



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

"CARACTERIZACIÓN DE UN NUEVO GEN *piragua (prg)* EN

Drosophila melanogaster"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

NESTOR OCTAVIO NAZARIO YEPIZ

DIRIGIDA POR

Dr. JUAN RAFAEL RIESGO ESCOVAR

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2006.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
Becario No. 184937

A la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM
Becario No. 504011492

Biblioteca

Bib. Pilar Galarza Barrios

Bib. Rafael Silva Cruz

Biología Molecular

Dra. Anaid Antaramian Salas

A mis sinodales:

- Dra. Áurea por su gran disposición y ayuda para mejora este trabajo.
- Dra. Rocío por sus preguntas tan inquisitivas.
- Dra. Martha por su excelente aportación en la tesis.
- Dra. Carmen y Dr. Gonzalo por sus buenos comentarios para mejorar el escrito.

A mi tutor:

- Dr. Riesgo por cultivarme esa necesidad de conocimiento y permitirme esa libertad de pensamiento.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL.....	i
ÍNDICE DE TABLAS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	2
1. TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES.....	2
2. LA VÍA DE TIPO MAPK.....	2
3. CERRADO DORSAL Y LA VÍA DE LA JNK.....	4
4. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN Y MOTIVOS DE UNIÓN AL DNA.....	7
4.1 Zipper de leucina.....	8
4.2 Dedos de zinc.....	8
5. LAS MUTANTES DE APERTURA DORSAL.....	10
5.1 <i>piragua</i>	11
HIPÓTESIS.....	14
OBJETIVOS.....	15
GENERAL.....	15
PARTICULARES.....	15
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	16
MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
CARACTERÍSTICAS DE LAS LÍNEAS UTILIZADAS.....	17
PREPARACIÓN DE CUTICULAS.....	17
OBTENCIÓN DE EMBRIONES (Puestas).....	17
RECOLECCIÓN DE EMBRIONES.....	18
FIJADO Y MONTAJE.....	18

SOUTHERN BLOT.....	18
EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL DNA GENÓMICO DE CADA UNA DE LAS LÍNEAS.....	19
DIGESTIÓN.....	19
SEPARACIÓN Y TRANSFERENCIA.....	20
ELABORACIÓN DE LA SONDA.....	21
ANÁLISIS DE SECUENCIAS DEL <i>locus</i> DE <i>prg</i>	22
EXTRACCIÓN DE DNA.....	23
REACCIÓN DE PCR.....	24
TRANSFORMACIÓN DE LAS BACTERIAS.....	25
MINIPREPS.....	25
HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i>	26
FIJACIÓN DE EMBRIONES.....	26
HIBRIDACIÓN Y MARCAJE.....	27
INMUNOHISTOQUÍMICA.....	28
FIJACIÓN DE EMBRIONES.....	28
BLOQUEO Y MARCAJE.....	29
TÉCNICAS GENÉTICAS.....	30
ANÁLISIS DE COMPLEMENTACION DE LOS ALELOS DE <i>prg</i>	30
CRUZAS PARA EL ANÁLISIS DE INTERACCIÓN GÉNICA.....	31
<i>prg</i> y <i>Djun</i>	32
<i>prg</i> y <i>Dfos</i>	34
RESULTADOS.....	36
CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS DIFERENTES ALELOS DEL GEN <i>prg</i>	36
ANÁLISIS DE CUTÍCULAS.....	39
PRUEBAS DE COMPLEMENTACIÓN.....	40
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS DIFERENTES ALELOS DEL GEN <i>prg</i>	42
SOUTHERN-BLOT.....	42

ANÁLISIS MOLECULAR.....	43
EXPRESIÓN DEL RNA MENSAJERO DE <i>prg</i>	45
EXPRESIÓN DE Prg.....	47
CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE <i>prg</i>	53
INTERACCIÓN GENÉTICA DE <i>prg</i> Y <i>Djun</i>	54
INTERACCIÓN GENÉTICA DE <i>prg</i> Y <i>Dfos</i>	55
DISCUSIÓN.....	57
CARACTERIZACIÓN DE LOS ALELOS.....	57
EXPRESIÓN DE <i>prg</i>	59
REGULACIÓN DE LA PROTEÍNA Prg.....	60
INTERACCIONES GENÉTICAS.....	61
EL ALELO <i>prg</i> ⁸	64
CONCLUSIONES.....	67
BIBLIOGRAFÍA.....	68
ANEXO A. Embriones que no terminan su desarrollo.....	71
ANEXO B. Análisis de cutículas.....	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Cruzas realizadas para el análisis de complementación de los distintos alelos de <i>prg</i>	31
2	Cruzas realizadas para la obtención de organismos dobles heterocigotos de <i>prg</i> y <i>Djun</i> en el mismo cromosoma.....	32
3	Cruzas realizadas para la obtención de organismos dobles heterocigotos de <i>prg</i> y <i>Dfos</i>	35
4	Matriz de complementación.....	41
A.1	Análisis de embriones que no terminan su desarrollo de los distintos alelos de <i>prg</i>	71
B.1	Análisis de cutículas de <i>prg</i> ⁸	72
B.2	Análisis de cutículas de <i>prg</i> ¹⁰	72
B.3	Análisis de cutículas de <i>prg</i> ¹⁴	73
B.4	Análisis de cutículas de <i>prg</i> ²⁵	73
B.5	Análisis de cutículas de <i>prg</i> ²⁸	74
B.6	Análisis de cutículas de <i>prg</i> ³¹	74
B.7	Análisis de cutículas de <i>prg</i> ³²	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Vía de señalización de tipo MAPK.....	4
2	Vía de la JNK.....	7
3	Motivo de unión al DNA en forma de dedos de zinc.....	9
4	Secuencia de Prg.....	12
5	Diagrama de flujo que esquematiza la ruta a seguir para la caracterización del gen <i>prg</i>	16
6	Región genómica de <i>prg</i>	23
7	Embriones de los alelos de <i>prg</i> que no terminan su desarrollo.....	37
8	Embriones de los alelos de <i>prg</i> con apertura dorsal.....	38
9	Cutículas de embriones con los diferentes alelos mutantes del gen <i>prg</i>	39
10	Caracterización de la región genómica de <i>prg</i> en los diferentes alelos....	43
11	PCR de los diferentes alelos de <i>prg</i> con ar4 y ar3.....	44
12	Secuencia del fragmento amplificado con los oligos ar4 y ar3 del alelo <i>prg8</i> comparada con la secuencia obtenida de la base de datos de <i>Drosophila</i>	45
13	Análisis de mRNA de <i>prg</i> en embriones de tipo silvestre por hibridación <i>in situ</i>	46
14	Inmunohistoquímica que muestra la expresión de la proteína codificada por <i>prg</i> (Prg) en embriones de tipo silvestre en las diferentes etapas del desarrollo.....	48
15	Inmunohistoquímica de Prg en embriones silvestres durante etapas cercanas al cerrado dorsal y en el cerrado dorsal	50
16	Inmunohistoquímica de Prg en embriones de tipo silvestre, analizados con microscopia confocal.....	51
17	Inmunohistoquímica de Prg en embriones en etapa de retracción de la banda germinal de algunos alelos de <i>prg</i>	52

18	Comparación de las cutículas de embriones: silvestre, homocigotos mutantes para <i>prg</i> , homocigotos mutantes para <i>Dfos</i> y homocigotos mutantes para <i>Djun</i>	53
19	Interacción de <i>prg</i> ¹⁰ y <i>Djun</i> ^{IA109}	54
20	Interacción de <i>prg</i> ³² y <i>Djun</i> ^{IA109}	55
21	Interacción de <i>prg</i> ¹⁰ o <i>prg</i> ³² y <i>kay</i> ¹	56
22	Modelos propuestos para la participación de <i>prg</i> en la vía de la JNK.....	63

RESUMEN

El cerrado dorsal es un proceso que ocurre durante el desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster*, el cual involucra el cambio de forma de las células epiteliales. Para que las células cambien de forma de una manera organizada y el cerrado dorsal se lleve a cabo correctamente, es indispensable que las células se comuniquen entre sí; una vía de tipo MAPK, conocida como la vía de la cinasa de Jun (JNK) orquesta este proceso. Los embriones homocigotos mutantes de genes que participan en la vía de JNK presentan un fenotipo característico de apertura dorsal debido a la falla en el cerrado dorsal. En el laboratorio se generaron líneas mutantes (por medio de la escisión de un elemento P) y se aislaron aquellas que presentan un fenotipo de apertura dorsal. Estas líneas presentan una alteración de un gen al que se le dio el nombre de *piragua* (*prg*). En este trabajo se ha estudiado y caracterizado parte de la función del gen *prg* en el desarrollo, por medio de técnicas genéticas y de biología molecular. Hemos clasificado 7 alelos de *prg* mediante el análisis fenotípico; cuatro alelos mutantes fuertes y tres alelos mutantes débiles. También contamos con un alelo revertiente. Observando detalladamente el patrón de expresión del mensajero y el patrón de expresión de la proteína del gen *prg* en embriones silvestres hemos obtenido información importante acerca de la función de este gen como posible factor de transcripción. Finalmente, utilizando dos de los alelos fuertes de *prg* en pruebas de interacción genética se pudo estudiar la participación del gen *prg* en la vía de JNK.

ABSTRACT

Dorsal closure is a process that occurs during embryonic development of *Drosophila melanogaster*; it involves changes of shape of epithelial cells. Communication between cells is critical to change shape in an organized manner for dorsal closure to occur. A MAPK-like signal transduction pathway called Jun N-terminal Kinase (JNK) pathway, directs this process. Mutant embryos for genes that participate in the JNK pathway have a dorsal open phenotype, a characteristic phenotype, consequence of failure of dorsal closure. In the lab we generated and isolated mutant stocks with a dorsal open phenotype; these mutations disrupt the *piragua* (*prg*) gene. In this work we studied and characterized, using genetic and molecular biology techniques, *prg* phenotype and *prg* functions during *Drosophila* development. We classified 7 *prg* alleles in 4 strong mutant alleles and 3 weak mutant alleles. We also have a revertant allele. We characterized the mRNA and the protein expression pattern of *prg* in wild type embryos. Finally, we assessed the participation of *prg* in the JNK pathway by performing genetic interaction experiments of *Djun* and *Dfos* mutant alleles with *prg* strong alleles.

INTRODUCCIÓN

Drosophila melanogaster ha sido muy utilizada como un modelo genético por las ventajas que proporciona, como son: su ciclo de vida corto, tamaño pequeño y su genoma secuenciado. Particularmente, se ha puesto un mayor énfasis al estudio de su desarrollo. Este estudio conjuga el análisis genético y el uso de técnicas de biología molecular para dilucidar los mecanismos moleculares que están involucrados en los complejos procesos del desarrollo embrionario. En el laboratorio se estudia el cerrado dorsal. En el cerrado dorsal, las células del epitelio lateral que derivan del ectodermo, cambian de forma gracias a la activación de varias vías de transducción de señales. La vía de la cinasa de Jun media varias señales que orquestan el proceso. Para estudiar este proceso y esta vía, obtuvimos mutaciones en genes que se requieren para el cerrado dorsal. Las mutaciones de genes que intervienen en el proceso generan fenotipos letales de falta de cerrado dorsal, también conocido como apertura dorsal. En particular, se trabajó con una inserción de un elemento P modificado y se generaron escisiones a partir de las cuales se obtuvieron 7 alelos mutantes de un nuevo gen: *piragua* (*prg*). En el presente trabajo se muestra la caracterización a nivel molecular de los diferentes alelos de *prg* con técnicas de biología molecular como el análisis por PCR. Ya que contamos con anticuerpos policlonales contra una proteína recombinante generada a partir de la secuencia del mRNA de este gen y una sonda de RNA, también se muestra la caracterización del patrón de expresión de *prg* en el desarrollo embrionario, así como los resultados de las pruebas de interacción genética con genes que presentan el fenotipo de apertura dorsal de manera similar a *prg*.

ANTECEDENTES

1. TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

La comunicación entre células es muy importante en los organismos pluricelulares para poder coordinar las funciones de los distintos tipos celulares en el tiempo y en el espacio. Las vías de transducción de señales son procesos involucrados en esta comunicación, a través de moléculas señalizadoras, como son: los neurotransmisores, hormonas, factores de crecimiento y feromonas. Estas moléculas son secretadas por células que mandan la señal a otras, que responden alterando su comportamiento y/o expresión génica. Las vías de transducción de señales inician cuando las moléculas señalizadoras se unen a un receptor específico en la célula blanco, lo cual induce un cambio conformacional en el receptor. El cambio conformacional se convierte en una señal que se transmite a través de la molécula al interior de la célula. Esta señal se va a transducir por medio de moléculas intermediarias que participan en una cascada intracelular hasta activar a proteínas efectoras (esto se lleva a cabo muchas veces por la fosforilación o desfosforilación de proteínas blanco), como aquellas que alteran el metabolismo, el movimiento o forma celular e incluso el encendido y apagado de genes, obteniendo así una respuesta (Alberts *et al.*, 2002).

2. LA VÍA DE TIPO MAPK

La vía de tipo MAPK (*mitogen-activated protein kinase* o proteínas cinasas activadas por mitógenos, por sus siglas en inglés) es un tipo de vía de transducción de señales caracterizada por la intervención de cinasas intermediarias que transmiten la señal por medio de fosforilaciones en cascada.

Esta vía es activada a través de un ligando que se une a su receptor de membrana del tipo de las cinasas de tirosina. Estos receptores tienen actividad enzimática intrínseca y se dimerizan al ser activados, después sufren un cambio

de conformación de sus subunidades que acerca los dominios con actividad de tirosina cinasa, de manera que pueden autofosforilarse de forma cruzada e iniciar la señalización intracelular (Alberts *et al.*, 2002; Gomperts *et al.*, 2003).

Cada receptor interactúa con una o más proteínas que se unen a sus sitios fosforilados, entre ellas las GNEF o “factores intercambiadores de GTP”. Por medio de estas proteínas se activan proteínas tipo Ras mediante la estimulación del intercambio de GDP por GTP. Las proteínas GAP o “Proteínas Activadoras de GTPasa” regulan negativamente a estas proteínas tipo Ras. La proteína tipo Ras es central en una ruta conservada a lo largo de la evolución para dirigir señales extracelulares hacia el núcleo, en donde se activan genes específicos de respuesta inmediata para el crecimiento, la división y la diferenciación celular. Se han descubierto proteínas relacionadas con Ras en organismos tan diversos como las levaduras, los nemátodos y *Drosophila*, lo cual ha permitido entender rutas de control central en las células de los mamíferos y ha justificado ampliamente el empleo de modelos biológicos para la investigación.

Esta proteína tipo Ras activa a una serie de fosforilaciones en cascada a partir de la MAPKKKK (proteína cinasa 3 de la MAPK), luego a MAPKKK (proteína cinasa 2 de la MAPK), esta a su vez a la MAPKK (proteína cinasa de la MAPK), y finalmente a la MAPK (Mathews, 1998), que se trasloca al núcleo y regula por fosforilación a factores de transcripción que inducirán la expresión de genes de respuesta inmediata (Figura 1) (Alberts *et al.*, 2002; Gomperts *et al.*, 2003; Harden, 2002).

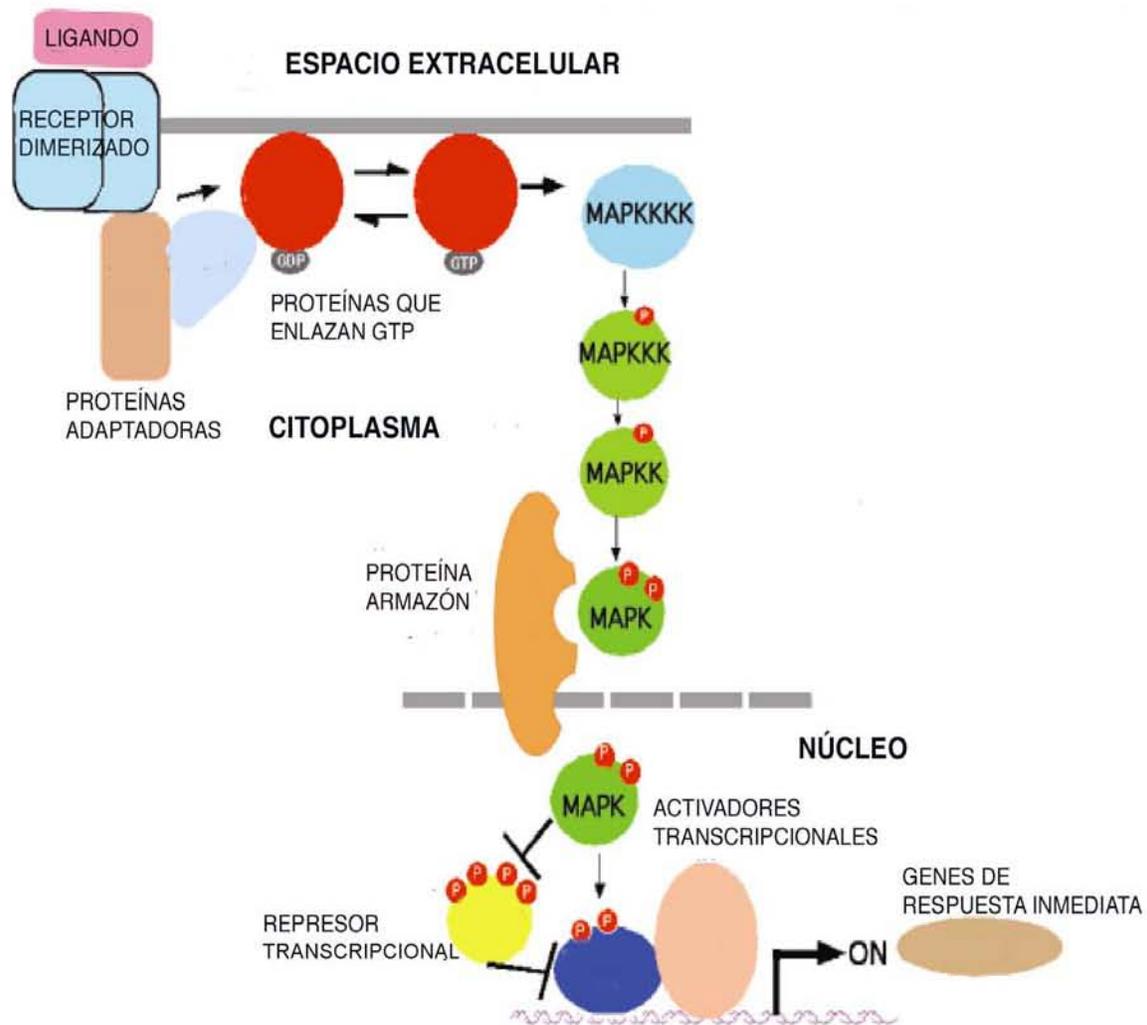


Figura 1. Vía de señalización de tipo MAPK. La vía de señalización de tipo MAPK dirige la señal extracelular al núcleo a través de una serie de fosforilaciones en cascada, que activan a factores de transcripción, que finalmente regulan la transcripción de genes de respuesta inmediata.

3. CERRADO DORSAL Y LA VÍA DE LA JNK

En el desarrollo se requiere de la activación y represión de varios genes; estos a su vez son regulados muchas veces por vías de señalización. La vía de transducción de señales de la cinasa de Jun (JNK), es una vía de tipo MAPK, que

fue inicialmente descubierta en cultivo de tejidos de vertebrados y en levaduras como un mediador de la respuesta al estrés celular (Xia y Karin, 2004).

La vía de la JNK se conoce de esa manera porque la enzima JNK (una MAPK) fosforila a factores de transcripción de tipo Jun en la parte amino terminal en respuesta a la activación de esta cascada (Karin y Gallagher, 2005; Zeitlinger *et al.*, 1997). La vía de la JNK puede ser activada por diversos estímulos relacionados al estrés, así como también ciertas citocinas. Además, la vía de la JNK responde de diversas maneras a esta activación y regula diferentes procesos, por ejemplo: la muerte celular programada conocida como apoptosis (Igaki *et al.*, 2002). Miembros de un grupo de pequeñas proteínas que unen GTP de las familias de Rac y Cdc42 parecen estar involucradas en este proceso, aunque aún no se conocen todos los componentes ni la manera en que participan (Knust, 1997).

Drosophila melanogaster es un organismo conveniente para la disección genética de la vía de señalización de la JNK (Riesgo-Escovar *et al.*, 1996). En este organismo la vía de la JNK es indispensable para llevar a cabo el proceso de cambio de forma celular, necesario para el cerrado dorsal que ocurre durante la embriogénesis (Harden, 2002). La elongación y retracción de la banda germinal, que son movimientos morfogenéticos en el desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster*, llevan al embrión a una apertura en la epidermis dorsal, la cual solo queda cubierta por la amnioserosa, que son células de un tejido extraembrionario, con propiedades diferentes a las epiteliales (Campos-Ortega y Hartenstein, 1997). Subsecuentemente, el cerrado dorsal conduce a un alargamiento de la placa epidérmica sobre la amnioserosa para cubrir al embrión entero. Estas células de la epidermis se unen en la línea media dorsal y las células de la amnioserosa sufren apoptosis, para después ser absorbida en la parte interna del embrión. Durante este proceso que ocurre en ausencia de mitosis, las células de la epidermis se alargan a lo largo del eje dorso-ventral. Este cambio de forma inicia en la fila de células epidérmicas más dorsales, las cuales forman las así llamadas “células de la hilera guía” ó de “leading-edge” (Brody, 1996). Una señal que emana

de estas células controla y coordina el progreso del cerrado dorsal (Zeitlinger *et al.*, 1997; Riesgo-Escovar y Hafen, 1997a).

En *Drosophila* también se conocen algunos de los genes que conforman esta vía de la JNK. Un gen homólogo al gen que codifica para la JNKKKK (proteína cinasa 3 de la JNK) (MSN, Figura 2) es el gen llamado *misshapen (msn)* (Su *et al.*, 1998).

En vertebrados existen seis familias de la JNKKK (proteína cinasa 2 de la JNK) que se encuentran abajo de la JNKKKK, las cuales emergen como posibles reguladoras río arriba de la JNK, pero en *Drosophila* hay un solo gen homólogo para cada una de ellas. Se ha caracterizado a una cinasa de tipo “linaje mezclado de cinasas” (“mixed lineage kinase”, abreviado como MLK) (SLPR, Figura 2) codificada por el gen *slipper (slpr)* que participa en la vía de la JNK de *Drosophila* (Stronach y Perrimon, 2002).

Después en esta misma vía se encuentra *hemipterous (hep)* y *basket (bsk)*, los cuales codifican para una cinasa de la JNK de *Drosophila* (JNKK) (HEP, Figura 2) y para la JNK (BSK, Figura 2) respectivamente (Riesgo-Escovar *et al.*, 1996). *ck1* ó conector de cinasa a AP-1, es un gen que codifica para una proteína que forma un complejo con Hep, Bsk, DJun y DFos, actuando como proteína armazón (Chen *et al.*, 2002). Bsk activado fosforila a DJun y de esta manera lo activa. DJun activado se une a DFos y forman el complejo AP-1 (AP-1, Figura 2).

Finalmente, este complejo AP-1 activa la transcripción de genes blanco, como *chickadee (chic)*, *decapentaplegic (dpp)* y *puckered (puc)*; genes que codifican a la proteína homóloga de la profilina (CHIC, Figura 2), a la proteína homóloga del TGF- β (DPP, Figura 2) y a una fosfatasa involucrada en la regulación de la vía de la JNK (PUC, Figura 2) por medio de retroalimentación negativa en *Drosophila* (Jasper *et al.*, 2001).

DJun y DFos se unen a los elementos *enhancer*. Para esta interacción proteína-DNA, DJun y DFos se dimerizan a través del dominio zipper de leucina, resultando un heterodímero que consiste de una molécula de DJun y otra molécula de DFos (Rosseau y Goldstein, 2001).

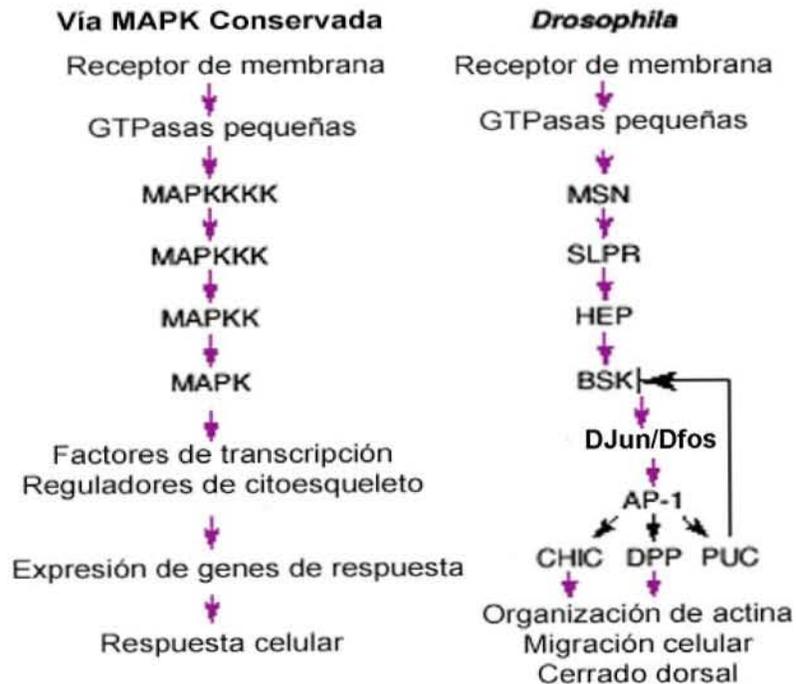


Figura 2. Vía de la JNK. La vía de la JNK en *Drosophila* es una vía del tipo de la MAPK que dirige señales extracelulares al núcleo a través de una serie de fosforilaciones en cascada, que activan al complejo AP-1 (DJun/DFos), el cual regula la transcripción de genes de respuesta inmediata para llevar a cabo el cerrado dorsal. A la izquierda se presenta la vía del tipo de la MAPK conservada y a la derecha la vía de la JNK de *Drosophila*. MSN=JNK4, SLPR=JNK3, HEP=JNK1, BSK=JNK2, CHIC=profilina DPP=TGF- β PUC=fosfatasa de la JNK (imagen modificada de Xia y Karin, 2004)

DJun y DFos pueden formar también homodímeros. El heterodímero DJun-DFos es más estable que el homodímero DJun (Zeitlinger *et al.*, 1997) y dado que se requieren los dos genes durante el cerrado dorsal, es probable que el heterodímero DJun-DFos sea el factor de transcripción activo (Riesgo-Escovar y Hafen, 1997b).

4. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN Y MOTIVOS DE UNIÓN AL DNA

Los factores de transcripción son proteínas que se unen al DNA por medio de unas secuencias características presentes en su estructura comúnmente

conocidas como “motivos”, las cuales les permiten regular la expresión de genes. A continuación se definirán algunos motivos de unión al DNA que se utilizan en la vía de la cinasa de Jun o JNK, una vía del tipo de las MAPK. El gen en estudio en este trabajo tiene motivos de unión al DNA (dedos de zinc), y es posible que se relacione con algunos factores de transcripción de la vía de la cinasa de Jun, que contienen en su estructura secuencias de interacción proteína-proteína, comúnmente conocidos como “dominios” del tipo de zipper de leucina, que les facilita su unión al DNA.

4.1 Zipper de leucina

El dominio de zipper de leucina contiene cadenas de 35 aminoácidos en las cuales la leucina (Leu) se encuentra repetida en intervalos de 7 aminoácidos. Estas regiones de la proteína forman una hélice anfifílica, con las Leu dentro en una cara.

Estas proteínas pueden formar un dímero, estabilizado por el enlace de estas hélices anfifílicas de una a otra, formando una espiral. Por lo tanto el zipper de leucina representa el dominio de enlace proteína/proteína.

El dominio que se une al DNA generalmente se encuentra en los primeros 30 aminoácidos a partir del extremo N-terminal de la cadena polipeptídica. Estos aminoácidos son básicos y forman una alfa hélice cuando la proteína se enlaza al DNA. El dominio zipper de leucina une dos proteínas que juntas se unen al DNA, permitiendo a las bases de las hélices N-terminal interactuar con el DNA de una manera base-específica (Jakubowski, 2006). Este motivo de unión al DNA está presente en factores de transcripción como Jun y Fos (Chinenov y Kerppola, 2001).

4.2 Dedos de zinc

Los motivos de dedos de Zinc (Zn) son estructuras proteicas que se enlazan a ácidos nucleicos, como también a otras proteínas. Este motivo fue inicialmente identificado en el factor de transcripción TFIIIA de *Xenopus* (Matthews y Sunde, 2002).

Hay diversas clases de dedos de Zn, los cuales se caracterizan de acuerdo a la posición y número de sus residuos de histidina y cisteína. Estos residuos son los responsables de enlazar al átomo de Zn. En los dedos de Zn del tipo C2H2 (Figura 3), un par de cisteínas se encuentra en el inicio de la cadena de aminoácidos que conforman el dedo de Zn y existen después un par de histidinas en este mismo motivo. Estos motivos de dedos de Zn del tipo C2H2 son motivos clásicos de unión al DNA, y por lo tanto, este motivo se encuentra presente en diversas proteínas que enlazan al DNA como son los factores de transcripción. Además, este motivo se puede unir tanto al DNA como al RNA.

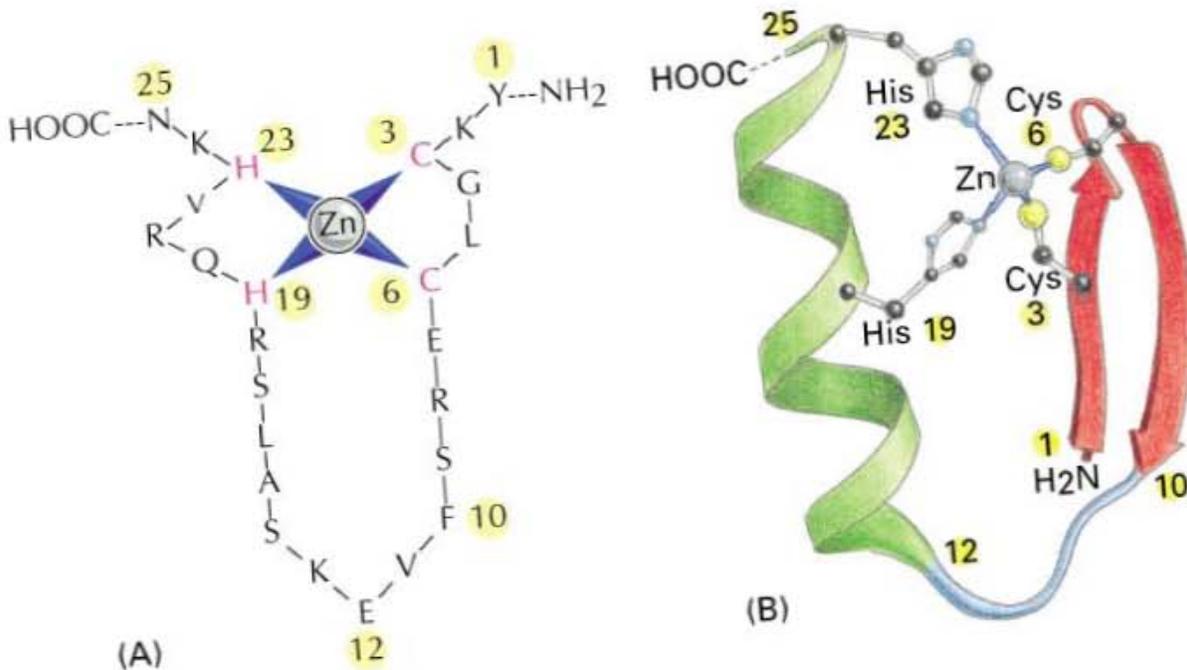


Figura 3.- Motivo de unión al DNA en forma de dedos de zinc. El tipo C2H2 esta compuesto de dos cadenas beta cortas seguidas por una alfa hélice. La parte amino terminal de la alfa hélice es la que se enlaza al surco mayor del DNA. (A) Muestra una representación esquemática y (B) una representación en listones de este motivo para una proteína de rana. Los residuos de histidina y cisteína marcados con las posiciones 3, 6, 19 y 23 en este ejemplo, son los que se unen al átomo de Zn^{2+} y permiten el arreglo conformacional en forma de dígito (imagen modificada de Alberts *et al.*, 2002).

Un dedo de Zn del tipo C2H2 está compuesto de 25 a 30 aminoácidos que incluyen 2 cisteínas (Cys o C) y 2 histidinas (His o H) en un motivo que puede ser del tipo C-2-C-12-H-3-H, en donde los 12 residuos que separan la segunda cisteína y la primera histidina son principalmente polares y básicos, e involucran a esta región como el sitio de unión al DNA. Estos motivos son regularmente pequeños y el Zn^{2+} sirve como elemento crucial para el plegamiento y estabilización de la estructura terciaria. Las dos cisteínas e histidinas se unen a un átomo de Zn^{2+} por medio de enlaces coordinados en un arreglo tetraédrico proyectando al sitio de enlace al DNA como un dedo el cual interactúa de manera específica con nucleótidos en el surco mayor de la hélice del DNA, reconociendo aproximadamente de 2 a 5 pares de bases (Jakubowski, 2006; Alberts *et al.*, 2002).

Los dedos de Zn del tipo CCHC, pueden servir como motivos de unión a otras proteínas (Laity *et al.*, 2001). La estructura de este tipo de dedo de Zn es muy similar al motivo clásico del tipo C2H2, es decir, la sustitución de una histidina por una cisteína parece tener poco efecto en la conformación. Sin embargo, proteínas que pertenecen a la familia de los amigos de GATA (FOG por sus siglas en inglés) pierden la capacidad de interacción con las proteínas de la familia GATA-1 (factores de transcripción que se unen a secuencias GATA consenso) cuando se sustituyen los dedos de Zn del tipo CCHC por C2H2, aunque el arreglo estructural se mantenga (Matthews *et al.*, 2000).

5. LAS MUTANTES DE APERTURA DORSAL

Las mutaciones que afectan a componentes de la vía de transducción de señales de la JNK, como los antes mencionados, son letales. Estas mutaciones causan defectos en el cerrado dorsal de los embriones de *Drosophila*, ya que se bloquea el cambio de forma celular (Riesgo-Escovar *et al.*, 1996).

El fenotipo resultante de todas estas mutaciones (conocido como apertura dorsal) se caracteriza por la ausencia de la elongación de las células en la epidermis lateral, lo que generalmente concuerda con la pérdida de expresión del

gen *dpp* en las células epiteliales más dorsales del embrión (Zeitlinger *et al.*, 1997; Riesgo-Escovar y Hafen, 1997b).

La vía de transducción de señales activada por Dpp, el homólogo del TGF- β en *Drosophila*, también es esencial en el cerrado dorsal (Affolter *et al.*, 2001; Riesgo-Escovar y Hafen, 1997a). Las mutaciones en los genes *thickveins* (*tkv*) y *punt* (*put*), que codifican para receptores de membrana de Dpp, resultan en fenotipos similares, y cuando se expresa *tkv* activo se rescata parcialmente el fenotipo mutante de los genes de la vía de la JNK (Affolter *et al.*, 1994).

Esto ha llevado a la conclusión de que la activación de Jun por la JNK en las células más dorsales del epitelio lateral regula al gen *dpp*, a través de una activación transcripcional directa de este gen por *Djun* y *Dfos* durante el cerrado dorsal (Riesgo-Escovar y Hafen, 1997b).

5.1 *piragua*

En el laboratorio se han generado nuevas líneas con fenotipos mutantes para procesos del desarrollo de *Drosophila*; de estas líneas se aislaron aquellas que presentan el fenotipo mutante de apertura dorsal. Los genes mutados en estas líneas son por lo tanto letales embrionarios, además de ser recesivos. A uno de estos genes se le dio el nombre de *piragua* (*prg*) debido a la apariencia física de las cutículas de los embriones homocigotos mutantes de este gen. El orificio en la parte dorsal del embrión genera una cutícula que se asemeja a este tipo de embarcación, al igual que otros genes mutantes con fenotipo de apertura dorsal.

La escisión de un elemento P modificado (herramienta muy utilizada en *Drosophila* para generar mutaciones), por medio de cruces de moscas que contenían el elemento P (línea RD 401) con moscas transgénicas que contenían la secuencia que codifica para la enzima transposasa $\Delta 2-3$ en su genoma (enzima que cataliza la escisión del elemento P) (Robertson *et al.*, 1988) generó 8 alelos mutantes del gen *prg* (Araceli Gómez *et al.*, datos no publicados del laboratorio).

prg está mapeado en la región 29C, en el brazo izquierdo del cromosoma 2. La secuencia predicha de la proteína codificada por el gen *prg* (CG9233) (Drysdale *et al.*, 2005) presenta 9 motivos de interacción con el DNA del tipo dedos de Zn en su forma más clásica (C2H2), es decir, los residuos aminoácidos que se unen al Zn²⁺ son dos cisteínas y dos histidinas (Figura 4).

```

      10      20      30      40      50
MHTSDISMTQDQDVSTCRLCHHNTDPNSLNIFFDDTVQFCKDVSI AEVSKS
      60      70      80      90     100
LWSVQYDRNECLSELICSRCLEILEEAFELRKGMQEREQSLQEQLKEMIK
      110     120     130     140     150
DHPKHRPGLNGNPGVFPVEEGCIIVEVDPENLAESSEEEFALGSDGEYEN
      160     170     180     190     200
YDDDEEEEEEDYDEEDEEDGQNGEDVDMPLGMDAAQMAAQSVANNANTT
      210     220     230     240     250
EARPKRAFLCQYCDLGFTLPAECQEHELAAHDPNAPYCCNFCNIKLVTRP
      ZF1                                ZF2
      260     270     280     290     300
ALISHIKTLHDPDRPYVCAHCRKGFVRRSDLKKHTIVHTGVRPFTCNVCS
      ZF2                                ZF3                                ZF4
      310     320     330     340     350
KFSRNTNLTTKHMRIHSGVKPFVCQQCPRSFQTAVEMMRHTRSHGEVKAF
      ZF4                                ZF5
      360     370     380     390     400
QCGRCPYSFSRRDKLIAHQQVHTRRDMEQQQMGLIPPMEGDLQQQALQA
      ZF6
      410     420     430     440     450
KQKAAAQTKNSRYYHCDVCDRTFQRELDQRHQALHMDSLFACKTCNQGF
      ZF7                                ZF8
      460     470     480     490     500
NRREQLQRHELEAHGPSFTCGICCISFLHQIELENHLKVHQLQHKMAQRA
      ZF8                                ZF9
      510     520     530     540     550
QEAAAILPLKMAEKAPVAMTAPLVQDPQLVVRPSAAELSFYSNMIPTMNLGF
      558
YSETRPEE

```

Figura 4.- Secuencia de Prg. La secuencia de la proteína predicha que es codificada por el gen *prg* tiene nueve dedos de Zn (ZF1-ZF9) del tipo C2H2 (subrayados en el esquema), localizados en las posiciones: 210-231, 238-260, 268-288, 296-316, 324-344, 352-372, 416-436, 443-464, 470-490. Las cisteínas y las histidinas están marcadas con rojo (Drysdale *et al.*, 2005).

Como hemos visto, aún cuando la vía de la JNK en *Drosophila* ha sido ampliamente estudiada no se conocen todos los genes que participan en ella; por otra parte, el cerrado dorsal resulta ser un modelo muy útil para el estudio de esta vía de transducción de señales.

En este trabajo, con base en los antecedentes presentados, se muestra la caracterización fenotípica y molecular de 8 alelos del gen *prg*. También se analizó el patrón de expresión del transcrito y de la proteína codificada por el gen *prg* durante el desarrollo de embriones silvestres y mutantes, y se presenta la interacción de *prg* con genes que pertenecen a la vía de la JNK. Finalmente, proponemos dos modelos que explican la participación de *prg* en el proceso de cerrado dorsal.

HIPÓTESIS

En el proceso de cerrado dorsal durante el desarrollo embrionario de la mosca *Drosophila melanogaster*, el gen *prg* participa como un componente de la vía de JNK.

OBJETIVOS

GENERAL

Demostrar que *prg* es un gen que participa en la vía de la JNK durante el proceso de cerrado dorsal.

PARTICULARES

- ⇒ Caracterizar a nivel fenotípico y molecular los diferentes alelos del gen *prg*.
- ⇒ Observar el patrón de expresión del transcrito y de la proteína del gen *prg* en el desarrollo embrionario.
- ⇒ Observar las interacciones genéticas de *prg* con otros genes de la vía de la JNK.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

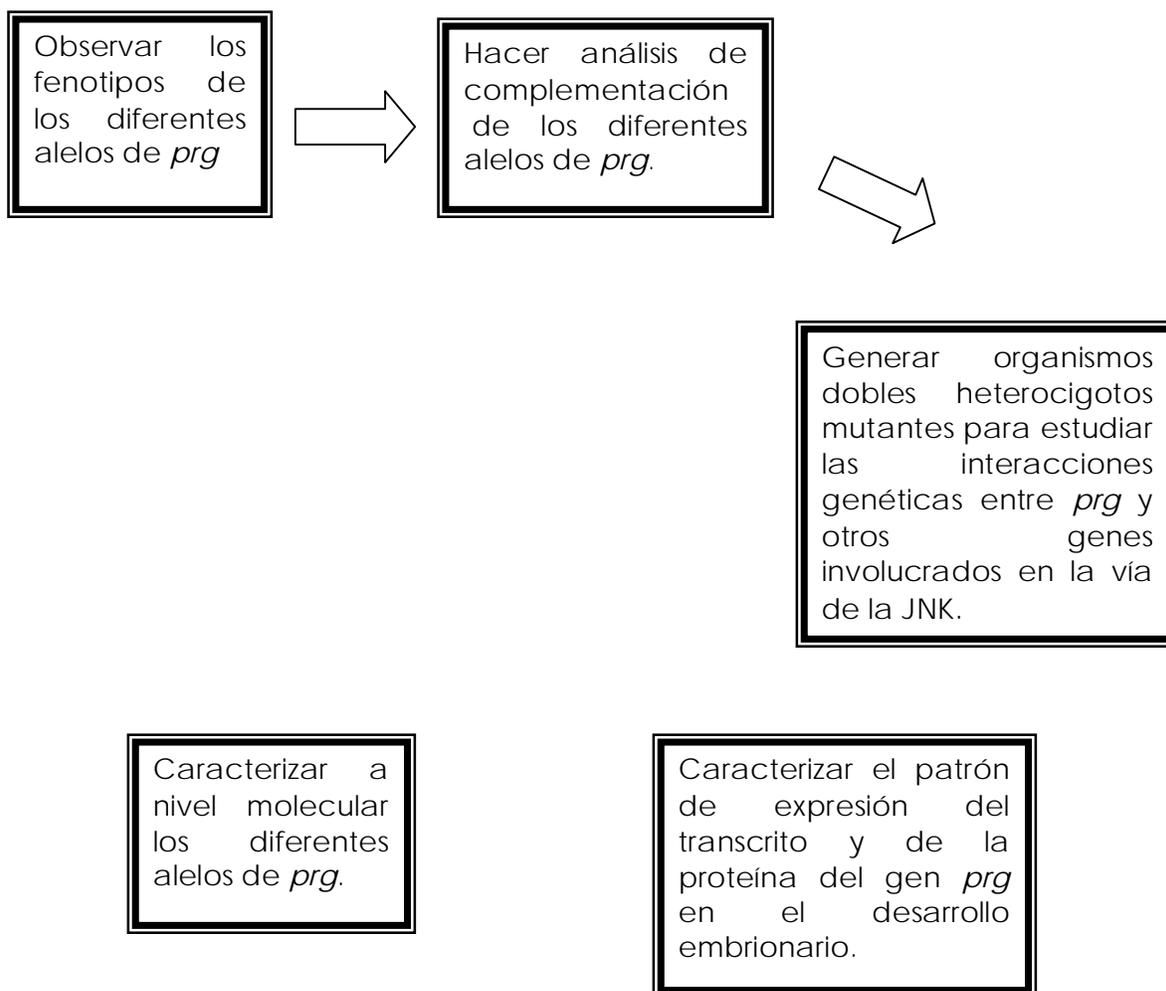


Figura 5.- Diagrama de flujo que esquematiza la ruta a seguir para la caracterización del gen *prg*.

MATERIAL Y MÉTODOS

CARACTERÍSTICAS DE LAS LÍNEAS UTILIZADAS

Los 8 alelos de *prg* se mantienen como líneas heterocigotas balanceadas por medio de un cromosoma balanceador llamado *Curly of Oster (CyO)*. Un cromosoma balanceador es un cromosoma que tiene múltiples rearrreglos y que impide que pueda haber entrecruzamientos con su cromosoma homólogo, y así evitar que por recombinación se pierda la mutación generada (Greenspan, 2004). El cromosoma con el que están balanceadas las líneas de los diferentes alelos mutantes de *prg* tiene también una mutación recesiva letal que impide tener organismos homocigotos para este cromosoma balanceador (*CyO/CyO* se mueren). De este modo, solo se obtienen organismos heterocigotos que contienen un cromosoma con la mutación de *prg* y el cromosoma balanceador con una versión silvestre de *prg*. En el apartado de interacciones genéticas se describen algunos genes marcadores y cromosomas balanceadores que se utilizaron para estas pruebas. Para obtener información más detallada acerca de estos datos consultar en la página web: <http://flybase.bio.indiana.edu/> (Drysdale, 2005).

PREPARACIÓN DE CUTICULAS

Para caracterizar el fenotipo mutante de cerrado dorsal de los diferentes alelos del gen *prg*, se recurrió al análisis de las cutículas de los embriones homocigotos muertos.

OBTENCIÓN DE EMBRIONES (Puestas)

En un vaso de precipitado de plástico, con orificios pequeños en la base, se colocaron algunas moscas de la línea silvestre *yellow white (yw)* como control, mientras que en otros se colocaron moscas heterocigotas para *prg* (hembras y machos), y se taparon con una caja Petri de tamaño igual al diámetro del vaso, la cual contenía una base de agarosa y jugo de uva, de forma sólida y en la superficie un poco de levadura en polvo.

Después se invirtió el vaso y se puso en un medio ambiente adecuado para su desarrollo (temperatura = 25° C, humedad = 50%).

Después de 24 horas de incubación, se cambió la caja petri por una limpia, con un poco de levadura en polvo. Las cajas con las puestas de 24 hrs se dejaron en las condiciones mencionadas otras 24 hrs para que los embriones se terminaran de desarrollar y se observaron embriones muertos, los cuales se recolectaron.

RECOLECCIÓN DE EMBRIONES

Después de 48 horas de la puesta, a la caja se le agregó agua destilada. Con un pincel de pelo de camello se despegaron los embriones, y después se filtraron con una malla de poro adecuado (100 µm) para retener a los embriones. Los embriones se enjuagaron varias veces hasta que la levadura quedó disuelta.

Los embriones recolectados se pasaron a una solución 1:1 de hipoclorito de sodio en agua destilada, hasta que se decoloraron (se observaron con ayuda del microscopio estereoscópico). Se sacó la malla de la solución y se enjuagaron los embriones con agua destilada, se quitó el exceso de agua, se transfirieron los embriones a un vial de 1.5 ml con 750 µl de heptano con la ayuda del pincel remojado en heptano (las larvas que contenía el filtrado quedaron atrapadas en el pincel).

FIJADO Y MONTAJE

Una vez recolectados los embriones y puestos en heptano, se adicionaron 750 µl de metanol y EGTA 0.5 M (1 µl por cada 10 µl de metanol), y se agitó vigorosamente por 30 segundos. Se removió todo el líquido y se lavaron 3 veces con metanol, después dos veces con agua desionizada y se montaron en un cubreobjetos con medio de Hoyer para digerir los tejidos blandos. Se observaron al microscopio después de 24 horas y se tomaron las fotografías.

SOUTHERN BLOT

Con la finalidad de conocer las diferencias moleculares del locus de *prg* de los diferentes alelos, se llevó a cabo el análisis de segmentos de DNA que pertenecen

a esta región genómica utilizando una sonda generada a partir del cDNA del gen *prg* (clona RE40751) obtenido a partir del programa EST (siglas derivadas del inglés “expressed sequence tags”) para generar cDNA’s, del proyecto del genoma de *Drosophila* de Berkeley (BDGP por sus siglas en inglés).

EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL DNA GENÓMICO DE CADA UNA DE LAS LÍNEAS.

Treinta moscas heterocigotas de cada línea de todos los alelos mutantes (*prg*⁸, *prg*¹⁰, *prg*¹⁴, *prg*¹⁹, *prg*²⁵, *prg*²⁸, *prg*³¹ y *prg*³²), cultivadas en tubos con medio de cultivo, se anestesiaron en una cámara de CO₂, después se depositaron en un vial de 1.5 ml. Se trituraron con un pistilo de teflón y se pusieron en hielo. A continuación, se agregó una mezcla de una solución amortiguadora (buffer) de homogenización (NaCl 80mM, Sacarosa 160mM, EDTA 8 mM pH 8 y Tris-HCl 25mM pH 8) con buffer de lisis (EDTA 100mM pH 9, SDS 1% y Tris-HCl 200 mM pH 9) 1:1, y se agregaron 300 µl a cada vial con moscas previamente maceradas. Se agregaron 2 µl de la enzima proteinasa K y se incubó a 60° C durante 30 minutos a baño María; se dejó enfriar. Se agregaron 300 µl de fenol, se agitó 2 minutos y se centrifugó a 9500Xg en una microcentrífuga por 20 minutos a 4 °C, se extrajo la fase acuosa con una punta recortada en la parte distal y se puso en un vial nuevo, se repitió la operación. Una vez que las muestras están en el 3^{er} vial, se le agregaron 600 µl de etanol al 100 % y 30 µl de acetato de potasio 3M. Se observó la aparición de fibras de DNA genómico. Se centrifugó nuevamente por 10 minutos y se decantó el sobrenadante, se adicionaron 500 µl de etanol al 70 % para eliminar el exceso de sales. Se centrifugó por 10 minutos y se decantó, se resuspendió en 20 µl de buffer Tris-EDTA (TE).

DIGESTIÓN

Para generar fragmentos de DNA genómico de diferentes tamaños de los alelos de *prg* y estudiar con estos las lesiones moleculares, se tomaron 10 µl de DNA (equivalentes al extracto de 15 moscas) y se colocaron en un vial nuevo. A este se le añadió 1.5 µl de buffer de digestión 10X, 0.5 µl de RNAsa A, 1 µl de la

enzima de restricción con la que se cortó el DNA genómico (EcoR1 o Msp1) y 2 μ l de agua desionizada estéril. Se incubó a 37°C por dos horas. Durante este procedimiento las enzimas de restricción cortan de manera específica y en varias partes del genoma originando fragmentos de distintos pesos moleculares, entre estos, al menos uno que pueda ser reconocido por la sonda.

SEPARACIÓN Y TRANSFERENCIA

Para separar los distintos fragmentos de DNA genómico generados por la digestión con las enzimas de restricción de los diferentes alelos de *prg*, se utilizó una cámara de electroforesis y se cargaron los pozos con toda la muestra de la digestión y buffer de cargado (1 μ l del buffer de cargado por cada 4 μ l de la digestión), así como también un carril con una mezcla de marcadores de peso molecular, en un gel de agarosa al 0.8 % (en TAE 1X) con bromuro de etidio (10 mg/ml). El gel se dejó correr usando entre 18 y 30 voltios de corriente directa, durante toda la noche. Cuando el colorante de menor peso molecular alcanzó 3/4 partes del gel, se detuvo la electroforesis y se observó el gel en el transiluminador.

Para la transferencia del DNA del gel a la membrana de nitrocelulosa se forró una base para poner el gel con papel filtro Whatman 3MM. Esta base se colocó dentro de un recipiente, y ahí mismo se agregó buffer SSC 20X para humedecer el papel, tratando de evitar la formación de burbujas. En caso de que se formen, se pasa un lapicero redondo para sacar las burbujas. Se colocó el gel boca abajo, y encima un filtro de nitrocelulosa del tamaño del gel previamente húmedo. Después se agregó suficiente buffer de transferencia (SSC 10X). Para orientar la posición del gel en la membrana de nitrocelulosa, se les hizo un pequeño corte en una de las esquinas al gel y al filtro. Después se colocó una torre de papel absorbente y un poco de peso sobre la torre, para ejercer presión contra el gel. Se dejó la transferencia toda la noche. Al día siguiente se tomó la membrana, se fijó el DNA a la misma por medio de un UV Crosslinker (Hoefer) y se utilizó la membrana para llevar a cabo la hibridación.

Se puso el filtro a pre-hibridar a 42°C en solución de hibridación, y posteriormente se agregó una sonda desnaturalizada y marcada con radioactividad (se describe más adelante). Se dejó hibridar durante 13 horas. 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. Si la radioactividad remanente fue de un nivel adecuado se deja de lavar y se expone el filtro, si no se continúa lavando con la misma solución a 42°C. Se expuso la membrana radioactiva a una pantalla sensible a las partículas beta emitidas por ³²P durante 24 horas y posteriormente se reveló en un Phosphorimager (Storm) obteniéndose una imagen digital.

ELABORACIÓN DE LA SONDA.

Para generar mayor cantidad de bacterias portadoras del plásmido, se sembró la cepa bacteriana que contiene el plásmido con el cDNA de interés (del gen *prg*) y una secuencia que confiere la resistencia a cloranfenicol, en una caja Petri con un medio de cultivo sólido LB con cloranfenicol (0.025 mg/ml). Se dejó incubando durante 24 horas a 37 °C. Se tomó una colonia aislada de la caja Petri y se sembró en un tubo con cultivo líquido LB con antibiótico. El cultivo se incubó por 13 horas con agitación a 37 °C y se virtió el cultivo en viales de 1.5 ml. Se concentraron las bacterias en el fondo del tubo (por centrifugación). Después se purificó el plásmido mediante una miniprep (como se describe más adelante) y se resuspendió en 20 µl de TE. El DNA del plásmido recién purificado se digirió con enzimas de restricción (Bam HI y Xho I) para liberar el fragmento correspondiente al cDNA en ese plásmido. Se separó el DNA digerido en un gel de agarosa 0.8 % en TAE 1X y se purificó la banda que corresponde al tamaño del cDNA que se desea marcar. Se resuspendió el cDNA en 8 µl de agua para PCR. Se utilizaron 2 µl del cDNA en el marcaje, junto con 10 µl de agua desionizada y 5 µl de la solución que contiene los oligonucleótidos de secuencia corta aleatoria (de 9 nucleótidos de longitud) que se van a insertar al azar en el cDNA para generar fragmentos de diferente tamaño.

Se colocaron los tubos a 95 °C por 5 minutos y se centrifugaron (9500Xg 10s) a temperatura ambiente para recolectar todo el líquido remanente de las paredes y de la tapa. Después, se agregaron 5 µl del buffer que contiene los deoxinucleotidos trifosfatados (dNTPs) a una concentración de 5X, 2.5 µl del nucleótido marcado con ³²P [(α-³²P) dCTP] y 0.5 µl de la enzima DNA polimerasa (2.5 unidades). Se incubaron a 37 °C durante 10 minutos. Se le agregaron 2 µl de una solución con EDTA para detener la reacción y se llevó a 100 µl con agua desionizada estéril. Se purificó la muestra con una columna (Quick Spin) previamente tratada como lo indica el fabricante centrifugando por 3 minutos a 2500 RPM. Se eliminó la columna y el líquido del tubo colector (sonda) se desnaturalizó por 10 minutos a 95 °C y se agregó al medio de hibridación con la membrana previamente pre-hibridizada. Se dejó hibridar toda la noche a 42 °C en un horno de hibridación. Al día siguiente se lavó con SSC 0.1X y SDS 0.1% tres veces a temperatura ambiente, agitando fuertemente durante 2 minutos, de acuerdo con lo descrito antes.

ANÁLISIS DE SECUENCIAS DEL LOCUS DE *prg*

Debido a que se conoce el lugar en donde se encuentra insertado el elemento P en la línea original (Figura 6A), se pudieron diseñar oligonucleotidos (Araceli Gómez *et al.*, datos no publicados del laboratorio) que flanquean el sitio de inserción y de esta manera amplificar por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) la zona circundante a este punto de los diferentes alelos (Figura 6B). Después, se recurrió a la amplificación por clonación en *Escherichia coli* (*E. coli*) y a la secuenciación de esta región genómica para conocer las posibles diferencias moleculares que existen en el locus de *prg*.

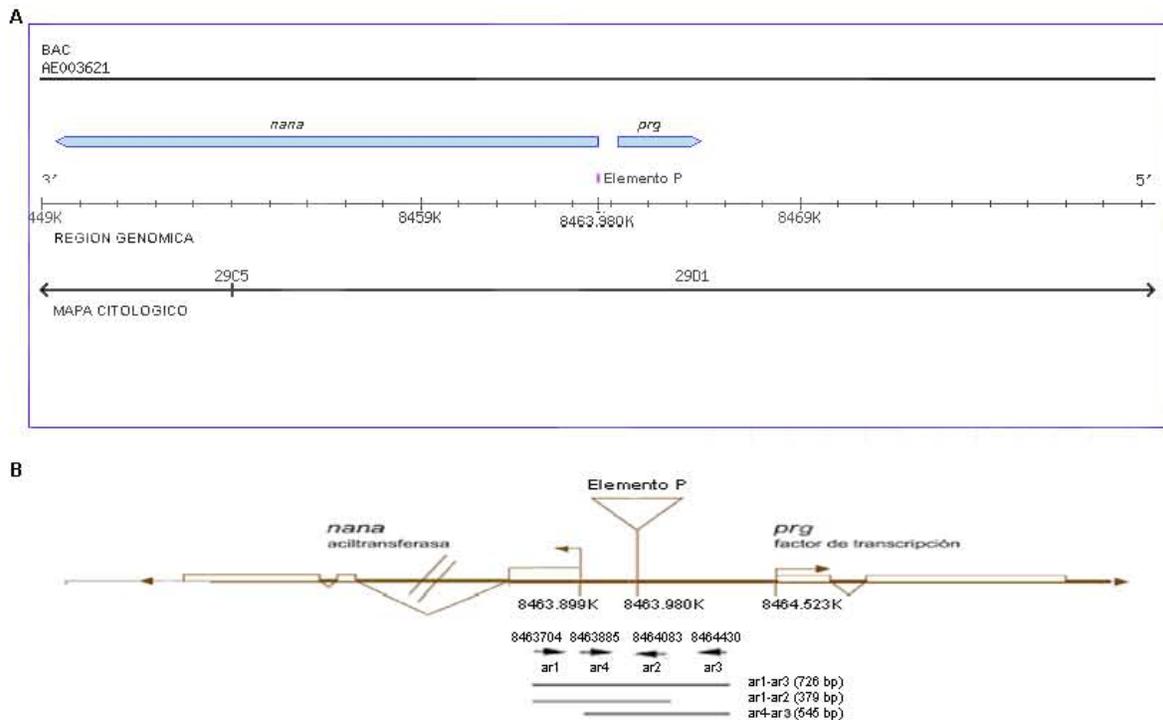


Figura 6.- Región genómica de *prg*. A) Muestra el sitio de inserción del elemento P. B) Muestra la ubicación de los oligonucleótidos (ar1, ar2, ar3 y ar4) que flanquean la zona aledaña al sitio de inserción del elemento P. El tamaño esperado de las cadenas de DNA amplificadas son de 726, 545 y 379 bp, para los pares de oligonucleótidos utilizados: ar1-ar3, ar1-ar2 y ar4-ar3 respectivamente.

Se siguió el protocolo anterior de las puestas para obtener embriones muertos con apertura dorsal (se eligieron embriones muertos con apertura dorsal, ya que estos son homocigotos para el alelo mutante) y de ellos se purificó el DNA.

EXTRACCIÓN DE DNA

Primero se decorionaron los embriones muertos con ayuda de unas pinzas de disección, después se pusieron 5 embriones en un vial de 0.5 ml, y se maceraron con la punta de una pipeta que contenía 20 μ l de SB (el SB está compuesto de Tris-HCl 10 mM a pH 8.2, EDTA 1mM, NaCl 25 mM y 200 μ g / ml de proteinasa K), se incubaron a 37°C por 30 minutos y se inactivó la proteinasa K calentando a 95°C durante 2 minutos.

REACCIÓN DE PCR

En un vial para PCR de 0.2 ml se adicionaron: H₂O para PCR hasta un volumen final de 20 µl, buffer Taq con Mg (10X conc.) hasta una concentración final de 1X, 2µl de la preparación de DNA genómico descrito arriba, dNTPs (10mM) hasta una concentración final de 0.12mM cada uno, oligonucleótido sentido (ar1 ó ar4) y oligonucleótido antisentido (ar2 ó ar3) (20 pmol) hasta una concentración final de 1 pmol/por tubo cada uno, y enzima Taq DNA polimerasa hasta una concentración final de 1-5 U/20µl.

Las secuencias de los oligonucleótidos son:

Sentido

ar1.- CCGCTGCTGCGTAGGGCGTAAC

ar4.- GAATATACGCGCGTACGCACA

Antisentido.-

ar2.- AAAGCAGTGGGCGGCAGGGTAC

ar3.- AGCCGCTGCACAGTGGGTTAC

Las condiciones del termociclador son:

Pasos		Temperatura (°C)	Tiempo
1	Temperatura de estabilización	94	5'
2	Temperatura de desnaturalización	94	30"
3	Temperatura de hibridación	58	50"
4	Temperatura de polimerización	72	50"
5	Repetir del paso 2 al paso 4 por 30 ciclos		
6	Enfriar y mantener a 4°C		
7	Terminar		

Los productos de la reacción de PCR se separaron y observaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%, para comprobar si se habían amplificado correctamente los fragmentos deseados. Una vez que se ha separado correctamente la banda de interés del producto de PCR, esta se cortó del gel con una navaja, se puso en un vial de 1.5 ml y se congeló a -70° por 5 min. Este gel que contenía el producto de PCR, se colocó en un parafilm, se machacó y se adicionó en una columna de elusión (GenElute™ AGAROSE SPIN COLUMN) para purificar el DNA de la agarosa. Se ligaron los fragmentos amplificados a un vector pGEM-T que provee resistencia a ampicilina del kit pGEM-T Easy Vector System I (35 ng del vector, aprox. 0.5 μ l, 5 μ l del buffer 2X, 1 μ l de enzima y 3.5 μ l del sobrenadante que contenía el DNA) y se dejaron a 16° C toda la noche. Después se transformaron bacterias con la ligación.

TRANSFORMACIÓN DE LAS BACTERIAS

La transformación se hizo en bacterias de *E. coli* competentes (por el método de choque térmico, con CaCl_2). Se adicionó el DNA de la ligación anterior a las células competentes y se agitó el tubo suavemente para mezclar. Se pusieron en hielo 30 minutos. Se calentaron a 42° C durante 90 segundos sin agitar. Se volvieron a poner en hielo por 1 o 2 minutos, se adicionaron 800 μ l de medio SOC (extracto de levadura al 0.5%, triptona al 2.0%, NaCl 10mM, KCl 2.5mM, MgCl_2 10mM y MgSO_4 10mM) y se incubaron a 37° C por 45 minutos. Finalmente se sembraron las bacterias en placas de agar con ampicilina y se incubaron a 37° C por 13 hrs. Se seleccionaron las colonias que incorporaron el plásmido; es decir, aquellas que crecieron en la placa y estas se cultivaron en medio LB con ampicilina. Se purificó el plásmido de las bacterias a través de minipreps (ver abajo).

MINIPREPS

Se concentraron las bacterias por centrifugación, y se decantó el medio. Se adicionaron 100 μ l de solución I (Tris 25 mM a pH 8, EDTA 10 mM a pH 8 y glucosa 5 mM), 200 μ l de solución II (NaOH 0.2 N y SDS al 1%) y se invirtieron los

tubos varias veces, y se incubaron por un minuto. Se adicionaron 150 μ l de acetato de potasio 3M, pH 5.5 y se invirtieron varias veces los tubos. Se centrifugaron por 10 minutos a 13 000 RPM. Se extrajo el sobrenadante y se precipitó con dos volúmenes de etanol y 10% del volumen de acetato de sodio 3M, pH 6. Se centrifugaron entonces los tubos a 13,000 rpm. por 2 minutos. Se decantó, se enjuagó el exceso de sales con etanol al 70%, se centrifugó y se decantó. Se dejó secar y se resuspendió el DNA purificado en TE. El plásmido amplificado se secuenció (n=3 colonias) en la unidad de Protogenómica del Instituto de Neurobiología de la UNAM (el método Big Dye de *Applied Biosystems*, en una maquina de PCR y en un secuenciador *ABI PRISM 310 Genetic Analyzer*).

HIBRIDACIÓN *IN SITU*

Se recurrió a esta técnica para determinar el patrón de expresión normal (silvestre) del mRNA del gen *prg* durante el desarrollo embrionario.

FIJACIÓN DE EMBRIONES

Para la preparación de embriones completos, a los embriones decorionados en heptano (preparados tal y como está descrito en el protocolo para la obtención de embriones en la preparación de cutículas) se les agregó formaldehído al 37% hasta tener una concentración del 5 % y 75 μ l de EGTA 0.5 M, pH 7 para fijarlos, y estos se agitaron suavemente durante 20 min.

Posteriormente se dejaron sedimentar y se extrajo la fase inferior (orgánica) sin llevarse los embriones que están contenidos en la interfase. Después se adicionaron 750 μ l de MeOH al 100% y se agitó vigorosamente por 2 min. para eliminar las membranas vitelinas. Se dejaron sedimentar y se extrajo la mezcla líquida (una forma de ver si ha sido removida la membrana adecuadamente es observando que los embriones se sedimentan en el fondo del tubo).

Se extrajo la muestra y se adicionó 1ml de MeOH al 100%, y se dejaron sedimentar los embriones, después se rehidrataron con soluciones consecutivas de MeOH al 70% con PBST y MeOH al 50% con PBST hasta llegar a una solución de PBST (PBS 1X con 0.3% de tritón).

Para aclararlos, se dejaron a temperatura ambiente y se lavaron tres veces con etanol. Después se pusieron en una mezcla etanol/xileno 1:1, y finalmente se cambiaron a xileno, con agitación suave por rotación durante 2 horas y media. Después se pasaron nuevamente por una mezcla etanol/xileno 1:1, y se lavaron tres veces con etanol. Se lavaron una o dos veces con metanol (se pueden guardar a -20°C si no se usan de inmediato). Se pasaron los embriones entonces a un vial de 0.5 ml con la punta recortada de una pipeta automática para no romperlos. Se incubaron con agitación por 5 minutos en una mezcla de metanol y solución de fijación (PBT y 5% de formaldehído al 37%). Después se incubaron en solución de fijación durante 25 minutos, con agitación, y luego se lavaron tres veces con PBT (PBS y 0.3% de Tween). Se incubaron entonces entre dos o tres minutos con proteinasa K (para permitir que penetre más fácilmente la sonda). Se detuvo la reacción lavando dos o tres veces con PBT. Se volvieron a fijar con solución de fijación por 25 minutos con agitación. Se lavaron entonces tres veces por 2 minutos con PBT fresco.

HIBRIDACIÓN Y MARCAJE

Para determinar el patrón de expresión del mensajero de *prg*, se hibridaron los embriones con una sonda generada a partir del cDNA de este gen. Los embriones previamente fijados se agitaron 10 minutos en solución de hibridación y PBT 1:1 (la solución de hibridación contiene: formamida al 50%, SSC 5X, esperma de salmón sonicado, y 0.1% de Tween 20). Se pre-hibridaron por una hora en solución de hibridación a 55°C . Se desnaturalizó la sonda de RNA antisentido con digoxigenina acoplada (Dig RNA labeling kit SP6/T7 de Roche) en solución de hibridación por 5 a 10 minutos a 80°C y se puso la sonda inmediatamente en hielo. Se removió la solución de prehibridación y se adicionó la sonda desnaturalizada en solución de hibridación. Se hibridó toda la noche a 55°C . Al día siguiente se diluyó el anticuerpo anti-digoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina (AP) (Roche) 1:200 en PBT y se incubó el anticuerpo con rotación a temperatura ambiente con embriones fijados para preabsorber el anticuerpo.

Se removió la solución de hibridación de los embriones incubados con la sonda (se puede reusar). Después se lavaron dos veces con solución de hibridación fresca, una vez con 1 ml de solución de hibridación / PBT 4:1, otra con solución de hibridación / PBT 3:2, una más con solución de hibridación / PBT 2:3, una vez con solución de hibridación / PBT 1:4 y finalmente dos más con PBT (todos estos lavados fueron por 15 minutos cada uno a 60°C).

Se incubaron los embriones por una hora con 45 minutos con el anticuerpo pre-absorbido en dilución 1:2000 en PBT (esta parte y todo lo siguiente a temperatura ambiente). Se lavaron tres o cuatro veces por 15 minutos cada vez en PBT fresco. Se lavaron dos veces por 5 minutos cada vez en solución de revelado recién hecha (NaCl 100mM, MgCl₂ 50 mM, TRIS-HCl 100 mM pH 9.5). Se removió la solución de los lavados y se adicionó solución de revelado con el sustrato NBT-BCIP (al 2%) y se incubó en la oscuridad. Se monitoreó la reacción, se detuvo lavando con PBT y se montaron los embriones.

Los embriones de las laminillas se observaron y se fotografiaron en un microscopio óptico (Eclipse E600 de Nikon) con una cámara digital (CoolSNAPcf de Roper Scientific Photometrics).

INMUNOHISTOQUÍMICA

Se recurrió a esta técnica para determinar el patrón de expresión normal (silvestre) de la proteína Prg durante el desarrollo embrionario ya que contamos con un antisuero generado a partir de una proteína recombinante producida con el mismo cDNA, para los primeros 400 aa de la proteína (Sergio Romero *et al.*, datos no publicados del laboratorio).

FIJACIÓN DE EMBRIONES

Se colectaron los embriones, se decorionaron, se fijaron (los embriones en metanol se pueden guardar a -20° C) y se rehidrataron como se describió para las técnicas de hibridación *in situ* (pero se fijaron con una solución 1:1 de formaldehído al 37% con heptano y solo durante 5 min.).

BLOQUEO Y MARCAJE

Para evitar la unión inespecífica de algunas proteínas presentes en el tejido de los embriones con el anticuerpo, se bloquearon estos con una solución de PBST y suero bovino fetal al 25%, agitando suavemente por rotación durante 1 hr a temperatura ambiente, después de lavarlos dos veces con PBST, luego de haberlos fijado y rehidratado.

Se extrajo el sobrenadante y usando una pipeta automática con una punta que tenía el extremo distal cortado (para no dañar los embriones) se transfirieron los embriones a tres viales de 0.5 ml, cada uno marcado respectivamente como control (C), primario (1^o) y secundario (2^o). Se adicionó una mezcla de incubación (500 μ l de PBST y suero bovino fetal al 5%) con el anticuerpo correspondiente: al tubo marcado como C no se agregó anticuerpo, al tubo marcado como 1^o se le agregó el anticuerpo anti-Prg, y al tubo marcado como 2^o se le agregó el conjugado anti-rata acoplado a la enzima fosfatasa alcalina (Santa Cruz Biotechnology), para preabsorber este segundo anticuerpo y evitar marcaje inespecífico (las diluciones de los anticuerpos en los tubos son las siguientes: 1^o 1:100 y 2^o 1:500). Los tubos se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hr agitando por rotación, o alternativamente, toda la noche a 4^o C.

Los tubos C y 1^o se lavaron con la solución de incubación 4 veces con rotación durante 5 minutos cada vez a temperatura ambiente. Después se adicionaron 250 μ l de solución de incubación y 250 μ l del sobrenadante del tubo 2^o (que contiene el anticuerpo 2^o pre-absorbido 1:500 para llegar a una concentración final de 1:1000). Se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora agitando por rotación. Después se lavaron con la solución de incubación 4 veces (con rotación) durante 5 minutos cada vez a temperatura ambiente.

Se efectuó entonces un lavado con buffer de revelado por 5 minutos que contiene NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM y Tris-HCl pH 9.5 100 mM.

Se eliminó esta solución y se añadieron 500 μ l del mismo buffer de revelado con substrato NBT-BCIP (Roche) al 2% y se incubaron a temperatura ambiente en la oscuridad. En este paso la enzima acoplada al segundo anticuerpo, que se ha unido al anticuerpo anti-Prg y este a su vez a la proteína Prg, degradará el

sustrato, dando un producto de color azul, que reportará la presencia y el sitio en donde se encuentra esta proteína.

Se monitoreó la reacción bajo el microscopio y se detuvo eliminando la solución de revelado y lavando con PBS. Se montaron entonces los embriones en laminillas, eliminando el exceso de agua secando parcialmente con papel absorbente, para después agregar medio de montaje (PolyMount) y cubrir con un cubreobjetos. Los embriones de las laminillas se observaron y se fotografiaron en un microscopio óptico (Eclipse E600 de Nikon) con una cámara digital (CoolSNAPcf de Roper Scientific Photometrics).

Para la técnica con anticuerpos fluorescentes, después del último lavado de los anticuerpos secundarios, se montaron con un medio de montaje especial para fluorescencia (VECTASHIELD) y se obtuvieron las imágenes en un microscopio confocal (Zeiss). Las incubaciones con el anticuerpo secundario se hicieron en la oscuridad (cubriendo los tubos con papel aluminio). El anticuerpo secundario (anti-rata) que se utilizó, está acoplado a Alexafluor 546 (Molecular Probes de Invitrogen Detection Technologies).

TÉCNICAS GENÉTICAS

ANÁLISIS DE COMPLEMENTACIÓN DE LOS ALELOS DE *prg*

Las cruzas que se realizaron para el análisis de complementación de los alelos de *prg* que denominamos como fuertes, de las cruzas de los alelos de *prg* que denominamos como débiles y de las cruzas de ambos alelos se muestran en la siguiente tabla (Tabla 1, en los apartados de: alelos fuertes, alelos débiles, y alelos fuertes y débiles respectivamente).

MATRIZ DE COMPLEMENTACIÓN				
alelos fuertes				
	<i>prg⁸/CyO</i>	<i>prg¹⁰/CyO</i>	<i>prg³¹/CyO</i>	<i>prg³²/CyO</i>
<i>prg⁸/CyO</i>		X	X	X
<i>prg¹⁰/CyO</i>			X	X
<i>prg³¹/CyO</i>			X	X
<i>prg³²/CyO</i>				
alelos debiles				
	<i>prg¹⁴/CyO</i>	<i>prg²⁵/CyO</i>		<i>prg²⁸/CyO</i>
<i>prg¹⁴/CyO</i>		X		X
<i>prg²⁵/CyO</i>				X
<i>prg²⁸/CyO</i>				
alelos fuertes y debiles				
	<i>prg⁸/CyO</i>	<i>prg¹⁰/CyO</i>	<i>prg³¹/CyO</i>	<i>prg³²/CyO</i>
<i>prg¹⁴/CyO</i>	X	X	X	X
<i>prg²⁵/CyO</i>	X	X	X	X
<i>prg²⁸/CyO</i>	X	X	X	X

Tabla 1. Cruzas realizadas para el análisis de complementación de los distintos alelos de *prg*. X= cruza en esta y en las siguientes tablas.

CRUZAS PARA EL ANÁLISIS DE INTERACCIÓN GÉNICA

Para estudiar las interacciones genéticas con los genes involucrados en la vía de JNK, se realizaron algunas cruza de los stocks balanceados de dos de los

alelos fuertes de *prg* (prg^{10} y prg^{32}) con líneas mutantes de *Djun* ($Djun^{IA109}$) y *Dfos* (kay^1).

prg y *Djun*

En la primera cruce se tomaron hembras de la línea de *prg* balanceada con *CyO*, el cual es un balanceador del cromosoma 2 (prg^{10}/CyO o prg^{32}/CyO), y machos de la línea *Djun* también balanceada ($Djun^{IA109}/CyO$) o viceversa, y se eligieron las hembras vírgenes doble heterocigotas para estos genes (aquellas que habían perdido el balanceador: $Djun^{IA109}/prg^{10}$ o $Djun^{IA109}/prg^{32}$). En la segunda cruce se tomaron estas hembras vírgenes de la primera cruce (solo las hembras sufren recombinación en *Drosophila*) con machos balanceados para el 2º cromosoma y que además contenían un gen marcador dominante en el otro cromosoma 2, como *Gla* que produce un fenotipo observable en el ojo (Gla/CyO). De esta segunda cruce se seleccionaron aquellas moscas que contenían un cromosoma balanceador ($Djun^{IA109}/CyO$, prg^{10}/CyO ó prg^{32}/CyO , recombinantes $Djun^{IA109},prg^{10}/CyO$ o $Djun^{IA109},prg^{32}/CyO$ y recombinantes +,+/*CyO*), de las cuales no se conocía el genotipo y se cruzó a cada mosca en un tubo nuevamente con líneas *Gla/CyO* para generar nuevos stocks. Una vez generadas estas líneas con genotipo desconocido se cruzaron entre si sólo aquellas que contenían un cromosoma balanceador, para generar ahora si líneas balanceadas para los genotipos desconocidos. Estas se probaron con las líneas balanceadas de los genes *Djun* ($Djun^{IA109}/CyO$) y *prg* (prg^{10}/CyO o prg^{32}/CyO). Aquellas líneas de moscas que fueron letales en las cruces para los dos genes, son las líneas que contienen los dos genes mutados (*prg* y *Djun*) en un mismo cromosoma recombinando.

Una vez que se generaron, las líneas con el cromosoma recombinado se cruzaron para generar embriones homocigotos mutantes para un gen y heterocigotas para el otro ($Djun,prg/prg$ o $Djun,prg/Djun$), además de coleccionar embriones dobles homocigotos mutantes ($Djun,prg/Djun,prg$). A partir de estas cruces se hicieron puestas y se prepararon cutículas de los embriones muertos para observar los fenotipos letales resultantes (Tabla 2).

<i>prg</i> Y <i>Djun</i>		
<i>prg</i> ¹⁰ / <i>CyO</i> ó <i>prg</i> ³² / <i>CyO</i>	X	<i>Djun</i> ^{IA109} / <i>CyO</i>
♀ <i>Djun</i> ^{IA109} / <i>prg</i> ¹⁰ ó <i>Djun</i> ^{IA109} / <i>prg</i> ³²	X	♂ <i>Gla</i> / <i>CyO</i>
<i>Djun</i> ^{IA109} / <i>CyO</i> <i>prg</i> ¹⁰ / <i>CyO</i> ó <i>prg</i> ³² / <i>CyO</i> <i>Djun</i> ^{IA109} , <i>prg</i> ¹⁰ / <i>CyO</i> ó <i>Djun</i> ^{IA109} , <i>prg</i> ³² / <i>CyO</i> (recombinantes) +,+/ <i>CyO</i> (recombinantes)	X	<i>Gla</i> / <i>CyO</i>
Probar el genotipo para cada línea		
<i>Djun</i> ^{IA109} / <i>CyO</i> <i>prg</i> ¹⁰ / <i>CyO</i> ó <i>prg</i> ³² / <i>CyO</i> <i>Djun</i> ^{IA109} , <i>prg</i> ¹⁰ / <i>CyO</i> ó <i>Djun</i> ^{IA109} , <i>prg</i> ³² / <i>CyO</i> (recombinantes) +,+/ <i>CyO</i> (recombinantes)	X	<i>prg</i> ¹⁰ / <i>CyO</i> ó <i>prg</i> ³² / <i>CyO</i> y <i>Djun</i> ^{IA109} / <i>CyO</i>
Observar el fenotipo de la descendencia de las cruzas		

Tabla 2. Cruzas realizadas para la obtención de organismos dobles heterocigotos de *prg* (*prg*¹⁰ y *prg*³²) y *Djun* (*Djun*^{IA109}) en el mismo cromosoma (recombinantes).

prg y *Dfos*

En la primera cruce se tomaron moscas de la línea *prg* balanceadas (*prg*¹⁰ o *prg*³²/*CyO*) y moscas de la línea *Dfos* balanceadas (*kay*¹/*TM3*) y se cruzaron cada una con una línea doble balanceada para los cromosomas 2 y 3, con un gen marcador dominante diferente en los balanceadores para cada cruce [(*prg*¹⁰/*CyO*;+/+ o *prg*³²/*CyO*;+/+ X *Sp/SM6B;Ki/TM3*) y (+/+;*kay*¹/*TM3* X *Sp/CyO;MKRS/TM6B*)]. *CyO* y *SM6B* son cromosomas balanceadores del cromosoma 2, *TM3*, *MKRS* y *TM6B* son cromosomas balanceadores del cromosoma 3, *Sp* es un gen que produce un fenotipo de quetas ectopicas en el torax, *Ki* produce un fenotipo de quetas dobladas en la punta. Se eligieron individuos heterocigotos para *prg* y *Dfos*, esto es, aquellos que tenían los dos balanceadores de las líneas doble balanceadas y no de las líneas balanceadas de cada gen (*prg*¹⁰ o *prg*³²/*SM6B*;+/ *TM3* y +/*CyO*;*kay*¹/*TM6B*). Para la segunda cruce se utilizaron estas moscas heterocigotas de *prg* y *Dfos*, y se cruzaron entre si (*prg*¹⁰ o *prg*³²/*SM6B*;+/ *TM3* X +/*CyO*;*kay*¹/*TM6B*). De esta segunda cruce se seleccionaron aquellas moscas que contenían los alelos mutantes para *prg* y *Dfos* con cromosomas balanceadores (*prg*¹⁰ o *prg*³²/*CyO*;*kay*¹/*TM3*) y se cruzaron nuevamente con líneas doble balanceadas que contenían el cromosoma doble balanceador *CyO*∧*TM9* [el símbolo ∧ significa que tienen: el balanceador del cromosoma 2 (*CyO*) y el balanceador del cromosoma 3 unidos (*TM9*)] (*prg*¹⁰ o *prg*³²/*CyO*;*kay*¹/*TM3* X +/*CyO*∧*TM9*/+) y se eligen aquellas que han perdido los cromosomas balanceados pero que tengan el cromosoma doble balanceador (*prg*¹⁰ o *prg*³²/*CyO*∧*TM9*/*kay*¹).

Una vez generado este stock se probaron con las distintas líneas mutantes para generar homocigotas mutantes para un gen y heterocigotas para el otro (*prg/prg*;+/ *Dfos* o *prg*/+;*Dfos/Dfos*), además de embriones dobles homocigotos mutantes (*prg/prg*;*Dfos/Dfos*); a partir de estas cruces se hicieron puestas y se prepararon cutículas de los embriones muertos para observar el fenotipo letal (Tabla 3).

<i>prg</i> Y <i>Dfos</i>		
<i>prg</i> ¹⁰ / <i>CyO</i> ;+/+ ó <i>prg</i> ³² / <i>CyO</i> ;+/+	X	<i>Sp/SM6B;Kil/TM3</i>
+/+; <i>kay</i> ¹ / <i>TM3</i>	X	<i>Sp/CyO;MKRS/TM6B</i>
<i>prg</i> ¹⁰ / <i>SM6B</i> ;+/ <i>TM3</i> ó <i>prg</i> ³² / <i>SM6B</i> ;+/ <i>TM3</i>	X	+/ <i>CyO</i> ; <i>kay</i> ¹ / <i>TM6B</i>
<i>prg</i> ¹⁰ / <i>CyO</i> ; <i>kay</i> ¹ / <i>TM3</i> ó <i>prg</i> ³² / <i>CyO</i> ; <i>kay</i> ¹ / <i>TM3</i>	X	+/ <i>CyO</i> ^Δ <i>TM9</i> /+
Probar el genotipo para cada línea		
<i>prg</i> ¹⁰ / <i>CyO</i> ;+/+ ó <i>prg</i> ³² / <i>CyO</i> ;+/+ +/+; <i>kay</i> ¹ / <i>TM3</i>	X	<i>prg</i> ¹⁰ / <i>CyO</i> ^Δ <i>TM9</i> / <i>kay</i> ¹ ó <i>prg</i> ³² / <i>CyO</i> ^Δ <i>TM9</i> / <i>kay</i> ¹
Observar el fenotipo de la descendencia de las cruzas		

Tabla 3. Cruzas realizadas para la obtención de organismos dobles heterocigotos de *prg* (*prg*¹⁰ y *prg*³²) y *Dfos* (*kay*¹).

RESULTADOS

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS DIFERENTES ALELOS DEL GEN

prg

Para estudiar la función de *prg* en el desarrollo era importante conocer que tipo de alelos se habían generado (el nivel de función que tienen). Un primer análisis que hicimos de los alelos de *prg* fue observar a los organismos adultos de estas líneas balanceadas (organismos heterocigotos; *prg/CyO*).

Las líneas derivadas de la inserción original del elemento P (8 líneas generadas a partir de la escisión del elemento P) y que involucran al gen *prg*, se distribuyen en tres grupos. De acuerdo a este nivel de análisis, la mitad de estas líneas son alelos 100% letales (alelos fuertes) del gen *prg*: *prg*⁸, *prg*¹⁰, *prg*³¹, *prg*³²; tres de las otras líneas son alelos semiletal (alelos débiles): *prg*¹⁴, *prg*²⁵, *prg*²⁸ y finalmente *prg*¹⁹ es una línea con una escisión precisa, es decir, no tiene ningún fenotipo mutante y de ahora en adelante será referido como *prg*⁺.

Los alelos del primer grupo se describen como 100 % letales ó alelos fuertes, ya que los organismos homocigotos para estos alelos mutantes no sobreviven hasta la etapa adulta y en los stocks encontramos solo organismos heterocigotos adultos (organismos homocigotos del cromosoma balanceador se mueren como larvas).

En cambio en el segundo grupo (*prg*¹⁴, *prg*²⁵ y *prg*²⁸) existe un porcentaje de organismos homocigotos adultos para estos alelos; esto nos dice que son alelos débiles y que puede haber homocigotos mutantes viables cuando menos en un porcentaje reducido. Estos organismos homocigotos mutantes que aparecen con una frecuencia menor a la esperada del alelo silvestre se denominan *escapadores* (*escapers*). El porcentaje de *escapadores* para cada alelo fue: 26% de organismos homocigotos mutantes vivos de *prg* en *prg*¹⁴, 27% en *prg*²⁵ y 25% en *prg*²⁸ (se esperaba un 33% de organismos homocigotos mutantes de *prg* de la cruce de organismos heterocigotos mutantes, ya que los organismos homocigotos del cromosoma balanceador se mueren).

La presencia del 100% de organismos adultos homocigotos esperados para prg^+ nos habla de cómo este alelo actúa de una manera similar a un alelo silvestre. Además, en la línea de prg^+ se ha perdido incluso el cromosoma balanceador, ya que el cromosoma que contiene al alelo prg^+ se ve favorecido por selección, cuando compite con el cromosoma balanceador que es homocigoto letal.

También analizamos la cantidad de embriones que no terminan su desarrollo en los distintos alelos de prg y encontramos que aproximadamente el 23% de los organismos silvestres (prg^+) no terminan la etapa de desarrollo embrionario de manera satisfactoria (temperatura = 25° C, humedad = 50%). En los alelos mutantes de prg está aumentado el porcentaje de embriones que no terminan de desarrollarse, tal y como era de esperarse (Figura 7 y Anexo A, Tabla A1).

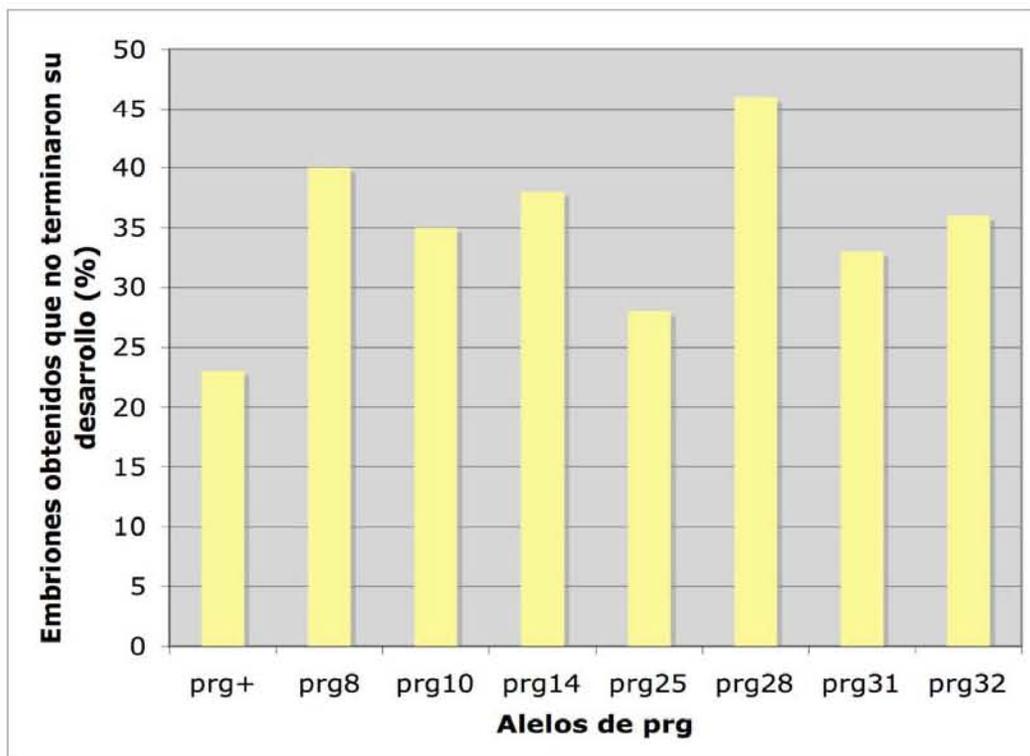


Figura 7.- Embriones de los alelos de prg que no terminan su desarrollo. El porcentaje de embriones que no terminan su desarrollo es mayor en los alelos mutantes de prg ($prg8$, $prg10$, $prg14$, $prg25$, $prg28$, $prg31$, $prg32$), en comparación con prg^+ (prg^+).

Los embriones que no completan su desarrollo lo hacen por diversas causas; esto incluye huevos que son depositados aunque no estén fertilizados. Analizamos que cantidad de embriones presentan el fenotipo de apertura dorsal (AD) de aquellos embriones que no completan su desarrollo y encontramos que todos los alelos mutantes de *prg* presentan embriones muertos con ese fenotipo. Dos de los alelos fuertes (*prg*⁸ y *prg*¹⁰) presentan el mayor porcentaje de embriones con fenotipo de apertura dorsal (Figura 8 y Anexo A, Tabla A1).

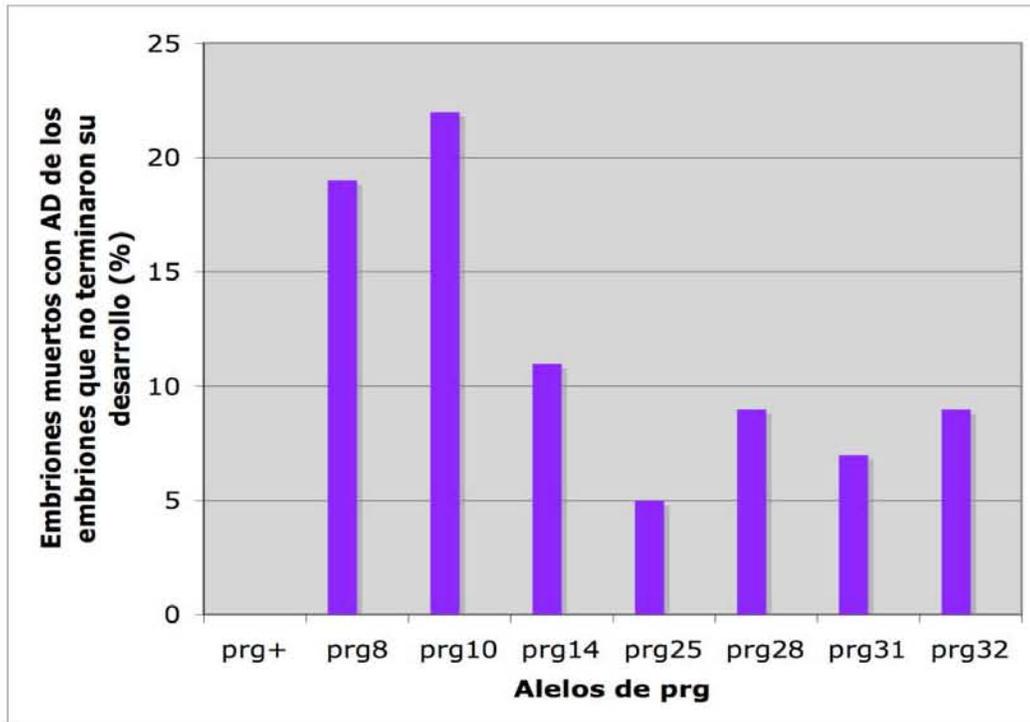


Figura 8.- Embriones de los alelos de *prg* con apertura dorsal. El porcentaje de embriones que mueren con apertura dorsal (AD) de aquellos que no terminan su desarrollo está aumentado en dos de los alelos mutantes fuertes de *prg* (*prg*⁸ y *prg*¹⁰).

ANÁLISIS DE CUTÍCULAS.-

Para seguir con la caracterización fenotípica de los alelos de *prg* nos dimos a la tarea de analizar el grado de apertura dorsal de los embriones muertos a través de la observación de las cutículas de estos alelos. En las cutículas de embriones de los diferentes alelos de *prg*, se puede observar gran heterogeneidad en cuanto al grado de apertura en la parte dorsal del embrión. La apertura dorsal se debe a una deficiencia en el cerrado dorsal ocasionada por los alelos mutantes. A pesar de que el grado de apertura es variable aún en cutículas comparadas de una misma línea, hay un tamaño y una posición de la apertura que es más frecuente en cada alelo (Figura 9).

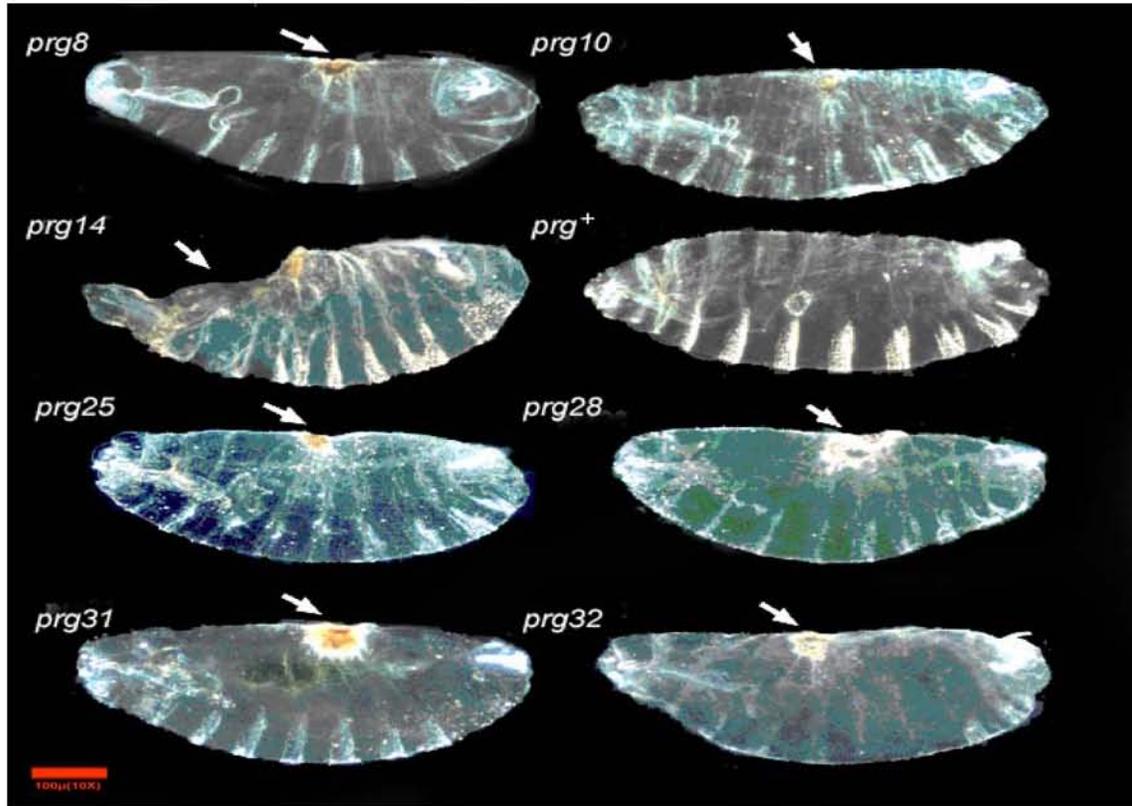


Figura 9.- Cutículas de embriones con los diferentes alelos mutantes del gen *prg*. Todos los embriones están colocados con la parte anterior hacia la izquierda y la parte dorsal hacia arriba; la flecha señala la apertura en la parte dorsal del embrión (el tamaño de la herida está demarcado por los bordes necróticos de colores rojo y amarillo). Las cutículas de los embriones del alelo *prg*⁺ no presentan el fenotipo de apertura dorsal. La barra de calibración en rojo mide 100μm para esta y todas las demás figuras.

En *prg*⁸ la apertura más común se extiende desde el segmento 4 hasta el segmento 7 (utilizando como referencia la posición de los dentículos y contando desde la parte posterior). Esto sitúa al orificio en una posición prácticamente central y afecta de dos a cuatro segmentos (Anexo A, Tabla A.1). Para el caso de *prg*¹⁰ el grado de apertura es menos severo, es decir; solo de uno a dos segmentos, aunque con una posición igualmente central (Anexo A, Tabla A.2). Lo mismo ocurre en los alelos *prg*³¹ donde se ven afectados de uno a tres segmentos (Anexo A, Tabla A.6) y *prg*³², afectando de uno a dos segmentos (Anexo A, Tabla A.7).

Para los alelos débiles la posición de la apertura es mas bien anterior; *prg*¹⁴ afecta principalmente tres segmentos (Anexo A, Tabla A.3) y *prg*²⁸ presenta el fenotipo más severo, con un grado de apertura que abarca de cinco a ocho segmentos (Anexo A, Tabla A.5).

PRUEBAS DE COMPLEMENTACIÓN.-

Para saber si las líneas que se generaron eran alelos del mismo gen, recurrimos al análisis genético de complementación. Los resultados de las pruebas de complementación, demuestran que en la descendencia de las cruzas *inter se*, entre los alelos 100% letales del gen *prg* (*prg*⁸, *prg*¹⁰, *prg*³¹ y *prg*³²) todas las moscas viables son organismos heterocigotos con un cromosoma balanceador y un cromosoma con una mutación en *prg* (Tabla 4). Este resultado (100% de la progenie son organismos heterocigotos), demuestra que los alelos 100% letales no complementan entre sí, y por lo tanto son alelos del mismo gen. Es decir, ninguna mosca sobrevive en una combinación heteroalélica de los alelos mutantes fuertes de *prg* (cuando se encuentran en el mismo organismo dos alelos mutantes fuertes de *prg*).

MATRIZ DE COMPLEMENTACIÓN (alelos fuertes)				
	<i>prg</i> ⁸	<i>prg</i> ¹⁰	<i>prg</i> ³¹	<i>prg</i> ³²
<i>prg</i> ⁸		0%	0%	0%
<i>prg</i> ¹⁰			0%	0%
<i>prg</i> ³¹				0%
<i>prg</i> ³²				

Tabla 4.- Matriz de complementación. Se encontró una **no complementación** (0% de complementación) entre los alelos fuertes del gen *prg*. El porcentaje mostrado para cada combinación heteroalélica de la matriz demuestra que ninguna mosca sobrevive hasta la etapa adulta, cuando tiene dos alelos mutantes fuertes de *prg* en su genoma.

Fue difícil hacer pruebas de complementación con los alelos débiles, ya que normalmente una condición importante es que sean alelos recesivos letales, y estos alelos de *prg* son parcialmente viables. Se efectuaron de cualquier forma las interacciones de los alelos débiles con los alelos fuertes. Se observó un incremento en el porcentaje de letalidad en *prg*²⁵ cuando se combinó con *prg*³¹ (reducción de un 27% a un 17% de *escapadores*), también en el alelo *prg*²⁸ cuando se combinó con *prg*⁸, *prg*³¹ y *prg*³² (reducción de un 25% a un 18%, 23% y 19% de *escapadores* para las respectivas combinaciones), mientras que las demás combinaciones alélicas permanecieron igual.

Con todos estos resultados se estableció una serie alélica. Organizada desde el alelo más hipomorfo hasta el alelo menos hipomorfo, la serie alélica se distribuye de la siguiente forma: *prg*⁸ > *prg*¹⁰ > *prg*³² > *prg*³¹ > *prg*²⁸ > *prg*¹⁴ > *prg*²⁵.

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS DIFERENTES ALELOS DEL GEN *prg*.

SOUTHERN-BLOT.-

Para determinar la lesión molecular de los diferentes alelos de *prg*, se realizó un Southern-blot con DNA genómico de organismos heterocigotos adultos de las líneas mutantes y usando como sonda el cDNA completo de *prg*. El DNA obtenido de cada línea se digirió con EcoRI ó con MspI. Las copias silvestres y mutantes del gen, presentes en los heterocigotos son reconocidos por la sonda en todas las líneas –a excepción de *prg*²⁸–. El DNA digerido con EcoRI que hibrida con la sonda tiene un tamaño de 3800 pares de bases (ó bp del inglés *basepairs*). El alelo *prg*²⁸ presenta una banda más tenue, lo que indica que probablemente la banda que esta siendo reconocida es solo del cromosoma silvestre y por lo tanto, nos permite inferir que hay una alteración en el DNA del cromosoma mutante en un sitio de corte de la enzima EcoRI en *prg*²⁸ que evita que se observe esta banda intacta. Además hay pequeñas diferencias en la intensidad de esta misma banda entre las diferentes líneas, sugiriendo la existencia de posibles alteraciones en el genoma, apenas perceptibles por esta técnica. En el DNA genómico digerido con MspI de las diversas líneas, las copias del gen silvestre y mutante son detectadas por la sonda en una banda de aproximadamente 856 bp y no se muestran diferencias claras ni en el tamaño ni en la intensidad, lo que significa que las posibles alteraciones en la versión mutante de *prg* no parecen localizarse en este fragmento (Figura 10).

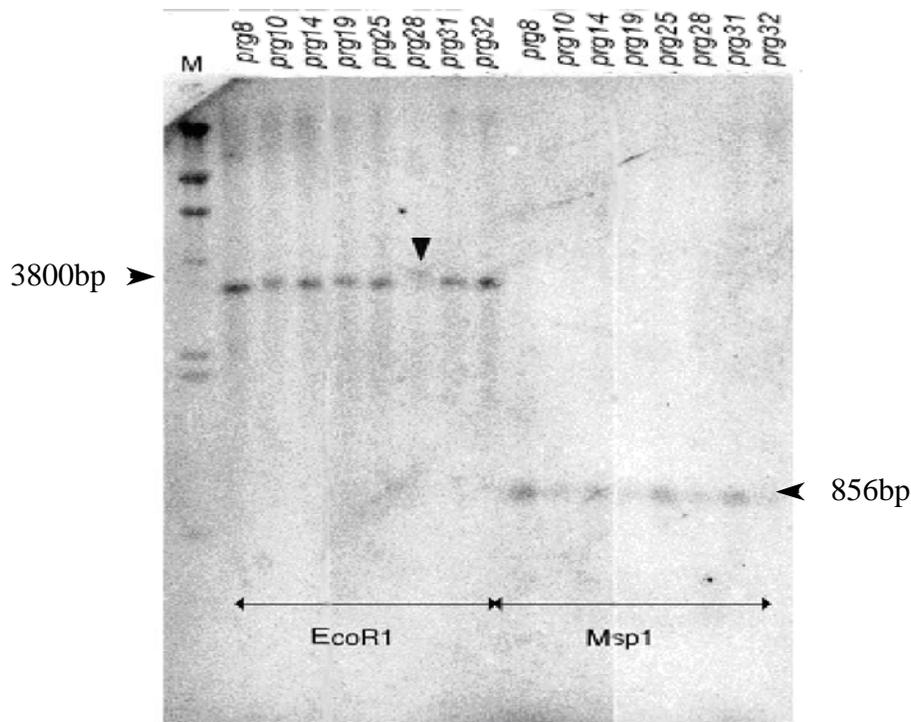


Figura 10.- Caracterización de la región genómica de *prg* en los diferentes alelos. Análisis por Southern-Blot de las líneas de los diferentes alelos del gen *prg*. La figura muestra la digitalización de una de las imágenes de la hibridación, misma que se realizó dos veces en dos experimentos independientes con resultados semejantes. Las manchas muestran la banda que reconoce la sonda en las diferentes líneas. La punta de flecha marca la banda que está alterada. La sonda usada es el cDNA que codifica para *prg*.

ANÁLISIS MOLECULAR.-

Para hacer una caracterización más detallada de la región genómica de *prg* que flanquea el lugar de la inserción del elemento P, en los diferentes alelos se amplificó por PCR esta zona del gen con los pares de oligos ar1-ar2 y ar4-ar3, utilizando como templado el DNA de embriones homocigotos mutantes.

La secuenciación de los productos amplificados no arrojó diferencias en la zona amplificada para los pares de oligos ar1 y ar2 en las líneas *prg*⁸, *prg*³¹ y *prg*⁺ (usados como controles), lo cual indica que en la zona amplificada no hay defecto, como cabría esperar, ya que esta zona intergénica está más cercana al gen de la aciltransferasa que al gen *prg* (Figura 6).

Además, tampoco se observa una alteración en el tamaño de las bandas obtenidas de la amplificación en donde se utilizó el par de oligos ar4 y ar3, para los diferentes alelos (Figura 11).

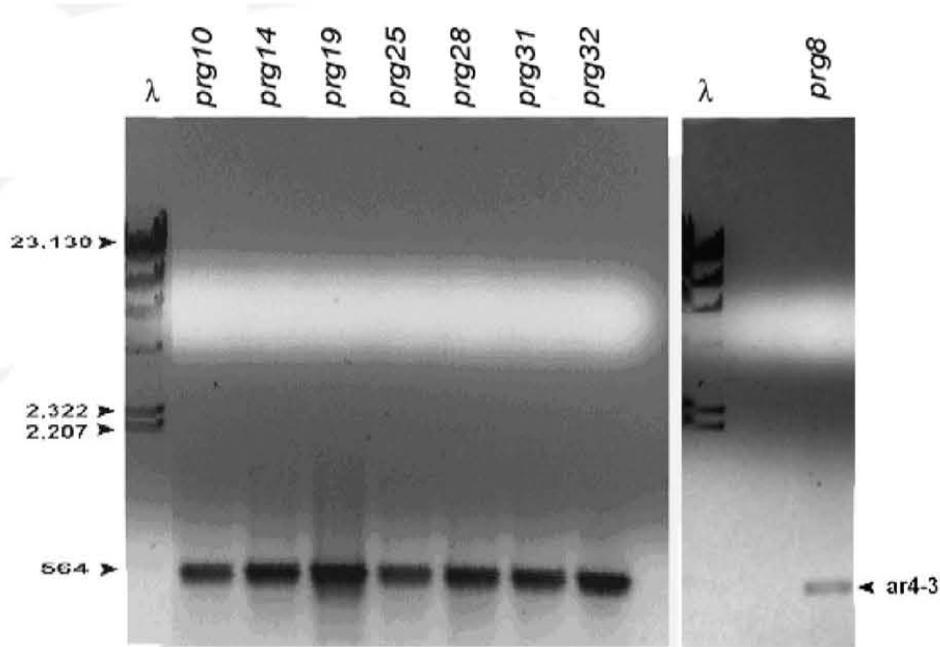


Figura 11.- PCR de los diferentes alelos de *prg* con ar4 y ar3. El análisis por PCR demuestra que los diferentes alelos tienen el tamaño esperado en la banda amplificada utilizando el par de oligos ar4 y ar3.

Sin embargo, la secuenciación de estos fragmentos amplificados de *prg*⁸ revelaron que existe una alteración molecular en la zona intergénica, precisamente entre el sitio de inserción del elemento P y el inicio de la transcripción de *prg*, en este alelo.

*prg*⁸ presenta una sustitución de una timina por una adenina a 235bp de distancia río arriba del sitio predicho de inicio de la transcripción del gen *prg*. (Figura 12).

*prg*⁸

```
          -734bp
ar4  gaat atacgcgcgt acgcacagat ttttaaacia tcatccgctt tcgccgaaaag
agtgccggca ctcgaaaaat acctccgctt taatcaagag tccgcgggca attgaaaaag
ctctcgcttc gcgtgttcac ggcggtgtacc tacataggta cgcacatcaatt aggtacctgc
cgcccactgc tttaatcgtat agtgcatttc tgatttaaaa gtgtgacacg agccttataa
gtcttataat ttatatttta tgcaaacagc tttacaaatt tttaatgtgt agaaagaaac
tgcgttttat tgaatttgag catcatcaaa cttcaacccc aaagaattac acataagtag
tttcgttttt gctaccaaag atgctgacgt ttattttgcg tattagata ggctttgtta
caattttagt aaaagtattt taaaatggaa aggtacaaat ctgaacttta ataaaacaca
aaattgttta atttaaaaac ttcaaatatt caaaaattcc tataattcaa ttaagtaacc
cactgtgcag cggct ar3
          -189bp
```

Figura 12.- Secuencia del fragmento amplificado con los oligos ar4 y ar3 del alelo *prg*⁸ comparada con la secuencia obtenida de la base de datos de *Drosophila*. Se encontró una sustitución de una T por una A (amarillo) a -235bp del sitio predicho de inicio de la transcripción del gen *prg*. En verde se marcan las dos pares de bases que flanquean el sitio de inserción del elemento P (-638bp) en la línea de donde derivan los alelos. Las letras azules señalan la secuencia de los oligos que se utilizaron, y los números al inicio y final de la secuencia, señalan las pares de bases que se encuentran río arriba del sitio predicho de inicio de la transcripción de *prg*.

Para las otras líneas mutantes no se encontró ninguna alteración en esta zona, lo cual implica que la alteración debería presentarse en una región mas cercana al sitio de inicio de la transcripción o dentro de la región codificante del gen *prg*, en zonas aún no analizadas.

EXPRESIÓN DEL RNA MENSAJERO DE *prg*.-

Para determinar la expresión del RNA mensajero (mRNA) de *prg* durante el desarrollo embrionario de organismos silvestres utilizamos la técnica de hibridación *in situ*. Mediante esta técnica encontramos que el mRNA de *prg* se expresa de manera muy dinámica durante la embriogénesis de *Drosophila* (Figura 13).

La expresión de *prg* comienza a revelarse en etapas muy tempranas, desde la etapa del blastodermo sincisial (Figura 13A), hasta la etapa del blastodermo celular, lo cual puede derivar de una posible contribución materna.

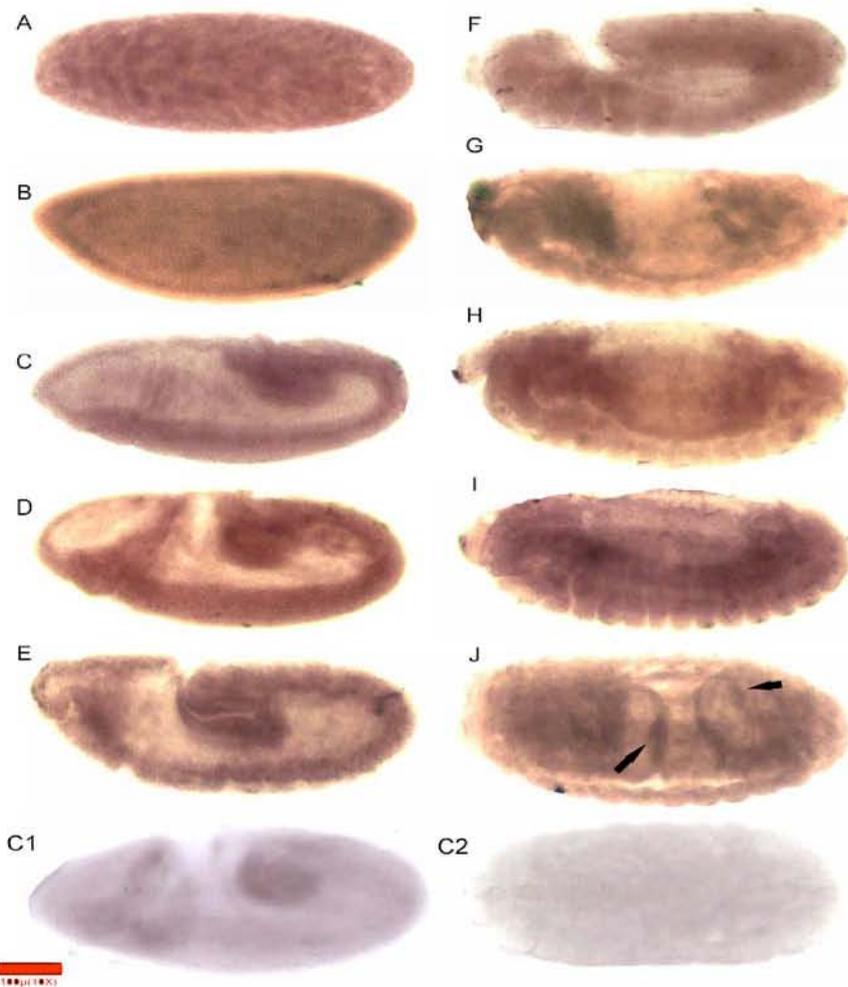


Figura 13.- Análisis del mRNA de *prg* en embriones de tipo silvestre por hibridación *in situ*. A juzgar por la presencia del transcrito, *prg* se expresa de manera generalizada durante etapas tempranas del desarrollo (A y B), también en la banda germinal (C, D y E) y en las células del epitelio lateral (F) en etapas intermedias. El nivel de expresión va en aumento hasta al inicio del cerrado dorsal (G) en donde se alcanza su mayor expresión (H y I). Por último los niveles de expresión disminuyen al final del desarrollo (J). Los embriones están orientados en una vista lateral con la parte anterior hacia la izquierda, a excepción de J que se muestra en una vista dorsal (las flechas señalan las constricciones del intestino medio). La sonda que se utilizó para el experimento fue el RNA antisentido del cDNA de *prg* marcado con digoxigenina y se utilizó un anticuerpo anti-Dig acoplado a fosfatasa alcalina (AP). C1 y C2 son embriones en los que se usó una sonda sentido como control negativo.

Después de la celularización del embrión, la distribución del mRNA es más homogénea aunque en menor cantidad (Figura 13B). Durante la etapa de gastrulación, en donde se forman las tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo), el mRNA se presenta en las células que conforman la banda germinal, la cual está compuesta por el mesodermo y el ectodermo (Figura 13C y D).

En la etapa siguiente, durante la extensión de la banda germinal, el mRNA se sigue expresando en la propia banda germinal (Figura 13E). Una vez que la banda germinal se ha extendido completamente y se inicia la segmentación del embrión, el mRNA ahora se presenta en las células epiteliales, más no así en las células de la amnioserosa (Figura 13F) y permanece así durante la retracción de la banda germinal (Figura 13G y H).

Al inicio del cerrado dorsal, el patrón de expresión del mensajero en las células epiteliales cambia nuevamente a un patrón de expresión segmentado y con una menor expresión en la fila de células intersegmentales. La mayor expresión del mensajero de este gen es al inicio de esta etapa (Figura 13I) y permanece así durante todo el cerrado dorsal, hasta que disminuye nuevamente al final de este proceso (Figura 13J). Por último, la expresión de *prg* sigue en decremento hasta el final de la embriogénesis en el epitelio lateral, sin embargo, se expresa también en las constricciones del intestino medio durante estas etapas (Figura 13J).

EXPRESIÓN DE Prg.-

Para analizar el patrón de expresión de la proteína codificada por *prg*, durante el desarrollo embrionario de tipo silvestre, se llevaron a cabo experimentos de inmunohistoquímica utilizando anticuerpos policlonales contra una proteína Prg recombinante.

Al igual que el patrón de expresión del mensajero, podemos observar que el patrón de expresión de la proteína codificada por el gen *prg* también es muy dinámico durante el desarrollo. Esta proteína está presente en todo el embrión

desde la etapa del blastodermo sincisial hasta la etapa del blastodermo celular (Figura 14A y 14B).

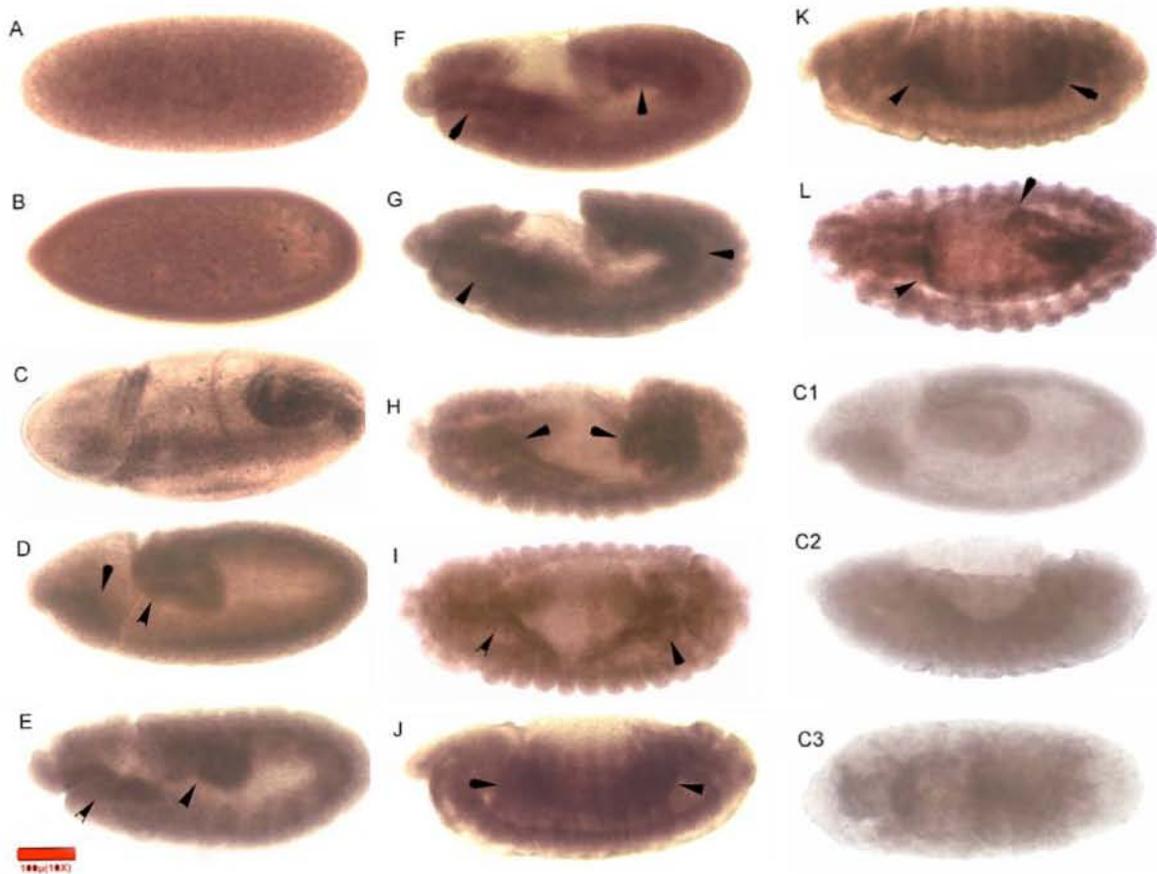


Figura 14.- Inmunohistoquímica que muestra la expresión de la proteína codificada por *prg* (Prg) en embriones de tipo silvestre en las diferentes etapas del desarrollo. A y B) Embriones en etapas tempranas del desarrollo (etapas 3 y 5). C) Embrión en la etapa de gastrulación. D) Extensión de la banda germinal. E-H) Retracción de la banda germinal. I) Inicio del cerrado dorsal. J) Cerrado dorsal. K-L) Fin del cerrado dorsal. Se utilizaron anticuerpos policlonales de rata contra una proteína Prg recombinante como anticuerpo primario y un anticuerpo secundario anti-rata acoplado a AP. C1-C3) Embriones silvestres a los que se les incubó solo con el segundo anticuerpo como control. Las puntas de flecha en negro señalan los tejidos que formarán el intestino medio durante las distintas etapas.

Después, durante la gastrulación, la distribución de la proteína ya no se observa de forma homogénea. En esta etapa Prg se localiza en las células que darán origen al mesodermo durante la invaginación del tubo ventral y en la parte posterior del embrión que migra en dirección dorsal acompañando a las células polares (Figura 14C), al igual que en el ectodermo, es decir, en los tejidos que conforman la banda germinal.

En etapas más tardías, durante la extensión de la banda germinal, la proteína se expresa precisamente en este tejido (Figura 14D). También se expresa en las células del endodermo que se invaginan en la parte cefálica para formar el componente anterior del intestino medio y células que se invaginan en la parte dorsal y que formarán la parte posterior del intestino medio (Figura 14E).

En el proceso siguiente a la extensión de la banda germinal, es decir, durante la retracción de la banda germinal, la proteína ahora se ve localizada en el epitelio que recubre al embrión en la parte externa y permanece de esta manera durante el proceso de cerrado dorsal, en contraste con las células de la amnioserosa que nunca presentan tinción (Figura 14F-H).

Una vez iniciado el cerrado dorsal aumenta la proteína, particularmente en las células epiteliales más dorsales (Figura 14I). En las células que conforman el epitelio lateral, Prg se observa en un patrón segmentado. Durante el cerrado dorsal, las células del epitelio lateral y las células epiteliales más ventrales tienen niveles altos de la proteína (Figura 14J). Este patrón permanece así casi hasta el final de este proceso (Figura 14K).

Al término del cerrado dorsal, comienza a disminuir la expresión y se observan nuevamente niveles muy bajos cuando el embrión se ha cerrado completamente (Figura 14L) casi al final de la embriogénesis .

Al final del desarrollo, al igual que el RNA mensajero, la proteína también se expresa en tejidos que derivan del endodermo, como son el intestino medio anterior y el intestino medio posterior (ver puntas de flecha en Figuras 14D- L).

Observando las preparaciones a mayor aumento, se pudo constatar como el patrón de tinción de la proteína cambia de ser un patrón de tipo circular durante la extensión (Figura 15A) y retracción de la banda germinal (Figura 15B), a un patrón punteado durante el cerrado dorsal (Figura 15C y D) en el epitelio lateral.

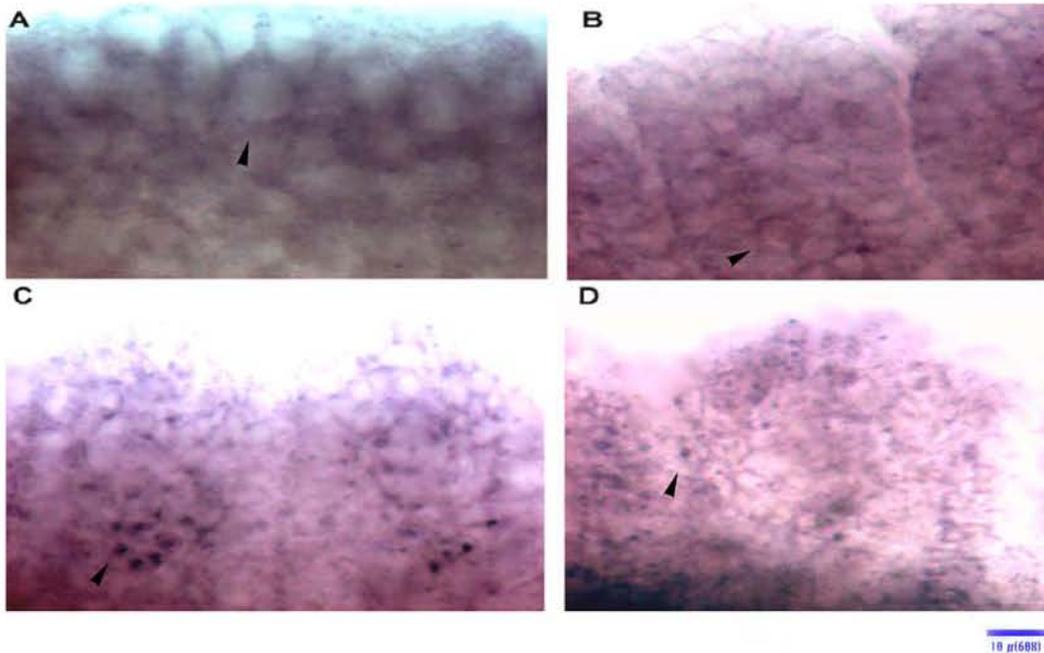


Figura 15.- Inmunohistoquímica de Prg en embriones silvestres durante etapas cercanas al cerrado dorsal y en el cerrado dorsal. El patrón de expresión de Prg en el epitelio lateral durante la extensión de la banda germinal (A) y la retracción de la banda germinal (B) es de forma circular, mientras que durante el cerrado dorsal (C) y al término del cerrado (D) el patrón se presenta de forma punteada (marcado para ambos casos con las puntas de flecha). Imágenes tomadas con objetivo 60x en el epitelio lateral. La barra de calibración en azul mide 10 μ m.

Analizando planos focales separados, utilizando la técnica de microscopía confocal, se pudo observar que la expresión de Prg se encuentra particularmente concentrada en el epitelio lateral durante el desarrollo (Figura 16). Al igual que las tinciones con fosfatasa alcalina, el patrón de tinción cambia de ser circular o en forma de halos durante la gastrulación, extensión y retracción de la banda germinal, a un patrón punteado durante el cerrado dorsal (Figura 16B).

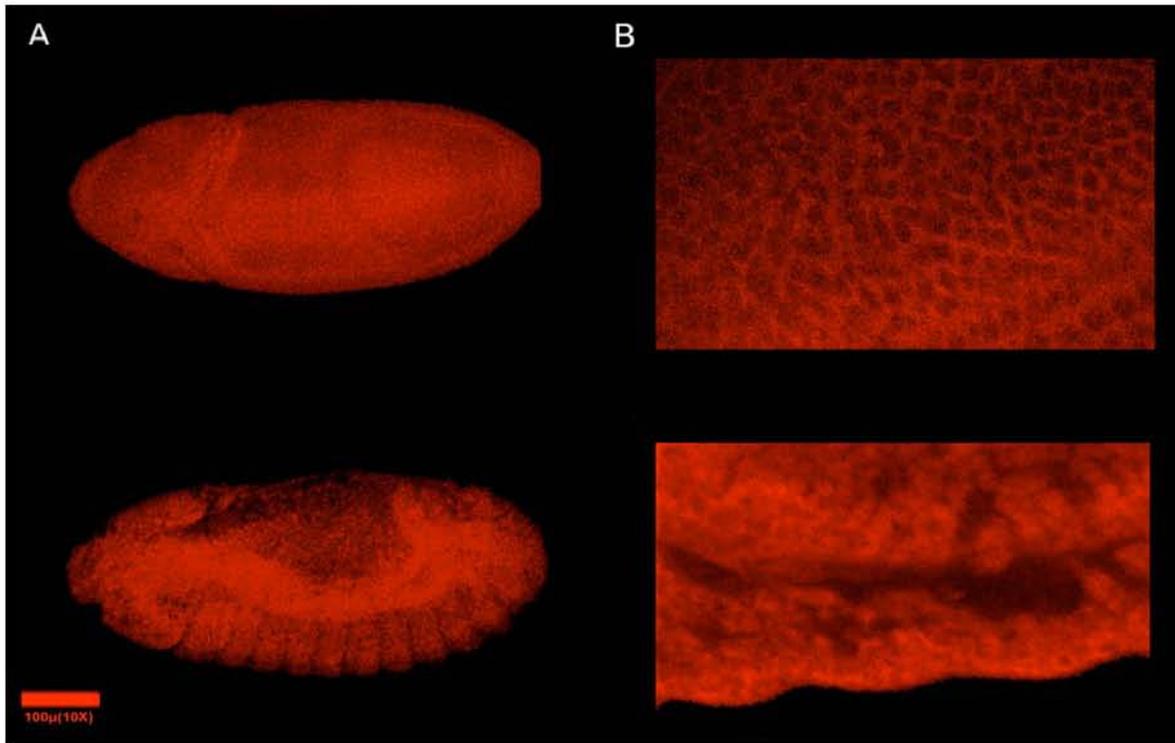


Figura16.- Inmunohistoquímica de Prg en embriones de tipo silvestre, analizados con microscopia confocal. A) Prg se encuentra principalmente en las células del epitelio lateral durante el desarrollo. B) El patrón de tinción de forma circular presente durante la gastrulación (arriba), cambia a un patrón de tinción de forma punteada para el cerrado dorsal (abajo). Imagen tomada con objetivo de 40x.

Se analizó el patrón de tinción de Prg en embriones de algunos alelos mutantes de *prg* (*prg*¹⁰, *prg*³¹ y *prg*³²), también por microscopía confocal. Para este análisis usamos un cromosoma balanceador del cromosoma 2, que expresa una proteína verde fluorescente (GFP) acoplada a actina como marcador (CyO-ActGFP). Con esta técnica pudimos diferenciar a los embriones homocigotos mutantes de *prg* (que no contienen el cromosoma balanceador y por lo tanto no expresan GFP) de embriones heterocigotos u homocigotos para el cromosoma balanceador (que si expresan GFP) (Figura 17).

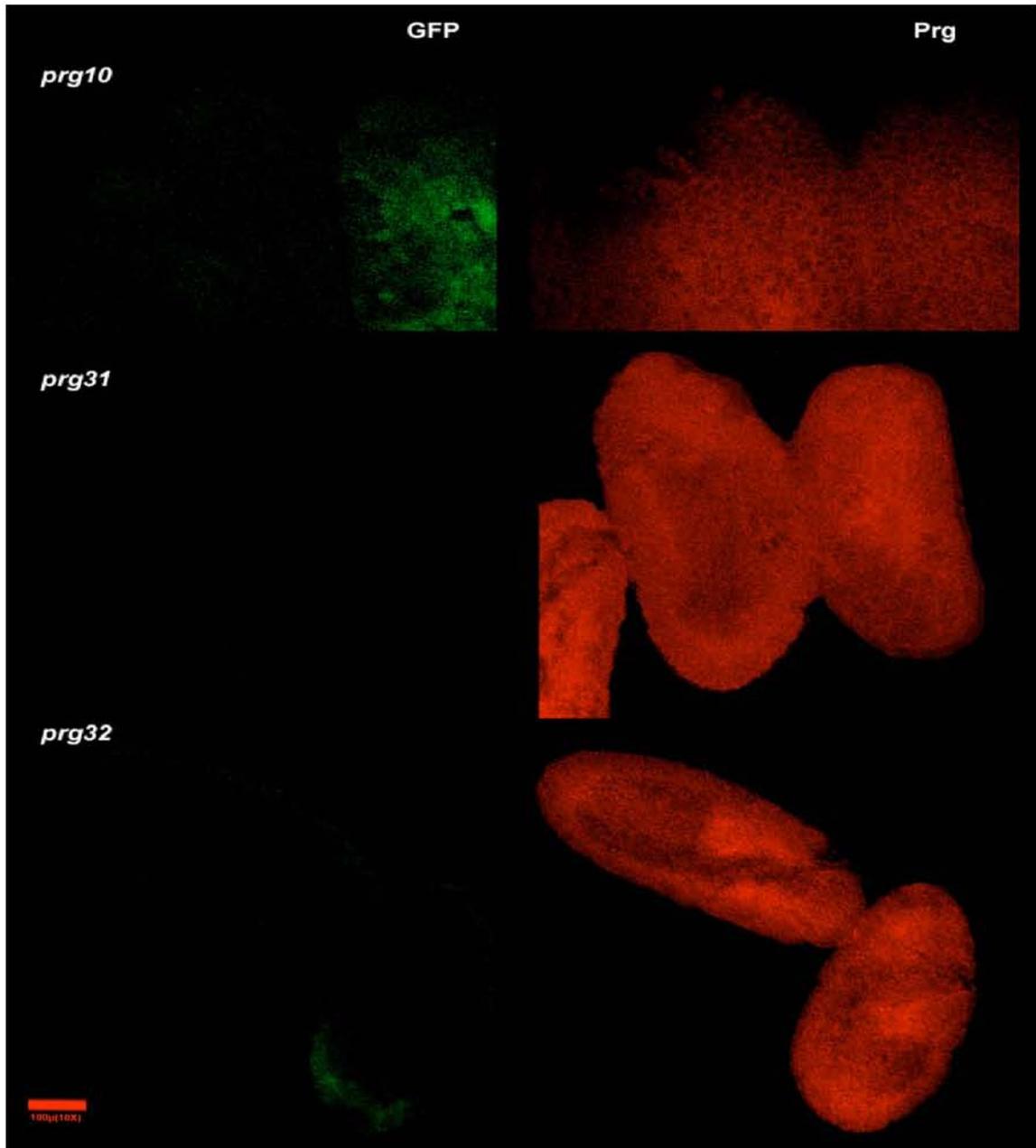


Figura17.- Inmunohistoquímica de Prg en embriones en etapa de retracción de la banda germinal de algunos alelos de *prg*. Los alelos *prg*¹⁰, *prg*³¹ y *prg*³² están balanceados con un cromosoma balanceador que expresa GFP acoplado a actina (*prg*¹⁰/*CyO*-ActGFP, *prg*³¹/*CyO*-ActGFP y *prg*³²/*CyO*-ActGFP). Los embriones heterocigotos mutantes de *prg* y homocigotos del cromosoma balanceador (que expresan GFP), así como los embriones homocigotos mutantes de *prg* (que no expresan GFP), fueron analizados con microscopía confocal. GFP fue analizado en el canal verde (columna izquierda) y Prg en el canal rojo (columna derecha).

Prg se encuentra en los embriones homocigotos mutantes principalmente en las células del epitelio lateral durante el desarrollo al igual que en los embriones de tipo silvestres. En las tinciones no alcanzamos a observar diferencias claras cuando comparamos embriones homocigotos mutantes de *prg* con embriones homocigotos o heterocigotos para el cromosoma balanceador en las etapas del desarrollo analizadas (Figura 17).

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE *prg*.

Para estudiar si *prg* interactuaba genéticamente con la vía de la JNK, utilizamos dos de sus alelos fuertes: *prg*¹⁰ y *prg*³². También se utilizaron *Djun*^{IA109} y *kay*¹ como alelos mutantes nulos de los genes *Djun* y *Dfos* respectivamente, los cuales codifican para las proteínas que conforman el factor de transcripción AP1 que participa en la vía de la JNK.

Los alelos fuertes de *prg* presentan un fenotipo de apertura dorsal menos severo que otros genes componentes de la vía de la JNK. Además estos embriones mutantes presentan un orificio principalmente en la parte central del lado dorsal del embrión a diferencia de los embriones mutantes de *Djun* y *Dfos* en donde también se afecta la parte anterior del embrión (Figura 18).

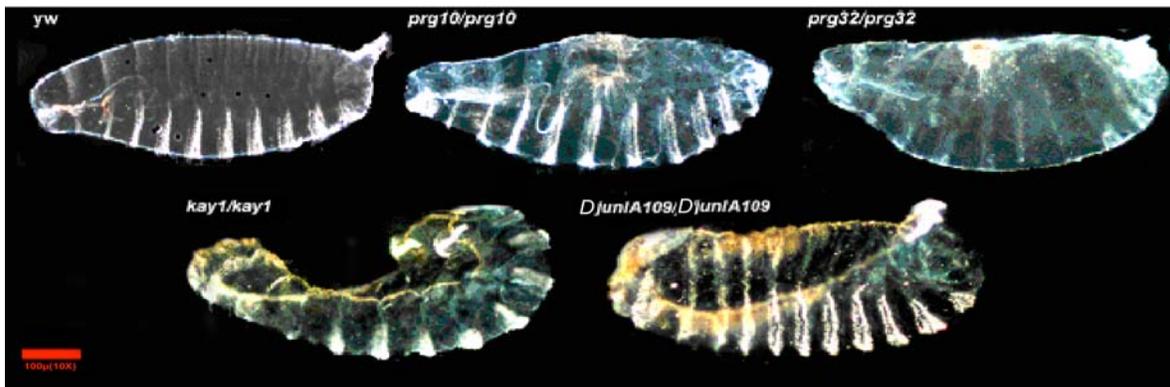


Figura18. Comparación de las cutículas de embriones: silvestre (yw), y homocigotos mutantes para *prg* (*prg*¹⁰ y *prg*³²), homocigotos mutantes para *Dfos* (*kay*¹) y homocigotos mutantes para *Djun* (*Djun*^{IA109}). Para esta figura y las siguientes los bordes necróticos (amarillo y rojo) demarcan el tamaño de la apertura. Vista lateral con la parte dorsal arriba y anterior a la derecha.

INTERACCION GENETICA DE *prg* Y *Djun*.-

Se analizaron las cutículas de dos de las líneas recombinantes que se obtuvieron para cada alelo. es decir, aquellas líneas que contienen en su genoma el gen *Djun* y *prg* mutados en un mismo cromosoma.

Para el alelo *prg*¹⁰ se analizaron las líneas recombinantes JP103 y JP1011 que presentan el genotipo *prg*¹⁰,*Djun*^{IA109}/CyO. Mediante el análisis de cutículas se pudo observar como el fenotipo mutante de *prg*¹⁰ se ve modificado con la presencia de una copia mutante del gen *Djun* (ver columna izquierda de la Figura 19; comparar con la Figura 18). Con la presencia de una copia mutante de *prg*¹⁰ el fenotipo mutante de *Djun* no se ve alterado considerablemente (ver columna central de la Figura 19; comparar con la Figura 18), pero cuando se presentan los dos genes mutantes en homocigosis el fenotipo de apertura dorsal que exhiben los embriones es extremadamente severo (ver columna derecha de la Figura 19).

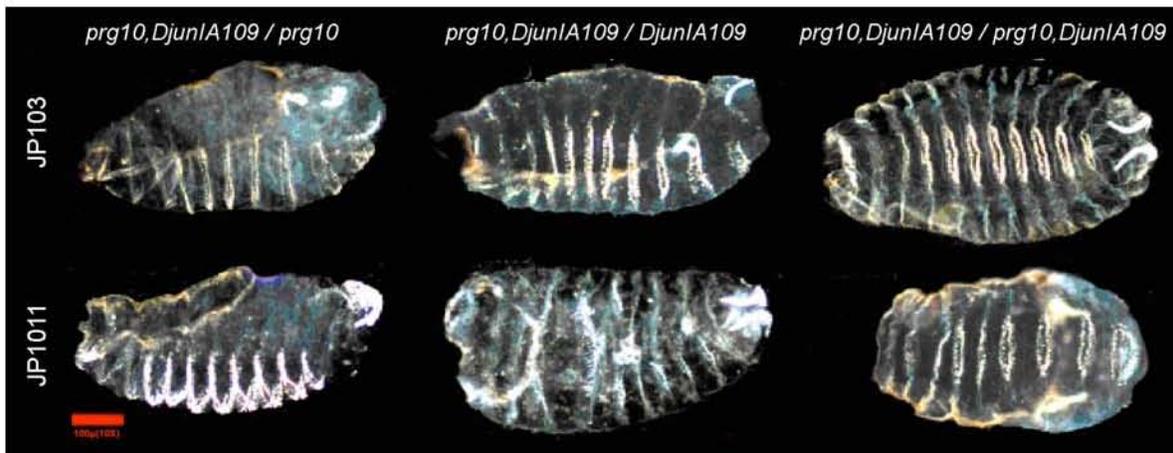


Figura 19.- Interacción de *prg*¹⁰ y *Djun*^{IA109}. Arreglo de cutículas de embriones de dos líneas recombinantes que contienen el alelo *prg*¹⁰ y *Djun*^{IA109} en un mismo cromosoma (JP103 y JP1011). Las cutículas de la columna izquierda, columna central y columna derecha tienen los genotipos: *prg*¹⁰*Djun*^{IA109}/*prg*¹⁰, *prg*¹⁰*Djun*^{IA109}/*Djun*^{IA109} y *prg*¹⁰*Djun*^{IA109}/*prg*¹⁰*Djun*^{IA109} respectivamente. El fenotipo de *prg*¹⁰ se hace mas acusado con una copia mutante del gen *Djun* y los organismos dobles homocigotos se extienden completamente por la ausencia de cerrado. Los embriones de la columna de la derecha en la figura se muestran en una vista ventral, al igual que JP1011/*Djun*^{IA109}, todos los demás en una vista lateral.

Para el alelo *prg*³² se obtuvieron las líneas recombinantes JP3210 y JP3212 con el genotipo *prg*³²,*Djun*^{IA109}/*CyO*. El fenotipo de *prg*³² de la misma forma que el fenotipo de *prg*¹⁰ se vuelve más acusado cuando se presenta una copia mutante de *Djun*. En contraste, el fenotipo mutante de *Djun* no se afecta cuando está *prg*³² en heterocigosis. También los embriones dobles homocigotos mutantes presentan un fenotipo de apertura dorsal más acusado que cualquiera de los dos genes solos en homocigosis (ver Figura 20; comparar con la Figura 18).

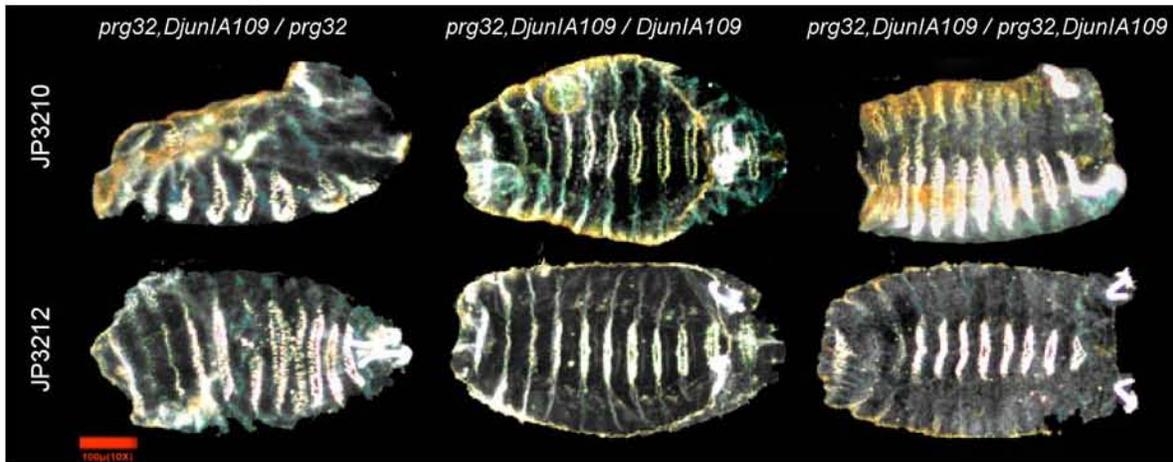


Figura 20.- Interacción de *prg*³² y *Djun*^{IA109}. Arreglo de cutículas de embriones de dos líneas recombinantes que contienen el alelo *prg*³² y *Djun*^{IA109} en un mismo cromosoma (JP3210 y JP3212). Las cutículas de la columna izquierda, columna central y columna derecha tienen los genotipos: *prg*³²*Djun*^{IA109}/*prg*³², *prg*³²*Djun*^{IA109}/*Djun*^{IA109} y *prg*³²*Djun*^{IA109}/*prg*³²*Djun*^{IA109} respectivamente. El fenotipo de *prg*³² se hace más acusado con una copia mutante del gen *Djun* y los organismos dobles homocigotos se extienden completamente por la ausencia de cerrado. Los embriones de la columna izquierda y derecha de la fila de arriba están en una vista lateral; todos los demás en una vista ventral.

INTERACCIÓN GENÉTICA DE *prg* Y *Dfos*.-

Analizamos las cutículas de las líneas que contienen en su genoma los genes *Dfos* y *prg* mutados, para probar la interacción de *prg* con *Dfos*. Estas líneas que generamos son P10K y P32K, las cuales presentan el genotipo *prg*¹⁰/*CyO*^{TM9}/*kay*¹ y *prg*³²/*CyO*^{TM9}/*kay*¹ respectivamente.

El análisis de cutículas nos muestra como el fenotipo mutante de *prg* se modifica con la presencia de una dosis mutante del gen *Dfos* (columna izquierda de la Figura 21; comparar con la Figura 18). Las cutículas de los embriones homocigotos mutantes para *Dfos* y heterocigotos mutantes de *prg* conservan el mismo grado de apertura que las cutículas de embriones solo con el gen *Dfos* mutado (columna central de la Figura 21; comparar con la Figura 18). Finalmente, las cutículas de los embriones dobles homocigotos mutantes de estos genes presentan un mayor grado de apertura dorsal, es decir, las cutículas se extienden por completo debido a una falla total en el cerrado dorsal del embrión (columna derecha de la Figura 21), al igual que la interacción de *prg* con el gen *Djun* (Figura 20).

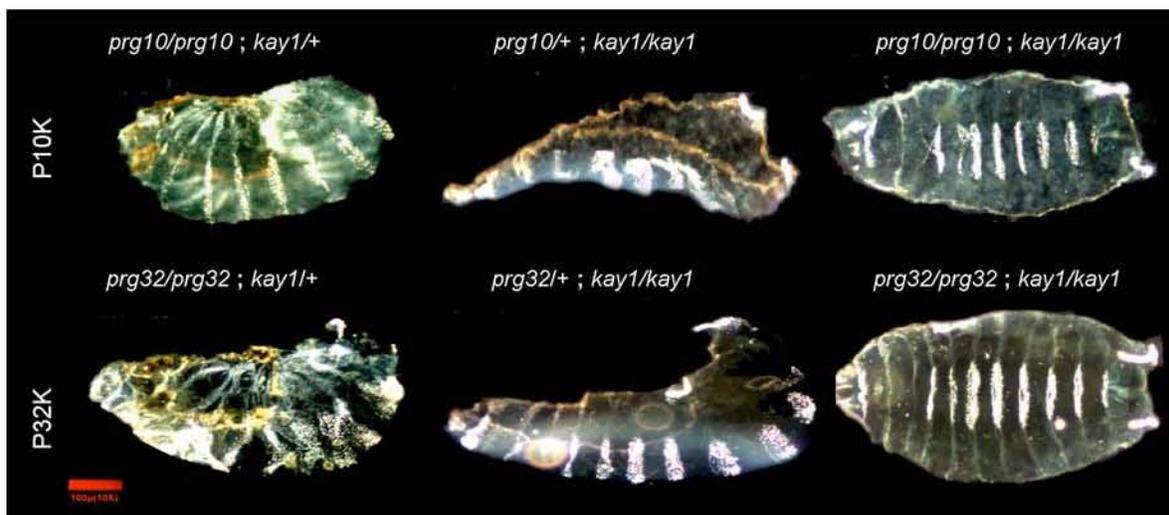


Figura 21. Interacción de prg^{10} o prg^{32} y kay^1 . Arreglo de cutículas de embriones que contienen el alelo prg^{10} o prg^{32} en el cromosoma 2 y kay^1 en el cromosoma 3 (P10K y P32K). Las cutículas de la columna izquierda, columna central y columna derecha de la fila de arriba tienen los genotipos: $prg^{10}/prg^{10};kay^1/+$, $prg^{10}/+;kay^1/kay^1$ y $prg^{10}/prg^{10};kay^1/kay^1$ respectivamente. Las cutículas de la columna izquierda, columna central y columna derecha de la fila de abajo tienen los genotipos: $prg^{32}/prg^{32};kay^1/+$, $prg^{32}/+;kay^1/kay^1$ y $prg^{32}/prg^{32};kay^1/kay^1$ respectivamente. El fenotipo de prg^{10} y prg^{32} se hace más acusado cuando se combina con *Dfos* en heterocigosis y las cutículas de los embriones dobles homocigotos mutantes se extienden completamente debido a la falta total de cerrado dorsal. Los embriones de la columna derecha están en una vista ventral, todos los demás en una vista lateral.

DISCUSIÓN

La vía de la JNK es una de las vías de transducción de señales que están involucradas de manera importante en el cambio de forma celular. Esta vía además está altamente conservada evolutivamente y aunque es una de las vías más estudiadas, aún no están completamente identificados ni caracterizados sus componentes. El cerrado dorsal de *Drosophila* resulta ser un buen modelo para la caracterización genética y molecular de los genes involucrados en este proceso.

Nosotros hemos identificado y caracterizado en este trabajo a uno de los genes que participan en el cerrado dorsal al cual llamamos *piragua* (*prg*). Mediante la escisión del elemento P presente en la línea 401, la cual no genera fenotipos observables de apertura dorsal, se generó una serie alélica de *prg*.

CARACTERIZACIÓN DE LOS ALELOS

Se sabe que hay distintos factores que afectan la penetrancia y expresividad de un fenotipo en un individuo. Estos factores hacen que observemos condiciones de semiletalidad (individuos homocigotos mutantes adultos) y letalidad de fenotipo variable (embriones con distinto grado de apertura) en los individuos homocigotos de los alelos mutantes de *prg*.

En los alelos débiles, al parecer hay una actividad parcial del gen, así como, una carga genética distinta entre individuos de una misma línea que favorece el que se inicie el proceso de cerrado dorsal. Esto aunado a los factores epigenéticos (factores ambientales) adecuados hace que estos embriones alcancen a completar la etapa crítica para la función del gen *prg* y poder así completar su desarrollo (los organismos antes mencionados como “escapadores”). Dado que estos “escapadores” no presentan fenotipos mutantes observables, es posible que el proceso en donde la función de *prg* es más limitante en estos alelos sea el cerrado dorsal.

Los embriones en los que el cerrado dorsal se inicia pero no se completa satisfactoriamente, resultan con fenotipos de apertura dorsal menos severos.

Los embriones homocigotos mutantes de todos los alelos de *prg*, como se ha observado, presentan distintos grados de apertura, pero ninguno presenta un fenotipo tan acusado de apertura dorsal como los embriones mutantes de *Djun* y *Dfos*. Esto significa que en los distintos alelos del gen *prg*, los embriones mutantes inician el proceso de cerrado dorsal, pero no lo terminan, lo que refleja que *prg* podría actuar ya iniciado el cerrado dorsal o bien que los alelos obtenidos no son alelos nulos. Es necesario hacer pruebas de interacción genética con alelos nulos ó deficiencias de la región genómica de *prg* para dilucidar lo anterior.

Las lesiones moleculares de los diferentes alelos de *prg* no se detectaron en la prueba de Southern blot, a excepción de *prg*²⁸. Esto nos indica que los fragmentos generados en las digestiones con las enzimas de restricción que utilizamos no evidenciaron los defectos que se encuentran presentes en estos alelos, pero si el hecho de que ninguno de ellos tiene alteraciones muy dramáticas en la zona analizada del genoma. Lo anterior presupone que las lesiones puedan ser discretas; se pudo comprobar en el caso del alelo *prg*⁸ y por lo tanto, será necesario utilizar otras enzimas de restricción para identificar las alteraciones en un futuro análisis si se decide emplear esta técnica.

El tipo de lesión molecular que generan las escisiones de los elementos P y que ha sido reportado principalmente son deleciones de tamaños variables, que van desde 2 bp hasta 1 Kbp (Greenspan, 2004), flanqueando el sitio de inserción, aunque también se sabe que pueden generar otro tipo de alteraciones moleculares, como inversiones. Siguiendo esta idea, en este trabajo se hizo la caracterización molecular de la serie alélica de *prg*, mediante el análisis de las secuencias de los amplificadores obtenidos de una región intergénica que abarca 700 bp y que flanquea el sitio de inserción del elemento P. Nosotros no observamos ningún cambio en todos los alelos en esta región del gen, excepto en *prg*⁸. Esto nos permite suponer que las alteraciones en la función en la serie alélica, reflejado en los fenotipos de los embriones mutantes, se encuentra en una zona que está más próxima al sitio de inicio de la transcripción del gen *prg* y no en el analizado alrededor de la inserción del elemento P, y que además son alteraciones discretas; como muestra el análisis por Southern blot en general. Por

esta razón, será necesario secuenciar todo el *locus* para tratar de identificar las diferencias.

EXPRESIÓN DE *prg*

Los patrones de detección del transcrito y de la proteína durante el desarrollo embrionario se correlacionan perfectamente, mostrando que no parece haber una regulación postranscripcional del RNA mensajero y que esta proteína se traduce cuando el transcrito se encuentra presente.

La activación de los primeros genes “cigóticos” (genes gap) comienza en la transición blastodérmica, antes de que se formen las membranas celulares que rodean a los núcleos presentes en el embrión, en las etapas finales del blastodermo sincisial. La presencia de mensajeros y proteínas en etapas del desarrollo anteriores a la celularización del embrión, implican una contribución materna. Los embriones mutantes del gen *prg* presentan fenotipos de cerrado dorsal con un grado de apertura no tan severo como el conocido para otros genes involucrados en este proceso. Una posible explicación de este fenotipo menos acusado es que la contribución materna ayuda a que los embriones mutantes inicien el cerrado dorsal, pero que no sea suficiente para finalizar el proceso. Alternativamente, podríamos pensar que *prg* se requiere solo cuando ya se ha iniciado el proceso y la contribución materna no es importante para el cerrado dorsal, o que los alelos en este estudio no son tan fuertes.

Para diferenciar entre estas posibilidades se necesitaría realizar experimentos con clones mutantes de línea germinal. Por otra parte también requerimos contar con alelos nulos para disecar con mayor precisión en que etapa del desarrollo exactamente es que *prg* se requiere, además de la función que tiene durante el cerrado dorsal.

Tanto el transcrito como la proteína que son codificados por *prg* se observan después de la expresión en el blastodermo sincisial, en etapas tempranas del desarrollo en los primordios de dos capas germinales: el ectodermo y el mesodermo que están formando la banda germinal. Del ectodermo se deriva el epitelio que cubre el embrión y que participa activamente en el cerrado; *prg* se

expresa de manera importante durante este proceso. Además, *prg* se expresa en el endodermo que se invagina en la parte anterior y posterior, y del cual deriva el intestino medio, donde también se observa su expresión durante la organogénesis.

REGULACIÓN DE LA PROTEINA Prg

Como se pudo observar analizando planos focales del epitelio lateral en los embriones silvestres, al parecer una forma de regulación de la proteína Prg se da al nivel de su localización. Inicialmente la proteína se encuentra presente en las células epiteliales en una distribución citoplásmica durante etapas anteriores al cerrado dorsal (distribución en forma de halos); después, en el cerrado dorsal, el patrón de tinción es punteado, lo cual sugiere una localización nuclear. Esto parece sugerir que Prg migra del citoplasma al núcleo para ejercer su función durante la etapa crítica en la cual participa. Cabe señalar que es importante hacer tinciones con un marcador nuclear (como DAPI que tiñe DNA) y ver si colocaliza con Prg durante el patrón punteado, para demostrar que efectivamente está ocurriendo este proceso. Además estos datos de localización subcelular concuerdan con la descripción de la proteína predicha por la base de datos, ya que Prg tiene motivos de dedos de Zn, del tipo C2H2 que son característicos de unión al DNA de muchos factores de transcripción.

Las tinciones que se analizaron para los alelos fuertes no muestran una alteración clara en cuanto a la distribución de Prg en los embriones homocigotos mutantes; sin embargo, es necesario hacer un análisis más detallado en estudios posteriores. También hay que recordar que la alteración que provoca que el proceso de cerrado dorsal no se dé satisfactoriamente, puede alterar los niveles del mensajero y de la proteína que se producen y no su localización, por lo cual es indispensable analizar en los organismos mutantes los niveles del mensajero y de la proteína.

INTERACCIONES GENÉTICAS

Las pruebas de interacciones genéticas indican un claro efecto de “genes modificadores” de *Djun* y *Dfos* sobre *prg*; es decir, el fenotipo mutante de *prg* bajo un fondo genético sensibilizado para *Djun* ó *Dfos* se ve acentuado (modificado); en cambio los fenotipos mutantes de *Djun* y *Dfos*, bajo un fondo genético heterocigoto mutante de *prg*, no. Esto demuestra de manera genética que *prg* participa en la vía de la cinasa de Jun.

Las tinciones de Prg en los alelos mutantes estudiados no muestran diferencias significativas con respecto a las tinciones de Prg en los organismos silvestres. La presencia tanto del transcrito como de la proteína de *prg* en etapas muy tempranas del desarrollo embrionario, indican que existe contribución materna de *prg*. Esta información y datos preliminares de pruebas de complementación con una línea deficiente de la región genómica de *prg* que muestran una acentuación del fenotipo de apertura dorsal (datos no publicados), sugieren que los alelos utilizados en las interacciones genéticas son alelos hipomorfos. Es indispensable continuar con la caracterización del nivel de funcionalidad de los alelos que se han utilizado en estas pruebas de interacción genética, con técnicas como las de Northern blot y Western blot para medir la expresión del mensajero y la proteína en los alelos mutantes, y entender así de manera más clara la participación de *prg* dentro de la vía de la JNK.

Hay dos modelos que proponemos en este trabajo para explicar la participación de *prg* en la vía de la JNK, tomando en cuenta que los alelos de *prg* que utilizamos para las interacciones genéticas son hipomorfos (Figura 22).

El primer modelo propone que *prg* participa río arriba de *Djun* y *Dfos*. El fenotipo mutante que presenta *prg* es menos severo que el fenotipo que presenta *Djun* y *Dfos*, dado que los alelos de este gen son hipomorfos. En un fondo genético sensibilizado para los genes *Djun* y *Dfos*, es decir, organismos heterocigotos mutantes para estos genes, el fenotipo mutante de *prg* se hace más acusado, indicando así que *prg* participa en la vía de la JNK y por lo tanto la alteración fuerte en un componente debajo de *prg* (los alelos de *Djun* y *Dfos* son alelos nulos) contribuye a un fenotipo más parecido al fenotipo clásico de apertura

dorsal. Además, en un fondo genético heterocigoto mutante de *prg* el fenotipo de *Djun* y *Dfos* no se afecta de manera significativa, debido a que realmente la cantidad de *prg* que se está alterando es muy poca como para verse reflejada en el fenotipo (alelos hipomorfos) (Figura 22A).

El segundo modelo propone que *prg* participa río abajo de *Djun* y *Dfos*. En este caso el fenotipo mutante de *prg* es menos severo que el fenotipo mutante que presentan *Djun* y *Dfos* gracias a que los alelos utilizados son alelos hipomorfos. El fenotipo mutante de *prg* se hace más acusado en un fondo genético heterocigoto mutante para *Djun* ó *Dfos*, indicando así, que estos dos genes están modificando la expresión de *prg*. *DJun* y *DFos* actúan como factores de transcripción; por lo tanto, una forma de regular la expresión cigótica de *prg*, sería a través de la regulación directa de la transcripción de este gen por medio del complejo AP-1. Existen sitios predichos de unión del complejo AP-1 en la región intergénica entre *prg* y *nana*, dato que apoya a este posible mecanismo.

Cuando se presenta un fondo genético sensibilizado por la alteración de una copia de *prg* (heterocigoto mutante) el fenotipo de *Djun* y *Dfos* no se altera indicando que estos dos genes son el factor limitante, ya que están arriba de *prg* en la vía. La regulación del mensajero y la proteína que provienen de la contribución materna puede ser explicada por una regulación indirecta del procesamiento o la traducción del mensajero. También esta regulación indirecta podría actuar en la expresión cigótica de *Prg*, a través de genes de respuesta a la vía de la JNK (Figura 22B).

Sin embargo, en un individuo con la condición de homocigoto mutante para *prg* y homocigoto mutante para *Djun* ó *Dfos* (*prg,Djun/prg,Djun* ó *prg/prg;Dfos/Dfos*) el fenotipo mutante que presenta es más acusado que el fenotipo mutante de cualquiera de los genes de las parejas solos. Esto último se podría interpretar como que *prg* participa además de manera independiente a *Djun/Dfos* en el cerrado dorsal, pero en paralelo fuera de la función que ya tiene dentro de la vía de la JNK. Por esta razón, cuando se presentan las mutaciones combinadas en los genes *prg-Djun* o *prg-Dfos*, los defectos se suman parcialmente en el mismo proceso y presentan una mayor alteración del fenotipo mutante.

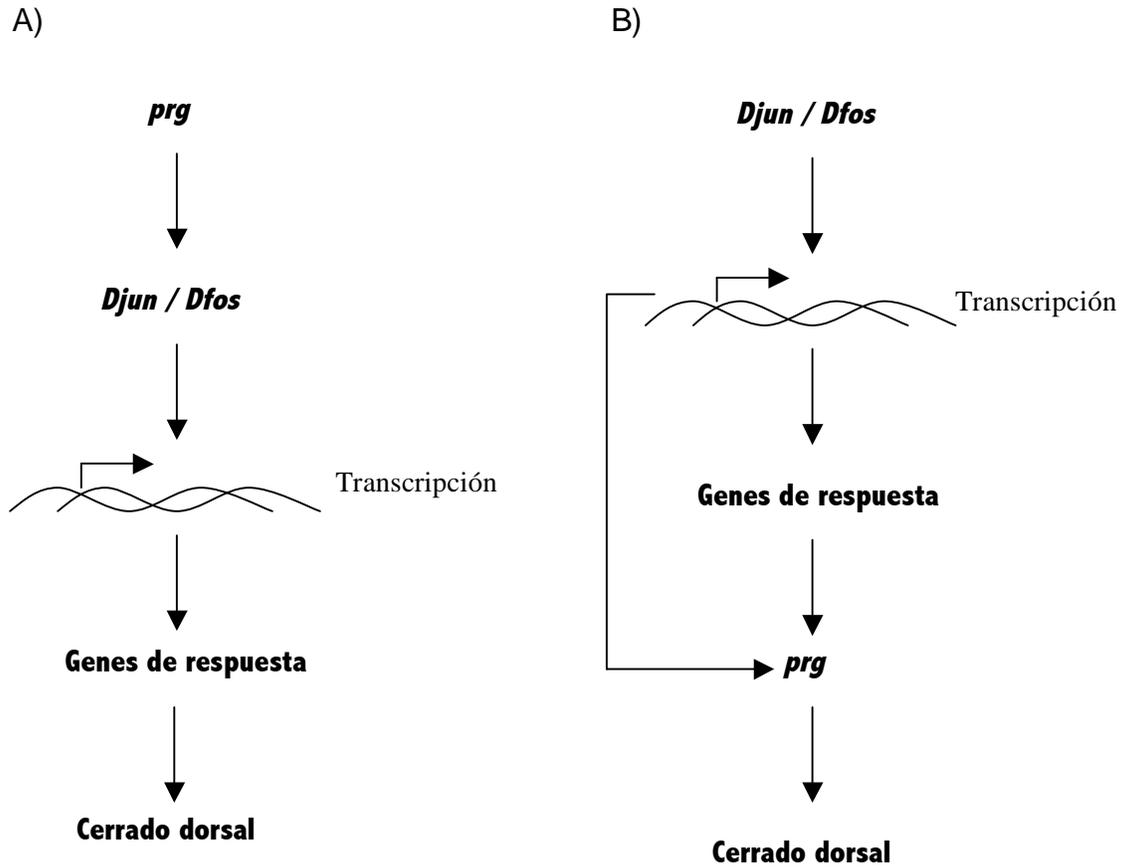


Figura 22. Modelos propuestos para la participación de *prg* en la vía de la JNK durante el cerrado dorsal. Estos modelos suponen que los alelos utilizados para el análisis genético son alelos hipomorfos. El primer modelo (A) propone que *prg* participa río arriba de *Djun* y *Dfos* dentro de la vía de la JNK, regulando la transcripción de genes de respuesta, para llevar a cabo el proceso de cerrado dorsal. El segundo modelo (B) propone que *prg* participa río abajo de *Djun* y *Dfos* dentro de la vía de la JNK, regulado transcripcionalmente por la interacción directa o indirecta del complejo AP-1 (DJun/DFos) para llevar a cabo el proceso de cerrado dorsal. Además de esta función, *prg* participa en una vía paralela involucrada en el mismo proceso de forma independiente a *Djun* y *Dfos*.

EL ALELO *prg*⁸

Djun y *Dfos* son los últimos miembros en la cascada de transducción de señales de la JNK que culmina con la transcripción de genes. Uno de los genes que se transcriben en respuesta a la vía de la JNK es *dpp* (homólogo del TGF- β en vertebrados); *Dpp* actúa como ligando de una vía de señalización hacia células ventrales desde las células de la hilera guía en el epitelio lateral.

La mutación que se encontró en *prg*⁸ altera una base en la región intergénica entre *prg* y el gen *nana*. Esta alteración se sitúa sobre una secuencia que podría contribuir al sitio de reconocimiento de un factor de transcripción, el factor nuclear I (NFI). La mutación en *prg*⁸ altera de manera importante este sitio. El gen NFI está conservado evolutivamente, y se sabe que regula la expresión de muchos genes virales y celulares. Los cuatro genes que codifican al NFI en vertebrados (NFI-A, NFI-B, NFI-C, NFI-X) se expresan durante el desarrollo embrionario y fetal de ratón. También se encuentran sitios de unión de este factor en la región reguladora de genes que se transcriben en respuesta a la activación de la vía del TGF- β en vertebrados. La sobreexpresión de uno de estos genes (NFI-X) previene el arresto de crecimiento mediado por TGF- β , en células epiteliales de pulmón de visón. La sobreexpresión de estos genes en fibroblastos de embriones de pollo los hace resistentes a la transformación mediada por los oncogenes *jun* y *fos*, además de inducir un fenotipo de células aplanadas (Gronostajski, 2000). Se propone que NFI participa en la vía de TGF- β como un gen de respuesta inmediata.

Se ha identificado a un solo gen homólogo del NFI en *Drosophila* (*DNFI*), en el cromosoma 4 (Drysdale *et al.*, 2005). Este gen se expresa en el ectodermo y tiene su mayor homología con los genes de vertebrado en la secuencia que codifica para los dominios de enlace al DNA y de dimerización. El dominio de enlace al DNA tiene cuatro cisteínas conservadas. Tres de estas cisteínas son necesarias para el enlace con el DNA y una cisteína hace sensible al factor al estrés oxidativo (Gronostajski, 2000). Cabe recordar que la vía de la JNK fue descubierta originalmente en levaduras como una vía que se activa en respuesta al estrés celular y en *Drosophila* ha sido referida como una vía que confiere tolerancia al estrés oxidativo (Wang *et al.*, 2003). No se conoce una relación directa de este

gen en la vía de la JNK, pero muchos de los datos sugieren que podría estar involucrado en los mismos procesos. Dado que la expresión de *prg* también podría estar regulada al menos en parte por *DNfl*, es indispensable hacer pruebas de interacción genética con algunos componentes de la vía de transducción de señales de *dpp* con el *DNfl* y con *prg*, para estudiar mejor el mecanismo de acción y regulación de *prg*.

Finalmente, datos preliminares de las pruebas de complementación con una deficiencia que incluye al locus de *prg* muestran un fenotipo de apertura dorsal más acusado en los embriones con combinaciones heteroalélicas para la deficiencia y los alelos fuertes de *prg*. Además, algunos de estos embriones mutantes presentan un fenotipo más temprano en el desarrollo, es decir, presentan cutículas en forma de U, las cuales se obtienen cuando hay alteraciones durante la extensión/retracción de la banda germinal del desarrollo embrionario. Los embriones homocigotos de alelos hipomorfos de *hindsight (hnt)*, un gen que regula la vía de la JNK de manera negativa en la amnioserosa, presentan fenotipos de apertura dorsal. Este gen codifica a una proteína que contiene 14 dedos de Zn de tipo C2H2. La proteína Hnt se expresa en la amnioserosa y el intestino medio como Prg. La expresión en la amnioserosa es importante para que se mantenga este epitelio, que además es importante para la retracción de la banda germinal, un proceso en donde *hnt* también participa. Embriones hemocigotos de alelos fuertes de *hnt* presentan el fenotipo de cutículas en forma de U. Estas cutículas mutantes no presentan alteración en el número de segmentos, ni en su distribución, lo que significa que no tienen alteraciones en el patrón corporal. A genes que participan en este proceso de extensión/retracción de la banda germinal, y que presentan este fenotipo característico cuando están alterados, se les conoce como genes del grupo U-shaped (forma de U en inglés) (Brody, 2006). Cabe mencionar que casi todos los genes del grupo U-shaped son factores de transcripción e incluso algunos con dedos de Zn como *prg*. Debido a lo anterior, *prg* podría participar también en este proceso. Este requerimiento explica quizá la función de *prg* en el cerrado dorsal en paralelo a la vía de la JNK.

Los genes del grupo U-shaped también participan en el desarrollo de estructuras adultas junto con otros genes que codifican para diversos factores de transcripción y que son conocidos como genes de prepatrón. Estos genes de prepatrón, más que establecer la identidad de las células, les confieren una potencialidad para realizar una función (Calleja *et al.*, 2002). En los individuos homocigotos de los alelos débiles de *prg* que sobreviven hasta la etapa adulta, se ha observado un fenotipo de mala segmentación en la parte abdominal (se ven afectados los segmentos 2 y 3), con penetrancia variable (resultados no mostrados), lo cual indica que *prg* además de ser requerido de manera crítica durante el desarrollo embrionario podría tener una función durante la metamorfosis. Esta última función podría también ser semejante a la de los genes del grupo U-shaped.

Para entender la participación de *prg* de forma más atinada en el organismo adulto (también conocido como imago), será necesario generar clones homocigotos mutantes de alelos nulos o fuertes de *prg* en tejido imagal y estudiar los requerimientos de este gen en los mismos. Una manera de generar clones de células con este genotipo en el organismo adulto es por medio de recombinación mitótica, una herramienta muy utilizada en *Drosophila*.

CONCLUSIONES

Drosophila melanogaster ha sido y seguirá siendo un importante modelo para el estudio de genes involucrados en diversos procesos biológicos. En nuestro caso nos avocamos al estudio de los genes que participan en la regulación del cambio de forma celular, particularmente aquellos relacionados con la vía de la JNK.

En este trabajo se aislaron y caracterizaron alelos mutantes que pertenecen al gen *piragua*. Entre estos alelos estudiados no se encontraron algunos que presentaran un 100% de penetrancia y una expresividad consistente. Estas serían las características ideales para un análisis genético completo. Sin embargo, se lograron colocar todos estos alelos en una serie alélica. Dentro de esta serie los alelos *prg*⁸, *prg*¹⁰, *prg*³¹ y *prg*³² son alelos fuertes ya que son 100% letales, y candidatos a alelos con pérdida de función acusada. Los alelos *prg*¹⁴, *prg*²⁵ y *prg*²⁸ son alelos débiles, que pueden ser muy útiles en la caracterización de la función del gen. Por otra parte, el estudio del patrón de expresión de *prg* proporcionó información espacial y temporal del transcrito y de la proteína codificados por este gen. Esta evidencia, aunada a la caracterización de los fenotipos mutantes, indica las etapas y las regiones en donde *prg* se requiere durante el desarrollo embrionario. Por último, las pruebas de interacciones genéticas con *Djun* y *Dfos* nos revelaron información valiosa acerca de la regulación o participación de *prg* en la vía de la JNK. Como podemos darnos cuenta por los datos obtenidos en este trabajo, además de obtener resultados que nos proporcionan bases para interpretar y estudiar la función de *prg* en el desarrollo, también se generaron nuevas interrogantes que sería importante resolver en trabajos posteriores.

BIBLIOGRAFIA

Affolter, M. Nellen, D. Nussbaumer, U y Basler, K. **1994**. Multiple requirements for the receptor serine/threonine kinase *thickveins* reveal novel functions of TGF β homologs during *Drosophila* embryogenesis. *Development*, 120:3105-3117.

Affolter, M. Marty, T. Viganò, MA. Jazwinska, A. **2001**. Nuclear interpretation of Dpp signaling in *Drosophila*. *EMBO J*, 20:3298-305. Review.

Alberts, B. Jonson, A. Lewis, J. Raff, M. Roberts, K. Walter, P. **2002**. Cell communication. En: Molecular biology of the cell. Ari S, Heldin CH, Krauss G, Purton M, Eds. Garland Science, USA: pp. 831-906.

Brody, TB. **1996**. Stages of development and mitotic domains. En: The Interactive Fly. <http://flybase.bio.indiana.edu/allied-data/lk/interactive-fly/aimain/2stages.htm.2>

Brody, TB. **2006**. *pebbled/hindsight*. developmental biology. En: The Interactive Fly. <http://flybase.bio.indiana.edu/allied-data/lk/interactive-fly/newgene/hindst4.htm#EfMu>

Calleja, M. Renaud, O. Usui, K. Pistillo, D. Morata, G. Simpson, P. **2002**. How to pattern an epithelium: lessons from achaete-scute regulation on the notum of *Drosophila*. *Gene*, 12:1-12. Review.

Campos-Ortega, JA. y Hartenstein, V. **1997**. A summary of *Drosophila* embryogenesis. En: The embryonic development of *Drosophila melanogaster*. Springer Verlag, Berlin: pp. 1-8.

Chen, HW. Marinissen, MJ. Oh, SW. Chen, X. Melnick, M. Perrimon, N. Gutkind, JS. Hou, SX. **2002**. CKA, a novel multidomain protein, regulates the JUN N-terminal kinase signal transduction pathway in *Drosophila*. *Mol Cell Biol*, 6:1792-803.

Chinenov, Y. Kerppola, TK. **2001**. Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. *Oncogene*, 20:2438-52. Review.

Drysdale, RA. Crosby, MA y The FlyBase Consortium. **2005**. FlyBase: genes and gene models. *Nucleic Acids Research*, 33:D390-D395. <http://flybase.org/>

Gomperts, B. Kramer, I. Tatham, P. **2003**. Signal transduction. Elsevier Academic Press, USA: pp. 257-282.

Greenspan, R.J. **2004**. The basics of doing a cross. En: Fly pushing: the theory and practice of *Drosophila* genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, China: pp. 3-24.

Gronostajski, R.M. **2000**. Roles of the NFI/CTF gene family in transcription and development. *Gene*, 16:31-45. Review.

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

Igaki, T. Kanda, H. Yamamoto-Goto, Y. Kanuka, H. Kuranaga, E. Aigaki, T. Miura, M. **2002**. *eiger*, a TNF superfamily ligand that triggers the *Drosophila* JNK pathway. *EMBO J*, 21:3009-3018.

Jakubowski. **2006**. Binding and the control of gene transcription. En: Biochemistry Online: An Approach Based on Chemical Logic <http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/bind/olbindtranscription.html>.

Jasper, H. Benes, V. Schwager, C. Sauer, S. Clauder-Munster, S. Ansorge, W. Bohmann, D. **2001**. The genomic response of the *Drosophila* embryo to JNK signaling. *Dev Cell*, 1:579-86.

Karin, M y Gallagher, E. **2005**. From JNK to pay dirt: Jun kinases, their biochemistry, physiology and clinical importance. *IUBMB Life*, 57: 283-295.

Knust E. **1997**. *Drosophila* morphogenesis: movements behind the edge. *Curr Biol*, 7:558-561. Review.

Laity JH, Lee BM, Wright PE. **2001**. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Curr Opin Struct Biol*, 11:39-46. Review.

Mathews, CK. **1998**. Coordinación Metabólica, Control Metabólico y Transducción de Señal. En: Bioquímica. Nishizuka Y, Fantl WJ, Marshall CJ, Egan SE, Eds. McGraw-Hill – Interamericana, España: pp. 919-946.

Matthews, JM. Kowalski, K. Liew, CK. Sharpe, BK. Fox, AH. Crossley, M. MacKay, JP. **2000**. A class of zinc fingers involved in protein-protein interactions biophysical characterization of CCHC fingers from fog and U-shaped. *Eur J*

Biochem, 267:1030-8.

Matthews, JM y Sunde, M. **2002**. Zinc fingers-folds for many occasions. *IUBMB Life*, 54:351-355. Review.

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*, 10:2759–2768.

Riesgo-Escovar, JR y Hafen, E. **1997a**. A common and distinct roles of DFos and DJun during *Drosophila* development. *Science*, 278:669-672.

Riesgo-Escovar, JR y Hafen, E. **1997b**. *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*, 11:1717–1727.

Robertson, HM. Preston, CR. Phillis, RW. Johnson-Schlitz, DM. Benz, WK. Engels, WR. 1988. A stable genomic source of P element transposase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 118:461-70.

Rousseau, E. Goldstein, ES. **2001**. The gene structure of the *Drosophila melanogaster* homolog of the human proto-oncogene *fos*. *Gene*, 11:315-22.

Stronach, B y Perrimon, N. **2002**. Activation of the JNK pathway during dorsal closure in *Drosophila* requires the mixed lineage kinase, *slipper*. *Genes Dev*, 16:377-387.

Su, YC. Treisman, JE. Skolnik, EY. **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 Dev*, 12:2371-2380.

Wang, MC. Bohmann, D. Jasper, H. **2003**. JNK signaling confers tolerance to oxidative stress and extends lifespan in *Drosophila*. *Dev Cell*, 5:811-6.

Xia, Y. Karin, M. **2004**. The control of cell motility and epithelial morphogenesis by Jun kinases. *Trends Cell Biol*, 14:94-101.

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. *EMBO J*, 16:7393–7401.

ANEXO A. Embriones que no terminan su desarrollo

	Embriones muertos esperados (%)	Embriones obtenidos que no terminaron su desarrollo	Embriones obtenidos que no terminan su desarrollo (%)	Embriones con DO de los embriones muertos obtenidos	Embriones con DO de los embriones muertos obtenidos (%)
<i>prg</i> ⁺	0	247/1086	23	0/247	0
<i>prg</i> ⁸	25	360/909	40	67/360	19
<i>prg</i> ¹⁰	25	778/2254	35	170/778	22
<i>prg</i> ¹⁴	25	409/1098	38	43/409	11
<i>prg</i> ²⁵	25	278/1006	28	13/278	5
<i>prg</i> ²⁸	25	263/574	46	23/263	9
<i>prg</i> ³¹	25	518/1590	33	35/518	7
<i>prg</i> ³²	25	254/713	36	23/254	9

Tabla A.1.- Análisis de embriones que no terminan su desarrollo de los distintos alelos de *prg*. Muchos embriones no termina su desarrollo de manera satisfactoria aun en los embriones silvestres (*prg*⁺), pero ninguno presenta el fenotipo de apertura dorsal (AD), como se observa en todos los alelos mutantes de *prg*.

ANEXO B. Análisis de cutículas.

Cutículas de <i>prg</i> ⁸				
Posición de la apertura	% de la posición de apertura con respecto al total de afectados con AD	Segmentos afectados	Cantidad de segmentos afectados	Frecuencia
P	12	2-7	6	1
		2-6	5	2
		3-5	3	2
C	79	2-8	7	1
		3-8	6	2
		3-7	5	2
		3-6	4	1
		4-7	4	5
		4-6	3	9
		4-5	2	5
		5-6	2	6
		5	1	1
		6	1	1
A	9	4-8	5	2
		5-7	3	2

Tabla B.1.- Análisis de cutículas de *prg*⁸ (n=42). La zona sombreada de la tabla, indica que la localización de la apertura en la parte central del embrión es más frecuente, afectando de 2 a 4 segmentos. A: anterior, C: central y P: posterior. Los segmentos están numerados de posterior a anterior.

Cutículas de <i>prg</i> ¹⁰				
Posición de la apertura	% de la posición de apertura con respecto al total de afectados con AD	Segmentos afectados	Cantidad de segmentos afectados	Frecuencia
C	92	3-7	5	1
		3-6	4	1
		4-7	4	2
		4-6	3	1
		5-6	2	6
		5	1	1
A	8	5-7	3	1

Tabla B.2.- Análisis de cutículas de *prg*¹⁰ (n=13). La zona sombreada de la tabla, indica que la localización de la apertura en la parte central del embrión es más frecuente,

afectando 2 segmentos. A: anterior, C: central y P: posterior. Los segmentos están numerados de posterior a anterior.

Cutículas de <i>prg</i> ¹⁴				
Posición de la apertura	% de la posición de apertura con respecto al total de afectados con AD	Segmentos Afectados	Cantidad de segmentos afectados	Frecuencia
C	21	3-5	5	1
		5-6	2	3
A	79	2-10	9	1
		5-10	6	3
		6-10	5	1
		7-10	4	1
		8-10	3	3
		5-7	3	6

Tabla B.3.- Análisis de cutículas de *prg*¹⁴ (n=19). La zona sombreada de la tabla indica que la localización de la apertura en la parte anterior del embrión es más frecuente, afectando de 2 a 4 segmentos. A: anterior y C: central. Los segmentos están numerados de posterior a anterior.

Cutículas de <i>prg</i> ²⁵				
Posición de la apertura	% de la posición de apertura con respecto al total de afectados con AD	Segmentos Afectados	Cantidad de segmentos afectados	Frecuencia
C	80	5-6	2	8
A	20	7-10	4	2

Tabla B.4.- Análisis de cutículas de *prg*²⁵ (n=10). La zona sombreada de la tabla indica que la localización de la apertura en la parte central del embrión es más frecuente, afectando 2 segmentos. A: anterior y C: central. Los segmentos están numerados de posterior a anterior.

Cutículas de <i>prg</i> ²⁸				
Posición de la apertura	% de la posición de apertura con respecto al total de afectados con AD	Segmentos Afectados	Cantidad de segmentos afectados	Frecuencia
C	44	3-7	4	2
		4-6	3	1
		6	1	1
A	56	3-10	8	1
		3-9	7	1
		5-10	6	1
		6-10	5	1
		6-8	3	1

Tabla B.5.- Análisis de cutículas de *prg*²⁸ (n=9). La zona sombreada de la tabla indica que la localización de la apertura en la parte anterior del embrión es más frecuente, afectando de 5 a 8 segmentos. A: anterior y C: central. Los segmentos están numerados de posterior a anterior.

Cutículas de <i>prg</i> ³¹				
Posición de la apertura	% de la posición de apertura con respecto al total de afectados con AD	Segmentos Afectados	Cantidad de segmentos afectados	Frecuencia
P	15	1-7	7	1
		2-6	5	1
		3-5	3	2
C	54	2-8	7	1
		3-7	5	3
		4-7	4	1
		4-6	3	2
		4-5	2	3
		5-6	2	2
		5	1	2
		5	1	2
A	31	4-10	7	2
		6-10	5	1
		4-8	5	1
		7-10	4	1
		8-10	3	1
		5-7	3	2

Tabla B.6.- Análisis de cutículas de *prg*³¹ (n=26). La zona sombreada de la tabla indica que la localización de la apertura en la parte central del embrión es más frecuente,

afectando de 1 a 3 segmentos. A: anterior, C: central y P: posterior. Los segmentos están numerados de posterior a anterior.

Cutículas de <i>prg</i> ³²				
Posición de la apertura	% de la posición de apertura con respecto al total de afectados con AD	Segmentos Afectados	Cantidad de segmentos afectados	Frecuencia
P	10	2-6	5	1
C	80	3-8	6	2
		5-6	2	2
		4	1	4
A	10	4-8	5	1

Tabla B.7.- Análisis de cutículas de *prg*³² (n=10). La zona sombreada de la tabla indica que la localización de la apertura en la parte central del embrión es más frecuente, afectando de 1 a 2 segmentos. A: anterior, C: central y P: posterior. Los segmentos están numerados de posterior a anterior.