCl 1.5 M, se mantuvo en agitación por 30 minutos. Después de este tiempo se cambió la solución de neutralización y se continuó agitando por otros 15 minutos.

Se preparó una base forrada con papel filtro Whatman 3MM para poner el gel. Esta base se colocó dentro de un recipiente, el cual contenía el buffer SSC 20X tratando de evitar que se formaran burbujas en la superficie, en caso contrario tratar de eliminarlas con la ayuda de una pipeta. Se colocó el gel boca abajo, y encima un filtro de nitrocelulosa del tamaño del gel previamente humedecida en agua desionizada y buffer de transferencia, identificando por medio de una marca la orientación del gel en la membrana de nitrocelulosa. Luego se colocó otra capa de papel filtro Whatman 3MM y finalmente una torre de papel de un peso aproximado de un kilo para poder ejercer suficiente presión y tener una transferencia uniforme. Después se agregó suficiente buffer de transferencia (SSC 20X) para la transferencia del DNA del gel a la membrana de nitrocelulosa. Se dejó la transferencia toda la noche. Al día siguiente se fijó el DNA en la membrana con luz UV, y se utilizó para llevar a cabo la hibridación.

d) Hibridación y elaboración de la sonda

Se colocó la membrana a pre-hibridar a 42 °C en solución de hibridación, y mientras se prepara la sonda. Una vez obtenido el producto de PCR con los oligos diseñados, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa 0.8 %, posteriormente se purificó la banda del gel. Se resuspendió el DNA en 8 µl de agua

para PCR. Se utilizaron 2 μl del DNA en el marcaje, junto con 10 μl de agua para PCR y 5 μl de la solución que contiene los oligonucleótidos de secuencia corta (9 nucleótidos, Random 9-mer Primers) que se van a insertar al azar en el DNA para generar fragmentos de diferente tamaño. Se colocaron los tubos a 95 °C por 5 minutos y centrifugar a temperatura ambiente.

Después, se agregó 5 μl de buffer 5X para primers (este buffer contiene todos los nucleótidos no marcados), 2.5 μl del nucleótido marcado con ^{32}P radioactivo [$(\alpha\text{-}^{32}\text{P})$ dCTP] y 0.5 μl de enzima DNA polimerasa. Se incubaron a 37 °C durante 10 minutos, luego se agregó 2 μl de una solución de EDTA para detener la reacción. Se llevó a 100 μl con agua desionizada estéril. Se purificó la muestra pasándola por una columna (Quick Spin columns for radiolabel DNA purification) previamente tratada y se centrifugó por 3 minutos a 2500 rpm. Se eliminó la columna y el líquido del tubo colector (sonda) se desnaturizó por 10 minutos a 95 °C y se agregó a la membrana previamente pre-hibridizada y se dejó hibridar durante toda la noche a 42°C. Luego se sacó del medio de hibridación, se lavó 3 veces en 0.1X SSC, 0.1% SDS con agitación y se midió el nivel de radioactividad en el filtro con un contador Geiger. Finalmente se expuso la membrana radioactiva a una pantalla sensible a las partículas β emitidas por ^{32}P durante 24 horas y posteriormente se reveló en el Storm (un Phosphoimager), para poder observar las bandas que hibridaron con la sonda.

V.2.7 Pruebas de complementación

Este tipo de prueba permite distinguir si dos mutantes que presentan aparentemente el mismo defecto fenotípico están afectados en el mismo o en distintos genes; aquellas mutaciones que no complementan se dice que están en el mismo gen, aunque de igual forma se puede observar una complementación intragénica en casos excepcionales.

Se cruzaron moscas heterocigotas de las diferentes líneas mutantes balanceadas entre si y se observa si existe complementación observando la descendencia y presencia de embriones muertos o de individuos sin balanceador.

VI. RESULTADOS

Generación y conservación de alelos

La línea con la inserción original del transposón P{SUPor-P} KG09113 se cruzó con una cepa que contiene una fuente de transposasa con el objetivo de realizar escisiones de este transposón. De estas cruzas se derivaron 3 líneas mutantes (F40, F46b y F53), que mostraron letalidad en embriones. El fenotipo letal es de apertura dorsal, como falla del proceso de cerrado dorsal de la embriogenesis.

Para mantener estos alelos mutantes derivados de las escisiones, se realizaron cruzas con una línea balanceadora del cromosoma dos (el gen en estudio está en el cromosoma dos), permitiendo así "balancear" las mutaciones, y generar animales heterocigotos. Esto se hace cruzando machos de las líneas mutantes heterocigotas (F40, F46b y F53) con hembras vírgenes del balanceador, lo que nos permite mantener las mutaciones en heterocigosis. Los cromosomas balanceadores son cromosomas con múltiples rearrreglos cromosómicos que impiden la recombinación durante la meiosis, además de tener un marcador dominante y mutaciones letales recesivas. Una vez obtenidas moscas con el cromosoma balanceador y la mutación se hacen cruzas para obtener cepas balanceadas.

Cuadro 1. Alelos generados por la escisión del transposón en la línea KG09113 (F10, F14, F21, F40, F46b y F53), indicando las líneas conservadas (F40, F46b y F53) mediante cruces para establecer líneas balanceadas (✓).

Inserción original	Escisiones generadas	Escisiones mantenidas
Transposón P{SUPor-P} KG09113	F10	X
	F14	X
	F21	X
	F40	✓
	F46b	✓
	F53	✓

Análisis de cutículas

El análisis de cutículas permite apreciar el fenotipo letal de embriones mutantes si este se manifiesta en el exoesqueleto de los embriones. Las cutículas son el exoesqueleto de los embriones. El estudio de los fenotipos mutantes embrionarios reflejados en la cutícula permite estudiar el papel de estos genes en el desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster*. Las cutículas de los tres diferentes alelos del gen *acal*, presentan un orificio dorsal. Además la línea F46b presenta una apertura a nivel anterior (Ver figuras 9, 10, 11).

El análisis de cutículas derivadas de embriones en la línea original con la inserción P{SUPor-P} KG09113 no muestran defectos. En esta línea los embriones concluyen exitosamente el proceso de embriogénesis (Ver figura 8).

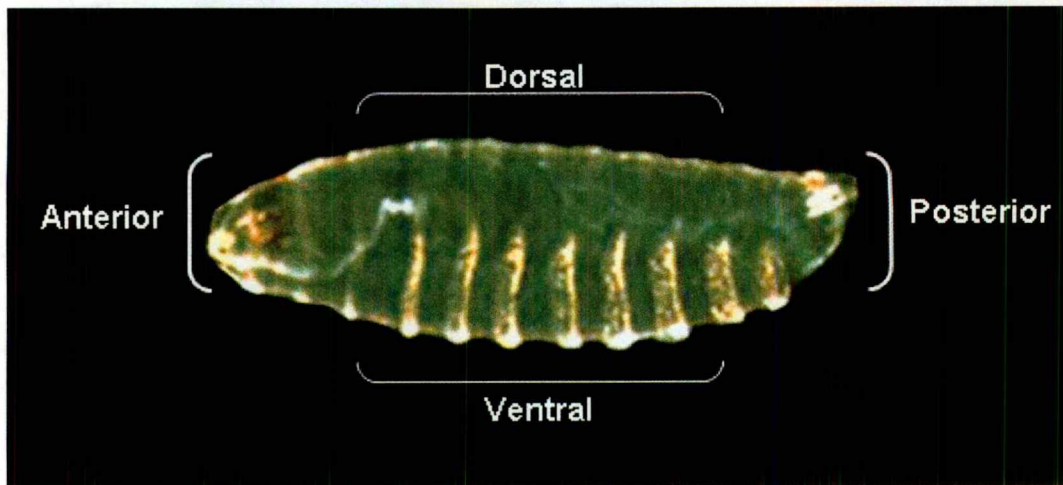


Figura 8. Embrión de P{SUPor-P} KG09113, que no presenta anomalías fenotípicas, y que sirve de control para las líneas generadas por escisiones del mismo transposón. La parte anterior del embrión, indicando la porción cefálica está a la izquierda, seguido del tórax y del abdomen. En imágenes posteriores, todas las cutículas se muestran con la misma orientación, a menos que se señale lo contrario.

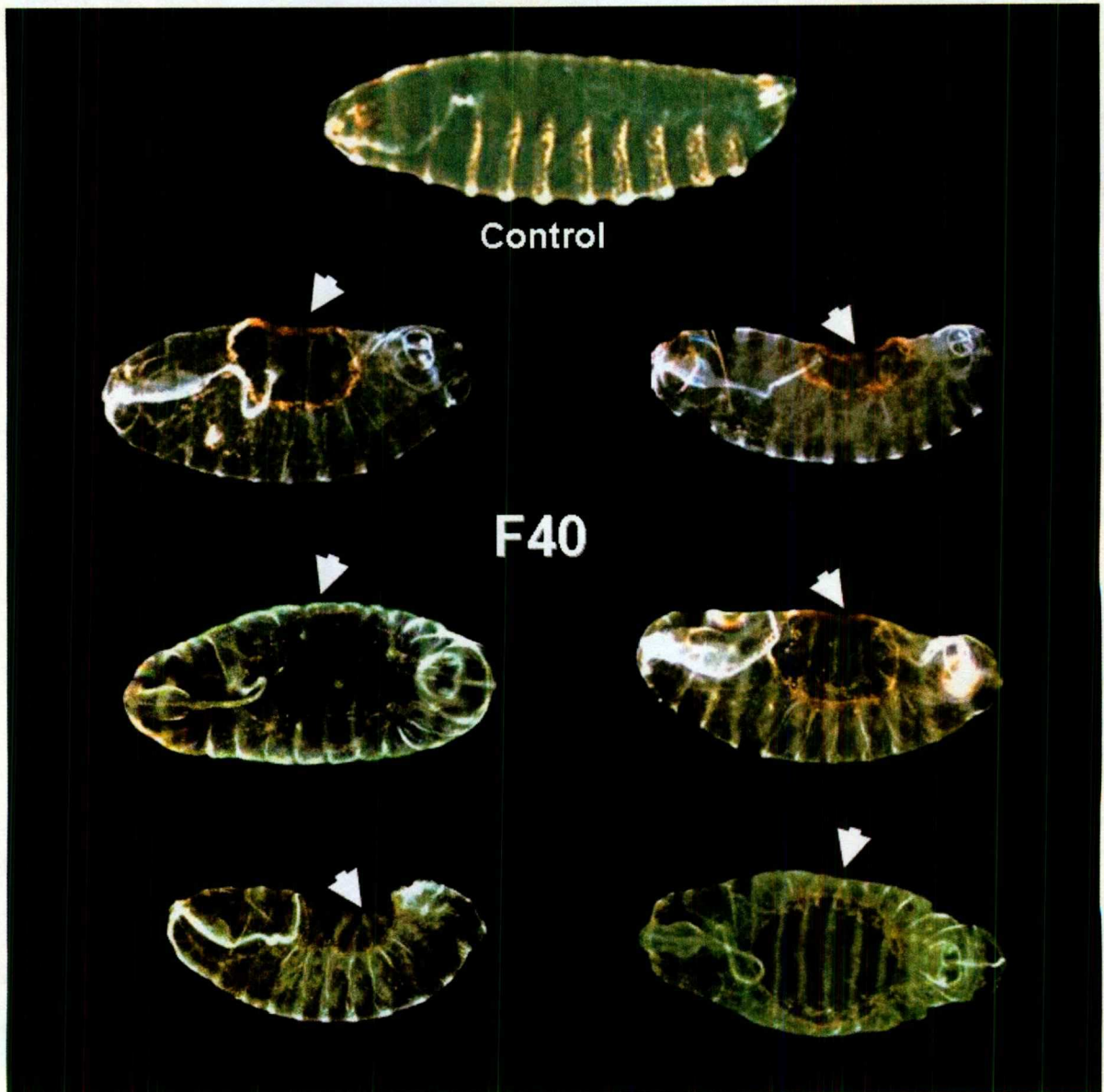


Figura 9. Cutículas de embriones con el alelo mutante F40 derivado de la escisión del transposón P{SUPor-P} KG09113. En las imágenes se observa el grado de apertura a nivel dorsal medio del embrión; las flechas señalan el sitio en donde se presenta el fenotipo. Imágenes de microscopia de campo oscuro, objetivo 10X.

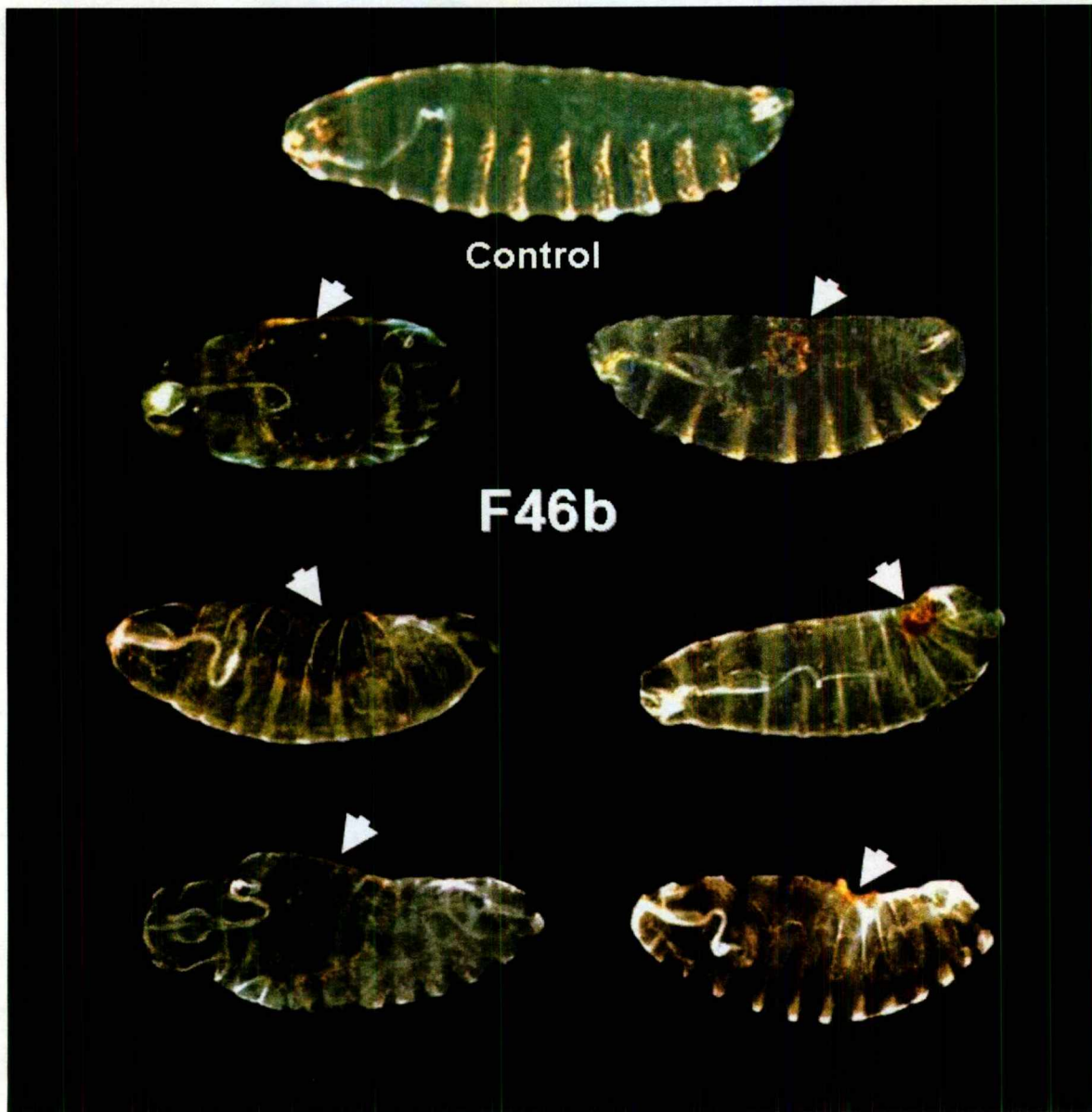


Figura 10. Cutículas de embriones con el alelo mutante F46b. A la izquierda se aprecia el grado de apertura dorsal y a la derecha una vista dorsal de las aperturas, que son menores que en el alelo F40. Se muestran las aperturas más representativas de esta línea. Las flechas señalan la localización de la apertura.

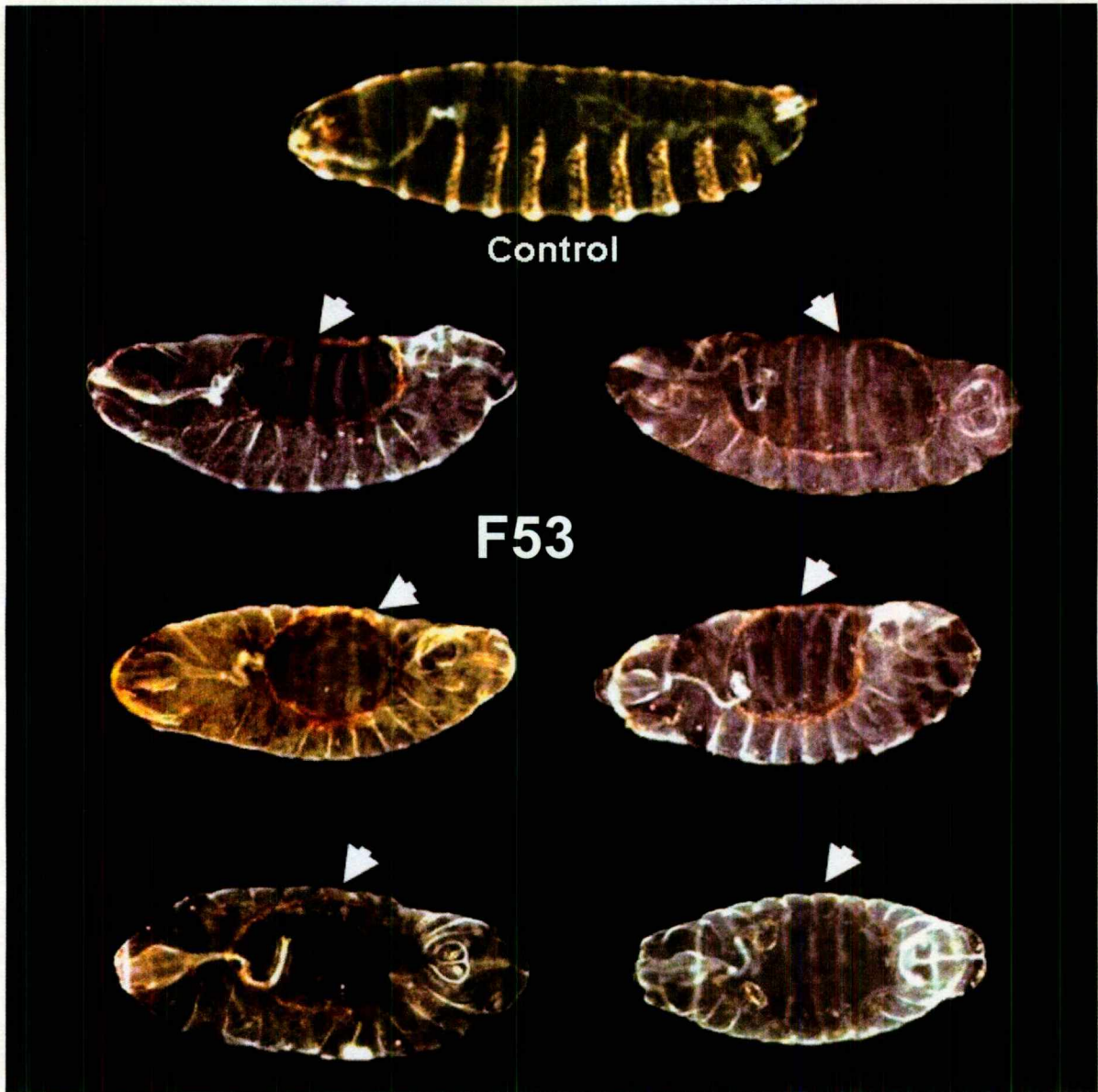


Figura 11. Cutículas de embriones con el alelo mutante F53. Se puede apreciar un fenotipo de apertura dorsal claro; las flechas indican la localización del fenotipo. Imágenes de campo oscuro, objetivo 10X.

Dentro del análisis de cutículas se realizó un conteo para identificar los segmentos que están siendo afectados por el grado de apertura presente en el embrión, encontrando los siguientes datos estadísticos en cada una de las diferentes líneas:

Cuadro 2. Porcentajes de apertura y número de segmentos afectados que presentan los embriones de la línea F40.

Cutículas de la línea F40		
Apertura	Porcentaje %	Segmentos afectados
Dorsal	94	3-9
Ventral	6	
Anterior	0	
Posterior	0	

Cuadro 3. Número de segmentos afectados en F40. La zona remarcada muestra que una zona de siete segmentos afectados se presentó con mayor frecuencia.

segmentos afectados	Frecuencia
3	1
5	9
6	16
7	29
8	15
9	12

En la línea F46b se observan aperturas dorsales, ventrales y anteriores. La frecuencia es menor en las dos últimas aperturas, como lo indican las siguientes tablas.

Cuadro 4. Porcentajes de apertura y número de segmentos afectados que presentan los embriones de la línea F46b.

Cutículas de la línea F46b		
Apertura	Porcentaje %	Segmentos afectados
Dorsal	90	2-9
Ventral	0	
Anterior	3	
Posterior	7	

Cuadro 5. Número de segmentos afectados en F46b. La zona remarcada nos muestra que al igual que la línea F40 una zona de siete segmentos afectados fue la extensión afectada con mayor frecuencia, particularmente en defectos de apertura dorsal. Sin embargo en esta línea la apertura es menos acusada que en F40, en promedio.

segmentos afectados	frecuencia
2	2
3	1
4	1
5	7
6	5
7	9

8	2
9	2

La línea F53, muestra aperturas dorsales y ventrales, donde la primera tiene mayor frecuencia.

Cuadro 6. Porcentajes de apertura y número de segmentos afectados que presentan los embriones de la línea F53.

Cutículas de la línea F53		
Apertura	Porcentaje %	Segmentos afectados
Dorsal	89	5-9
Ventral	11	
Anterior	0	
Posterior	0	

Cuadro 7. Número de segmentos afectados en F53. La zona remarcada indica que en la línea F53 las aperturas son mayores, ya que presentan una frecuencia mayor de ocho segmentos afectados en la apertura dorsal.

segmentos afectados	frecuencia
5	1
6	3
7	12
8	15
9	5

Una vez analizado el fenotipo de las líneas mutantes generadas a partir de escisiones del elemento P, se le dió el nombre de *acal* al gen, que en náhuatl significa canoa, ya que el fenotipo mutante semeja una embarcación de este tipo.

Pruebas de Complementación

Esta prueba permite distinguir si dos mutantes que presentan aparentemente el mismo defecto fenotípico, están afectadas en el mismo o en distintos genes. Al realizar el análisis de complementación se observó que las líneas estudiadas (F40, F46b y F53) presentaron complementación entre sí. Este resultado es evidente por la presencia de moscas con alas planas (es decir, sin balanceador, dado que el cromosoma balanceador tiene un marcador de alas curvas), indicando que posiblemente sean alelos de genes diferentes o que se trate de una complementación intragénica.

Cuadro 8. Complementación Parcial (CP) entre las líneas estudiadas, por la presencia de filiales con las alas planas, sin cromosoma balanceador.

Líneas mutantes		
	F46b	F53
F40	CP	CP
F46b		CP

Cuadro 9. Cantidades encontradas en las pruebas de complementación en las diferentes líneas estudiadas.

CRUZAS	n = 267	n = 324	n = 326
	mutante/silvestre	mutante/silvestre	mutante/silvestre
F46b X F40	156 / 111		
F53 X F40		172 / 152	
F46b X F53			210 / 116

Cuadro 10. Porcentajes la complementación que se observa en las diferentes líneas estudiadas.

CRUZAS	MOSCAS CON BALANCEADOR		MOSCAS SIN BALANCEADOR	
	MUTANTES		SILVESTRES	
	VALOR TEORICO	VALOR EXPERIMENTAL	VALOR TEORICO	VALOR EXPERIMENTAL
F46b X F40		58.42%		41.57%
F53 X F40	66%	53.08%	33%	46.91%
F46b X F53		64.41%		35.58%

Estos datos apuntan a que se trata de una complementación debido a la proporción en la que se encuentran las moscas en balanceador en la filial estudiada.

Análisis de DNA por PCR (Reacción en cadena de polimerasa)

Amplificamos por PCR fragmentos de DNA a partir de las líneas en estudio con oligos diseñados para amplificar secuencias alrededor de la zona de escisión, con el fin de poder analizar molecularmente la zona genómica de la inserción original.

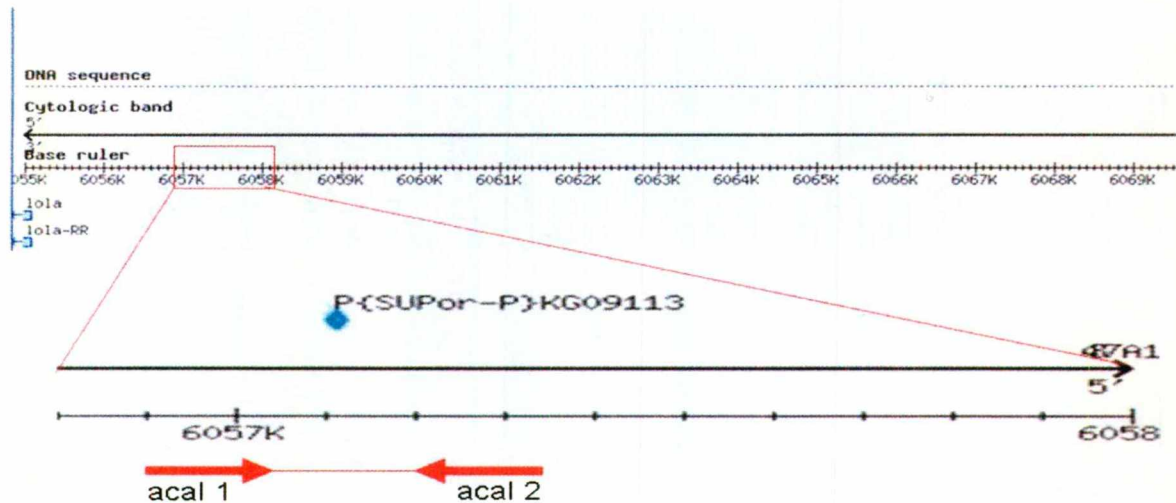


Figura 12. Flanqueo de la zona aledaña a la inserción del transposón (marcado con un rombo), con los oligos acal 1 y acal 2 que permitieron amplificar una banda de aproximadamente 831 pb.

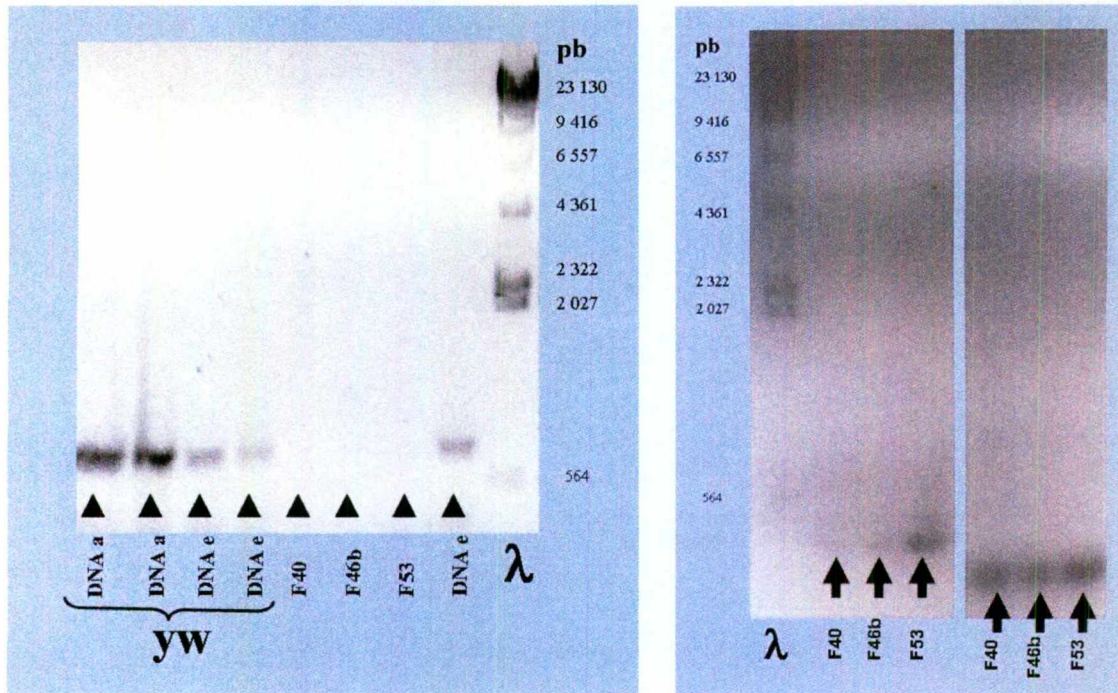


Figura 13. En la imagen de la izquierda se puede observar que tanto en el DNA genómico de adultos (a) como el de embriones (e) de la línea silvestre (yw) hubo amplificación de la zona deseada de aproximadamente 800 pb, pero no en las líneas mutantes (F40, F46b y F53), sugiriendo una lesión molecular en esta zona. En la imagen de la derecha se muestra la amplificación, usando el DNA de las líneas mutantes, con oligos control que amplifican zonas no relacionadas con *acaI* de aproximadamente 300 y 150 pb, mostrando que el DNA extraído de los mutantes usado como templado en estos experimentos es capaz de soportar amplificación por PCR.

Southern blot

Con esta técnica es posible determinar lesiones moleculares en las líneas generadas (F40, F46b y F53). Para la elaboración de este experimento se utilizó DNA genómico de moscas silvestres (yw) como control y moscas heterocigotas mutantes para *acaI*. Para ello se digirió el DNA genómico de moscas heterocigotas, usando las enzimas de restricción Msp I y Sau 3A I que generan fragmentos de

diferentes tamaños; estos se separaron por electroforesis y se fijaron a un soporte (filtro), para así poner en contacto estos fragmentos con una sonda que contenía CTP marcado con ^{32}P derivado de la zona genómica de la inserción para identificar diversos fragmentos.

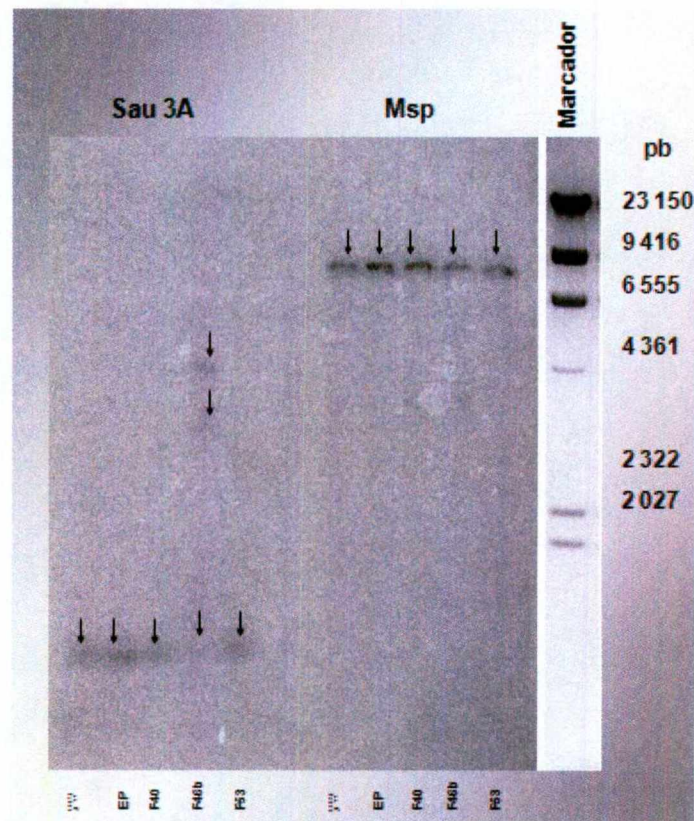


Figura 14. Southern blot. La imagen muestra la señal de hibridación en los fragmentos obtenidos por la digestión del DNA genómico de las líneas heterocigotas F40, F46b y F53, las líneas control silvestre (yw) y la línea que contiene la inserción del transposon. El DNA genómico fue digerido con *Msp I* y *Sau 3A*. La mayoría de los fragmentos de DNA de los alelos mutantes migran de manera semejante a los fragmentos de DNA de la línea control y de la línea mutante original con el elemento P. Los cortes con *Sau 3A* presentan bandas en diferente tamaño para la línea F46b siendo estos de menor intensidad que los de los carriles vecinos. Se señalan los fragmentos alrededor de 4 Kb. Para los cortes con *Msp* no se observan fragmentos de diferente tamaño entre las líneas estudiadas.

Al valorar los resultados de las escisiones, mediante Southern blot, se observan diferencias en la secuencia del alelo F46b. Esto implica que existe una lesión en F46b localizada alrededor de la inserción original.

VII. DISCUSIONES

A) Generación y mantenimiento de los alelos.

Los nuevos alelos estudiados en este trabajo son evidencia de un gen o genes localizados en el brazo derecho del segundo cromosoma, en 47A, de *Drosophila melanogaster*, que participan en el proceso de cerrado dorsal. Los fenotipos mutantes en las líneas generadas (F40, F46b y F53), son característicos para genes que participan en la vía de señalización de la cinasa de Jun o bien para genes del citoesqueleto involucrados en el cerrado dorsal. Dado que en la región de la inserción no hay ningún gen predicho se propone que esta zona sea o bien una zona regulatoria de una unidad de transcripción mas distal, o que codifique para un gen que no ha sido aun identificado por los algoritmos usados en el análisis del genoma de *Drosophila melanogaster*.

Las líneas generadas por escisiones imprecisas se mantuvieron con la técnica de cruzamiento con líneas balanceadas, las cuales permitieron mantener la línea en heterocigosis y así conservar individuos viables. Las mutaciones estudiadas son letales embrionarios en homocigosis. Los individuos heterocigotos son débiles, por lo que de manera reiterada se hicieron cruzas con balanceadores para mantener las cepas mutantes.

En las tres líneas analizadas se observaron aperturas dorsales, siendo más acusada las de la línea F53 ya que la cantidad de segmentos dañados es mayor; las líneas F40 y F46b presentaron la misma incidencia en los segmentos afectados; sin embargo, en la línea F46b se observaron cutículas con aperturas no tan amplias.

B) Pruebas de complementación

Al llevar a cabo las pruebas de complementación se observó complementación entre las líneas generadas. Esto puede deberse a complementación intragénica en un mismo gen que codifica para una proteína participante en el proceso de cerrado dorsal en el que los alelos generados hubiesen afectado diferentes zonas de la unidad de transcripción, lo que hace que haya rescate de la función, o bien que existen 3 genes vecinos, con fenotipos similares, afectados; es decir que los 3 genes intervengan en el cerrado dorsal.

Lo anterior nos lleva a pensar que dicho gen o genes pudieran ser integrantes la vía de la cinasa de Jun o de otras vías que participan en el proceso de cerrado dorsal, dado que los fenotipos expuestos en este trabajo son semejantes a los presentados en mutaciones de los genes que forman parte de estas, o bien a gen (es) que controlan el cambio de forma celular (genes del citoesqueleto, etc) (Riesgo-Escovar y Hafen, 1997). En base a los resultados hasta ahora expuestos, se puede decir que *acal* es un gen o un complejo de genes que se activan tempranamente en el ciclo de vida de *Drosophila* durante la embriogénesis. Se requerirá llevar a cabo pruebas de interacciones genéticas para estudiar si participan o no durante el cerrado dorsal con estos otros.

C) Caracterización de la lesión molecular.

Dentro de la caracterización molecular se realizaron ensayos de PCR para poder amplificar la zona genómica aledaña la inserción y estudiar posibles lesiones consecuencia de las escisiones realizadas. Lo anterior se hizo mediante el diseño de oligos que flanquearon la zona aledaña al sitio de inserción, pero no se pudo amplificar lo que sugiere que en las tres líneas al menos un sitio de unión de los oligos utilizados estaba mutado o bien existía entre los oligos una inserción grande de DNA lo que conforman lesiones moleculares en la zona para las 3 líneas. Se usaron controles de líneas silvestres que si amplificaron con los oligos de *acal* 1 y

aca1 2, así como el uso de otros oligos con las muestras de DNA problema. Estas presentaron amplificación exitosa de fragmentos controles. Para continuar explorando por este método este problema, se debe de diseñar nuevos oligos más alejados de la zona de la inserción para tratar de obtener amplificaciones y realizar el análisis de las secuencias de estas y diagnosticar la lesión molecular a detalle.

Las escisiones de un elemento P con cierta frecuencia generan deleciones alrededor del sitio de inserción en la secuencia genómica original. Esta puede ser pequeña o grande, hasta muchos pares de bases. Para explorar esto en las líneas estudiadas, también se analizaron por medio de Southern blot. Se observaron diferencias en solo una de la líneas, en F46b cortando el DNA con la enzima Sau 3A.

Esto indica que, al menos en la línea F46b existe una lesión molecular en la zona genómica aledaña a la inserción del transposón original. Sera necesario realizar experimentos de complementación con deficiencias y manejo fino de la lesión para demostrar que efectivamente la lesión molecular encontrada corresponde al fenotipo mutante estudiado.

VIII. CONCLUSIONES

El desarrollo embrionario es uno de los principales procesos morfogenéticos que se han estudiado en *Drosophila melanogaster*, las mutaciones generadas a partir de la línea KG09113 nos han demostrado la participación de al menos un gen no caracterizado en las etapas de la embriogénesis de *Drosophila*. Este gen o genes participan en diferentes movimientos morfogenéticos, pero particularmente durante el cerrado dorsal. Estos fenotipos son similares a los presentados por mutaciones en genes que participan en la vía de señalización JNK, por lo que es probable que este gen o genes participen en esta vía.

Diversas técnicas moleculares nos permitieron evaluar las lesiones moleculares debido a la escisión del elemento P. Por PCR no observamos amplificación, lo que sugiere fuertemente la presencia de una lesión molecular en la zona analizada. El análisis por Southern blot demostró que al menos la escisión en F46b generó una lesión molecular en la zona.

Sin embargo es posible se requiere de más experimentación para describir a detalle las lesiones.

Al realizarse las pruebas de complementación se observan complementaciones parciales lo que nos indica que o bien hay complementación intragénica o se trata de varios genes con fenotipos similares. Esto implica que la zona íntergénica en estudio requiere un mayor análisis a nivel genético y molecular.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Adams, M. D. Celniker, S.E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D. Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., George, R. A., Lewis, S. E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S. N., Sutton, G.G., Wortman, J. R., Yandell, M. D., Wan, K. H., Doyle, C. Baxter, E. G., Helt, G., Nelson, C. R. **2000**. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*: Vol. 287: 2185-2195.

Alberts, B. 1996. Barritt, G. F. Baulieu, E. Hardie, D.G. Morgan, N. G. Transmisión de señales entre células. En: *Biología Molecular de la célula*. Eds. Omega, España: 771-841.

Amorós, G. M. 2001. Estudio de mutantes del cromosoma III de *Drosophila melanogaster*. el gen *ash-2* como regulador de diferenciación celular. Barcelona, España. Universidad de Barcelona. Tesis para obtener el grado de Doctora en Biología, 5 -20.

Brody, T. B. 1996. The *Interactive Fly*. [http://flybase bio.indiana.edu/allied-data/lk/interactive-fly/aimain/2stages.htm](http://flybase.bio.indiana.edu/allied-data/lk/interactive-fly/aimain/2stages.htm).

Campos-Ortega, J. A. y Hartenstein, V. 1997. The embryonic development of *Drosophila melanogaster*. 2da. ed., Springer Verlag, Berlin: 1-8.

Engels, W. R. 1996. <http://engels.genetics.wisc.edu/Pelements/>

Gomperts, B. Kramer, I. y Tatham, P. 2003. Signal transduction. Elsevier academic press, USA: 257-282.

Griffiths, J. F., Miller, J. H., Suzuki, D. T., Lewontin, R. C. y Gelbart, W. M. 2000. *Genética Moderna*. 7a. ed., W. H. Freeman and Company, New York: 601-620.

Harden, N. 2002. Signaling pathways directing the movement and fusion of epithelial sheets: lesson from dorsal closure in *Drosophila*. *Differentiation*. Vol. 70: 1-23.

Hartenstein, V. 1993. ATLAS of *Drosophila* Development. 1a. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.

Johnston, D. 2002. The Art and Design of Genetic Screens: *Drosophila melanogaster*. *Macmillan Magazines*. Vol:3, 176-188.

Lindsley, D. L. y Zimm G. 1992. The Genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press. California:1-2, 138, 254, 785, 804.

Manning, G. 2003. A quick and simple introduction to *Drosophila melanogaster*. <http://ceolas.org/VL/fly/intro.html>.

Mendoza, OMA. 2004. Generación y Caracterización de Alelos Mutantes de la Línea P1492 en *Drosophila Melanogaster*. Querétaro, Qro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo. 3-5, 14-16.

Nazario, YNO. 2004. Caracterización del Patrón de Expresión del Gen Amigo de Fos (AMFOS) en embriones de *Drosophila Melanogaster*. Querétaro, Qro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo. 9.

Riesgo-Escovar, JR y Hafen, E. 1997. *Drosophila* Jun kinase regulates expression of decapentaplegic via the ETS-domain protein Aop and the AP-1 transcription factor, DJun, during dorsal closure. *Genes Dev.*: Vol. 11: 1717–1727.

Riesgo-Escovar, JR. Jenni, M. Fritz, A y 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 Dev.*: Vol. 10: 2759–2768.

Roberts, G. 2000.

<http://lecturer.ukdw.ac.id/dhira/BactGenetics/complementation.html>

Sambrook J. Fritsch E, Maniatis T. **1989.** *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. 2da. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, United States of America: 9.34-9.40.

Scuderi Anne, Letsou Anthea. **2005.** Amnioserosa Is required for Dorsal Closure in *Drosophila*. *Developmental Dynamics*. 232: 791-800.

Spradling, A.C. 1995. Gene disruptions using P transposable elements: An integral component of the *Drosophila* genome project. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 92:10824-10830.

Sullivan W, Ashburner M, Scott H. **2000.** *Drosophila* Protocols. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 601-614, 636-643.

UI. 2005. Universidad de indiana. A Database of *Drosophila* Genes & Genomes. <http://flybase.bio.indiana.edu/>

Weigmann, K., Klapper, R., Strasser, T., Rickert, C., Technau, G. M., Jäckle, H., Janning, W. y Klämbt, C. **2003.** FlyMove – a new way to look at development of *Drosophila*. *Trends in Genetics*: Vol. 19: 310-311.

Xia, Y. Karin, M. **2004.** The control of cell motility and epithelial morphogenesis by Jun kinases. *TRENDS in Cell Biology.*: Vol 14: 94-99.

Zeitlinger, J. Kockel, Fiorenzo, L. Peverali, A. Jackson, DB. Mlodzik, M y Bohmann, D. **1997**. Defective dorsal closure and loss of epidermal *decapentaplegic* expression in *Drosophila fos* mutants. The EMBO Journal: Vol.16: pp.7393–7401.

Zeitlinger, J. **2002**. <http://zeitlinger.de/julia/thesis/Figs/Fig.3.html>.