



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

"POSIBLE INTERACCION FISICA ENTRE Amfos y DFos EN *Drosophila melanogaster*."

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

ALMA DELIA BERTADILLO JILOTE

DIRIGIDA POR

Dr. JUAN RAFAEL RIESGO ESCOVAR

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2008.



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.

INDICE GENERAL

Contenido	Página
INDICE GENERAL	i
INDICE DE FIGURAS	iii
RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	2
1. Generalidades de <i>Drosophila melanogaster</i>	2
2. Embriogénesis	3
3. Transducción de señales y la vía tipo MAPK	5
4. Vía de la cinasa de Jun (JNK)	6
5. Factores de transcripción	9
6. <i>Dfos</i>	10
7. <i>Amigo de fos (amfos)</i>	11
HIPOTESIS	16
OBJETIVOS	17
General	17
Específicos	17
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	18
MATERIAL Y METODOS	19
1. Diseño de oligonucleótidos	19
2. Reacción en cadena de la polimerasa, PCR	19
3. Ligación del vector	19
4. Transformación de bacterias	19
5. Síntesis <i>in vitro</i>	20
6. Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE)	21
7. Preparación de las muestras	22
8. Western blot	22

9. Coinmunoprecipitación	22
10. Tinción con azul de Coomassie	23
11. Tinción con plata	24
RESULTADOS	25
1. Síntesis <i>in vitro</i> de Amfos	33
2. Síntesis <i>in vitro</i> de Dfos	35
3. Interacciones proteína – proteína.	37
a) Dfos	37
b) Amfos	38
c) Dfos y Amfos <i>in vitro</i>	39
DISCUSION	41
CONCLUSIONES	45
REFERENCIAS	46

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i>	3
2	Estadios de desarrollo embrionario de <i>D. melanogaster</i>	5
3	Vía de señalización de tipo MAPK	8
4	Motivo de unión a DNA tipo zipper de leucina	9
5	Expresión de Dfos en embriones silvestres	11
6	Interacción genética entre <i>Dfos</i> y <i>amfos</i>	12
7	Esquema de la proteína Amfos	13
8	Northern blot y Western blot de <i>amfos</i>	13
9	Expresión del transcrito de <i>Dfos</i> y <i>amfos</i>	14
10	Colocalización de Amfos y Dfos	15
11	Preparación del templado inicial por PCR.	21
12	Esquema de oligonucleótidos para <i>amfos</i>	25
13	Producto de PCR a partir del cDNA de <i>amfos</i>	26
14	Electroforesis en gel de agarosa para mostrar la liberación del inserto del vector (pGEM-T Easy Vector).	26
15	Productos de la primera PCR para el fragmento de 2300 pb	27
16	Productos de la segunda PCR para la síntesis <i>in vitro</i>	28
17	Western blot de <i>amfos</i> de un homogenado de moscas silvestres	29
18	Western Blot de los productos proteicos de la síntesis <i>in Vitro</i> de Amfos	30
19	BLAST de la secuencia mutada de <i>amfos</i> con la base de datos Flybase.	31
20	PCR para corrección del cDNA de <i>amfos</i>	32
21	BLAST de la secuencia corregida de <i>amfos</i> con la base de datos Flybase	33
22	Oligonucleótidos para la síntesis <i>in vitro</i> de Amfos	33

23	PCR de la primera y segunda reacción de PCR para la síntesis <i>in vitro</i> de Amfos	34
24	Western blot para Amfos-His ₆	35
25	Esquema de oligonucleótidos para <i>Dfos</i>	35
26	Productos de la primera y segunda reacción de PCR para <i>Dfos</i>	36
27	Western blot para la proteína <i>Dfos</i> sintetizada <i>in vitro</i>	37
28	Coinmunoprecipitación de <i>Dfos</i> y Amfos.	38
29	Coinmunoprecipitación de Amfos y <i>Dfos</i> .	39
30	Coinmunoprecipitación de Amfos y <i>Dfos</i> sintetizadas <i>in vitro</i>	40

RESUMEN

En las etapas finales del desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster*, se presenta un proceso conocido como cerrado dorsal, en el cual las células del epitelio lateral cambian de forma, para alargarse y cerrarse en la parte dorsal del embrión. Este proceso está orquestado por vías de señalización como la vía de la cinasa de Jun, que es una vía de tipo MAP cinasa, que dirige estos cambios de forma celular. Mutantes de la vía de la cinasa de Jun presentan un fenotipo de apertura dorsal que se observa como un hoyo en la parte dorsal del embrión.

En el laboratorio se caracterizó una mutante de la vía de la cinasa de Jun, llamada *amfos* (*amigo de fos*) que presenta el fenotipo de apertura dorsal e interacciona genéticamente con el gen *Dfos* (factor de transcripción tipo zipper de leucina), de una manera poco habitual conocida como no complementación no alélica. De acuerdo a la secuencia del gen *amfos* en la base de datos de *Drosophila* se predijo un posible producto proteico con dos dominios, uno conservado pero con función desconocida y uno ácido con características de activador de la transcripción. Por lo anterior en el presente trabajo se buscó determinar si existe una interacción física entre los productos de estos dos genes, para lo cual realizamos la síntesis *in vitro* de dichas proteínas en un sistema libre de células. Para detectar la presencia de las proteínas se utilizó electroforesis en gel de poliacrilamida y tinción con azul de Coomassie o nitrato de plata y para la interacción proteína – proteína la técnica de coinmunoprecipitación. Sin embargo no obtuvimos suficiente evidencia de una posible interacción entre estas dos proteínas sintetizadas *in vitro*, así como en ensayos independientes en donde se inmunoprecipitó a una proteína sintetizada *in vitro* con la otra obtenida a partir de un homogenado control.

ABSTRACT

Towards the end of embryonic development in *Drosophila melanogaster*, a process known as dorsal closure occurs, where cells of the lateral epithelium change their shape. On doing so, they elongate and close the dorsal part of the embryo. This process is orchestrated by a signalling pathway: Jun kinase pathway, a MAP kinase pathway, Jun kinase mutants present a dorsal open phenotype observed as a hole in the dorsal side of the embryo. The laboratory has characterized a Jun kinase pathway mutant called *amfos* (*amigo de fos*) with a dorsal open phenotype that interacts genetically with *Dfos* (leucine zipper transcription factor), in an unusual way known as non allelic non-complementation. *amfos* is predicted to contain two recognizable domains, a conserved domain with a unknown function and an acidic domain typical of transcription activator. In this work we sought to determine whether there is a physical interaction between Amfos and Dfos. We synthesized *in vitro* both proteins in a cell free system. We used coinmunoprecipitación followed by SDS-PAGE and coomassie and silver staining to detect the proteins. In separate trials we also immunoprecipitated one protein synthesized *in vitro* with the other obtained from control embryo homogenate. Taken together, these experiments suggest the possibility that these two proteins are physically interacting *in vivo*.

INTRODUCCIÓN

Drosophila melanogaster ha sido muy utilizada como modelo genético debido a las ventajas que ofrece: ciclo de vida corto, capacidad de generar una gran cantidad de individuos en poco tiempo, facilidad de análisis genético, etc. En el laboratorio se caracterizó una mutante nueva con deficiencia en el cerrado dorsal. Este es un proceso que ocurre durante la embriogénesis, donde las células del epitelio lateral, de origen ectodérmico, cambian de forma y se estiran cubriendo el embrión en la parte dorsal. Cuando esto no ocurre, el embrión muere con un agujero en la parte dorsal, fenotipo conocido como apertura dorsal. Esta nueva mutante tiene este fenotipo, e interacciona genéticamente con el gen *Dfos*, de la vía de la cinasa de Jun. Por esta razón, este gen nuevo se llama *amigo de fos (amfos)*, y se mapeó a la región proximal del brazo derecho del cromosoma 3 de *Drosophila*. En el presente trabajo se buscó determinar la existencia de interacción física entre Amfos y Dfos. Estos genes codifican (Dfos) o podrían codificar (Amfos) para factores de transcripción dada su secuencia aminoacídica en la vía de la cinasa de Jun. Clonamos ambos genes en vectores de expresión, los secuenciamos y posteriormente realizamos la síntesis *in vitro* de ambas proteínas marcadas con etiquetas moleculares. Después realizamos experimentos de coimmunoprecipitación y detección de las proteínas por medio de Western Blot con anticuerpos que reconocen las etiquetas. Nuestros resultados sugieren una posible interacción física entre Amfos y Dfos sintetizadas *in vitro*.

ANTECEDENTES

1. Generalidades de *Drosophila melanogaster*.

Drosophila melanogaster, también conocida como mosca de la fruta es el organismo eucarionte pluricelular mejor estudiado actualmente, ya que se ha utilizado en investigación como un organismo modelo para esclarecer muchos procesos biológicos. Entre sus ventajas están: su periodo de vida corto y su tamaño pequeño que permite mantener una gran cantidad de individuos en un espacio reducido, adicional a las múltiples herramientas con que cuenta para hacer análisis genético: la gran colección de alelos mutantes disponibles y la secuencia completa de su genoma.

Además tiene la ventaja de poderse estudiar prácticamente a tres individuos diferentes en un mismo organismo (embrión, larva y adulto), presentes a diferentes tiempos en el ciclo de vida de *Drosophila*. El ciclo de vida comienza cuando los adultos se aparean y ocurre la fecundación del huevo. Esto da paso al desarrollo embrionario, que normalmente dura 24 horas a 25°C y termina con la eclosión de la larva de 1er estadio (este estadio dura un día); después sufre dos mudas para pasar a larva de 2o estadio (un día) y 3er estadio (de dos a tres días). Posteriormente inicia la metamorfosis con la formación de la prepupa y el estadio de pupa (de tres a cuatro días), para convertirse finalmente en un adulto (Figura 1) (Manning, 2003). Este trabajo enfoca su estudio principalmente al estadio embrionario de la mosca de la fruta.

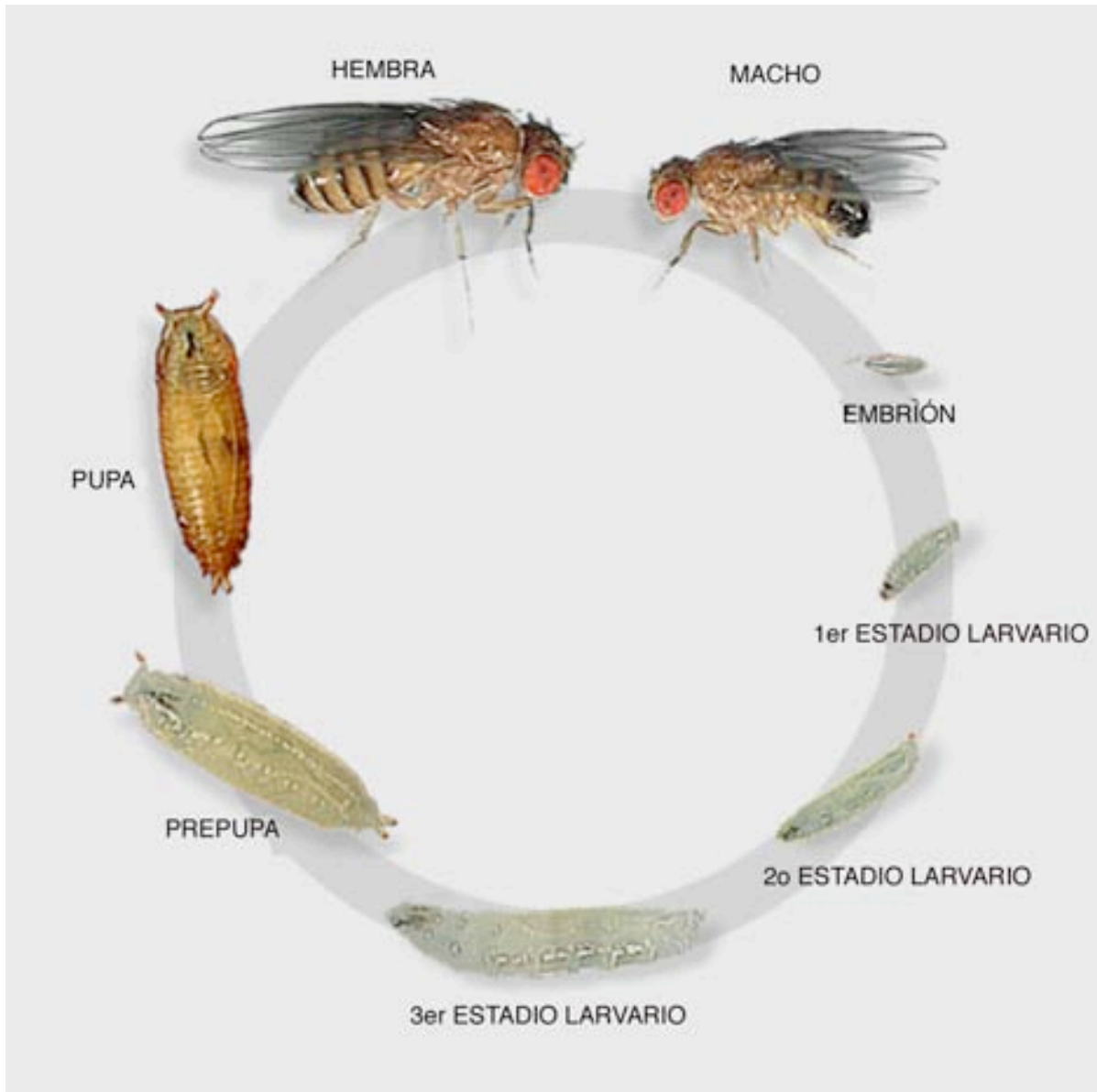


Figura 1. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*. Después de la fertilización del huevo se forma el embrión, que eclosiona en una larva, y esta crece pasando a través de tres diferentes estadios larvarios, hasta convertirse en pupa, en donde sufre una metamorfosis completa para dar origen a una mosca adulta.

2. Embriogénesis.

La embriogénesis comienza con la fecundación del huevo y la fusión de los pronucleos. Después se llevan a cabo divisiones nucleares que van a dar origen al blastodermo sincisial, para posteriormente celularizarse (los núcleos se rodean de membrana plasmática en la periferia del huevo). La formación de las células

ocurre por extensiones de la membrana plasmática que se invagina alrededor de los núcleos en la periferia del embrión en el blastodermo sincisial para dar origen al blastodermo celular, justo antes de la gastrulación (Brody, 1996). En la gastrulación, la formación de las capas germinales ocurre por la invaginación gradual de un bloque de células medio-ventrales, las cuales formarán una estructura tubular en el interior del embrión (mesodermo), con el ectodermo en el exterior. Un grupo de células del polo posterior comienza a moverse en dirección anterior dorsal; éstas células son las células polares, la línea germinal de *Drosophila*. Con ellas se invagina el endodermo posterior. El endodermo anterior se invagina a partir de células anteriores, y ambas porciones del endodermo se encuentran durante la organogénesis a nivel medio del embrión para dar origen al aparato digestivo. Este movimiento inicia la elongación de la banda germinal constituida por mesodermo (invaginado) y ectodermo. Después de la elongación máxima de la banda germinal ésta se retrae, al tiempo que se inicia la neurulación. La elongación y retracción de la banda germinal llevan al embrión a tener una apertura en la epidermis dorsal, sólo cubierta por la amnioserosa. Durante la elongación – retracción de la banda germinal se lleva a cabo la organogénesis general. Subsecuentemente, el proceso del cerrado dorsal lleva a un alargamiento de las placas epidérmicas laterales sobre la amnioserosa para cubrir el embrión en la parte dorsal. Estas células de la epidermis se unirán en la línea media dorsal, y la amnioserosa se absorbe. Este cambio de forma se inicia en la fila de células epidérmicas más dorsales, llamadas, células de “*leading-edge*” (Campos-Ortega y Hartenstein, 1997), pero involucra también a células epiteliales más laterales. Después ocurre la involución de la cabeza y la deposición de la cutícula, para finalizar el desarrollo embrionario (figura 2).






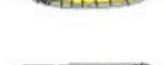

	No. de Etapa	Tiempo	Eventos
	1 - 4	0:00 - 2:10 h	Divisiones del Blastodermo
	5	2:10 - 2:50 h	Blastodermo Celular
	6 - 7	2:50 - 3:10 h	Gastrulación
	8 - 11	3:10 - 7:20 h	Elongación de la banda germinal
	12 - 13	7:20 - 10:20 h	Retracción de la banda germinal
	14 - 15	10:20 - 13:00 h	Involución de la cabeza y cerrado dorsal
	16 - 17	13:00 - 22:00 h	Diferenciación

Figura 2. Estadios de desarrollo embrionario de *D. melanogaster*. Embriones en vista lateral, orientados dorsalmente hacia arriba y anteriormente a la izquierda. Endodermo (verde), mesodermo (rojo) y sistema nervioso (amarillo) (modificado de Campos-Ortega y Hartenstein, 1997).

3. Transducción de señales y vías tipo MAPK.

Procesos como el cerrado dorsal son el resultado de muchos fenómenos de transducción de señales que involucran vías de señalización intercelulares. De entre estas están las MAPK (*mitogen-activated protein kinase* (proteína cinasa activada por mitógenos)) (Mathews, 1998), que se dividen en tres subfamilias. De entre éstas subfamilias de las MAPK están las ERKs que son activadas de manera dependiente de Ras y a través de receptores de tirosinas cinasas. La subfamilia de la cinasa p38 está activada generalmente por interleucina 1 β y algunas toxinas, y la subfamilia de las JNKs por estímulos como la luz UV, estrés oxidativo y citocinas inductoras de muerte celular, entre otras.

Las vías de tipo MAPK están activadas a través de un ligando que se une a su receptor de membrana de tipo tirosina cinasa, y al hacerlo dimeriza y activa al

receptor y a la vía. Los receptores de factores de crecimiento con actividad de tirosina cinasa se fosforilan a sí mismos de manera cruzada. En el estado fosforilado, cada receptor interacciona con una o más proteínas que se unen a sus sitios fosforilados, y entre ellas, a algunas que a su vez activan a proteínas tipo Ras mediante la estimulación del intercambio de GDP por GTP. Unas proteínas denominadas GAP (Proteínas Activadoras de GTPasa) actúan para acelerar la actividad intrínseca de GTPasa de proteínas tipo Ras, y terminar con la señalización. Cuando esta proteína tipo Ras tiene unido GTP se activa y activa a la MAPKKKK. Posteriormente, se inicia una serie de fosforilaciones en cascada a partir de la MAPKKKK, activando ésta a la MAPKKK, ésta a su vez a MAPKK, y finalmente la MAPKK fosforila y así activa a la MAPK. Ésta última, activada; se trasloca al núcleo y regula, por fosforilación, a factores de transcripción que inducirán la expresión de genes de respuesta inmediata (Gomperts y col., 2003; Harden, 2002) (figura 3).

Las proteínas tipo Ras juegan un papel central en esta vía de señalización intracelular conservada a lo largo de la evolución, porque dirige señales extracelulares hacia el núcleo, en donde se activan genes específicos de respuesta inmediata para el crecimiento, la división y la diferenciación celular. En *Drosophila* estas vías controlan aspectos del crecimiento y el desarrollo embrionario (Mathews, 1998).

4. Vía de la cinasa de Jun (JNK).

JNK pertenece a la superfamilia de proteínas MAPK y fue inicialmente descubierta en cultivo de tejidos de vertebrados y en levaduras como un mediador de la respuesta al estrés celular. En respuesta a la activación de esta cascada, JNK fosforila factores de transcripción tales como Jun (Zeitlinger y col., 1997).

Una variedad de estímulos relacionados al estrés, así como también ciertas citocinas, pueden activar la vía JNK. Esta vía responde de diversas maneras a esta activación regulando diferentes procesos, como la regulación de la muerte celular programada o apoptosis (Igaki y col., 2002). En *Drosophila*, la vía JNK se requiere durante la embriogénesis para llevar a cabo el cerrado dorsal. En este

modelo se ha caracterizado a un homólogo de la JNKKKK, llamada *misshapen*, *msn* (Su y col., 1998); a un homólogo de la JNKKK de tipo *mixed lineage kinase* (linaje mezclado de cinasas), abreviado como MLK llamada *slipper*, *slpr* (Stronach y Perrimon, 2002), una JNKK, llamada *hemipterous*, *hep* y una JNK, llamada *basket*, *bsk* (Riesgo-Escovar y col., 1996). Esta vía activa al homólogo en la mosca del factor de transcripción con dominio de zipper de leucina *Djun* (Figura 4) (Zhang y col., 1990).

La vía de transducción de señales activada por el gen decapentaplegic (*dpp*), el homólogo de TGF-beta en *Drosophila*, también es esencial en el cerrado dorsal; mutaciones en *thickveins*, *tkv* y *punt*, *put*, los cuales codifican para receptores de membrana de Dpp (Affolter y col., 1994), tienen fenotipos de deficiencia de cerrado dorsal, y cuando se expresa *tkv* activo se rescata parcialmente el fenotipo mutante de genes de la vía JNK. Esto ha llevado a concluir que la activación de Jun por JNK, en las células del *leading-edge* del epitelio lateral durante el cerrado dorsal, regula a *dpp*, a través de una activación transcripcional directa del gen *dpp* por *Djun* y *Dfos*. Este último (*Dfos*), es otro factor de transcripción con dominio de zipper de leucina (Riesgo-Escovar y Hafen, 1997).

Para activar la transcripción de genes blanco, Jun y Fos se heterodimerizan y se unen a sitios AP-1 en el DNA. Para esta interacción proteína-DNA, Jun y Fos se dimerizan a través del dominio de zipper de leucina, resultando un hetero-dímero que consiste de una molécula de Jun y otra molécula de Fos. Jun y Fos pueden formar también homo-dímeros, al menos *in vitro*. Sin embargo, dado que tanto Jun como Fos se requieren para el cerrado dorsal lo más probable es que sean heterodímeros Jun/Fos los que actúen durante el cerrado dorsal. El dominio zipper de leucina contiene cadenas de 35 aminoácidos en conformación de α -hélice en las cuales la leucina (Leu) se encuentra repetida en intervalos de 7 aminoácidos.

El dominio que se une al DNA en estos factores de transcripción (Jun, Fos) se encuentra en los primeros 30 aminoácidos a partir del N-terminal. Este dominio es básico y forma una α -hélice cuando la proteína se enlaza al DNA. El dominio cierre de leucina mantiene unidas a dos proteínas que enlazan DNA juntas, permitiendo a las bases de las hélices N-terminal interactuar con el surco mayor

del DNA de una manera base-específica. El hetero-dímero Jun-Fos es más estable que el homo-dímero Jun (Zeitlinger y col.,1997).

El fenotipo mutante de apertura dorsal es consecuencia de la ausencia de la elongación de las células en la epidermis lateral o la falta de permanencia del estado alargado de las mismas. Alelos mutantes de todos los genes conocidos de la vía de la cinasa de Jun presentan este fenotipo característico.

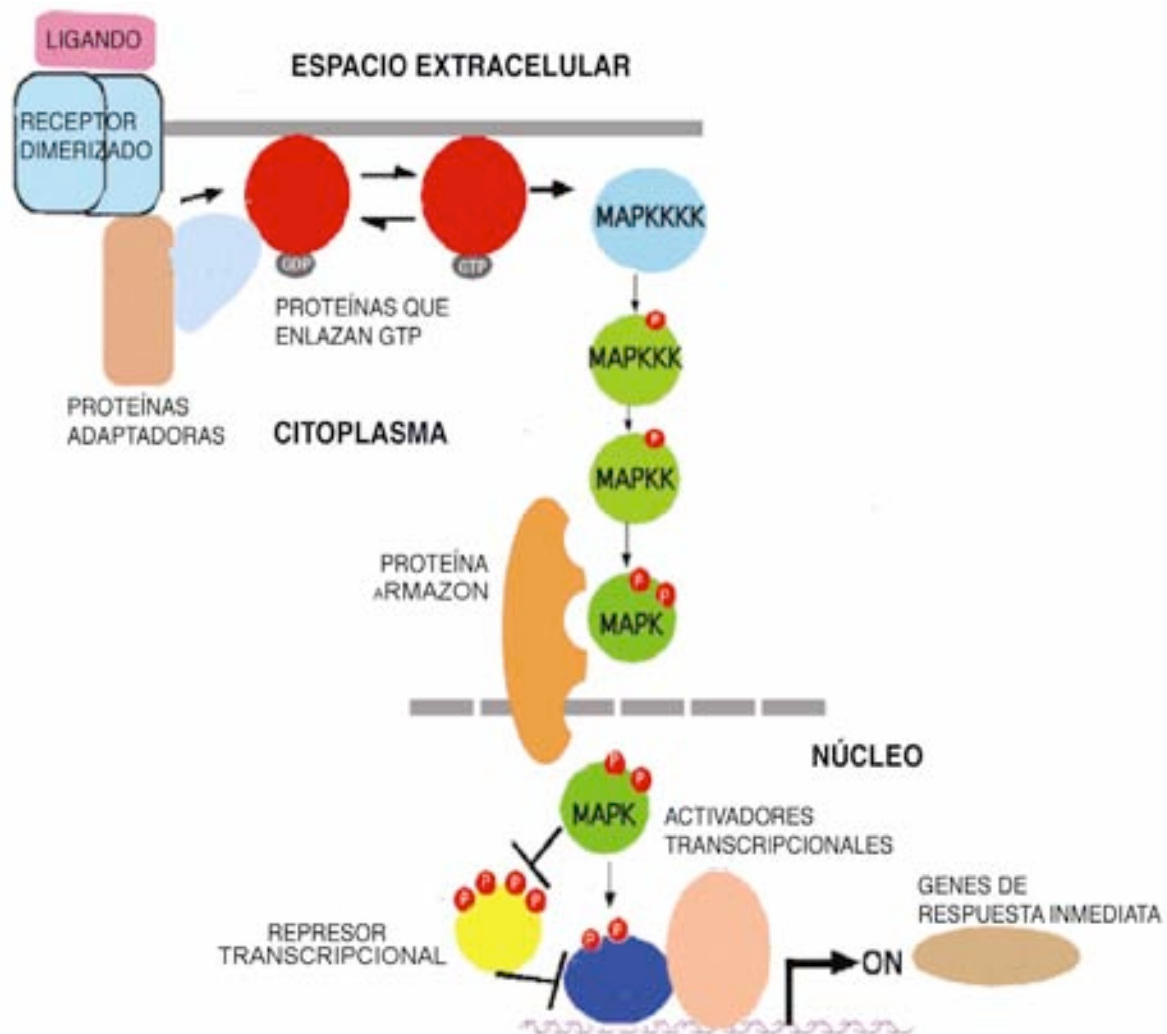


Figura 3. Vía de señalización de tipo MAPK. La vía de señalización de tipo MAPK dirige la señal extracelular al núcleo a través de una serie de fosforilaciones en cascada, que activan a factores de transcripción que regulan la transcripción de genes de respuesta inmediata (Riesgo-Escovar, comunicación personal).

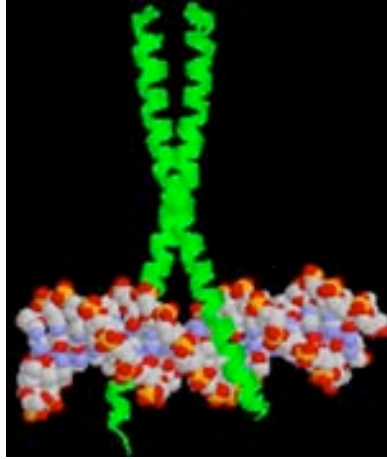


Figura 4. Motivo de unión a DNA tipo zipper de leucina. Jun y Fos forman un hetero-dímero, unidos a través de los dominios zipper de leucina; la parte básica de las hélices se unen al DNA (Ellenberger T.E. y col.,1992).

5. Factores de transcripción.

Una forma de entender la función de proteínas que actúan como factores de transcripción es su capacidad de unirse al DNA en una secuencia específica. Los dominios de unión al DNA de estas proteínas contienen motivos estructurales que permiten su unión al DNA. Los factores de transcripción son moduladores por naturaleza y generalmente poseen dominios independientes de unión a DNA, dominios de asociación, y sitios de unión a ligandos, lo que les permite activar o reprimir la transcripción (Coffin J. y col., 1997).

En general, se ha visto que estos factores se componen de dos dominios: una región de la proteína que especifica la unión a DNA y otra región que activa o inhibe la transcripción por interacción con otros componentes de la maquinaria transcripcional. La caracterización molecular ha revelado que los dominios de unión al DNA de muchas de estas proteínas están generalmente relacionadas unas con otras y pertenecen a un pequeño grupo de dominios proteicos. Dentro de los motivos de unión a DNA más estudiados están: a) dedos de zinc, que contienen residuos repetidos de cisteínas e histidinas que unen iones de zinc y se pliegan formando un loop (dedo de zinc) que se une al DNA, b) Motivo de unión

hélice-giro-hélice, donde una de las hélices se une al DNA, mientras que la otra se une al complejo de transcripción estabilizando la interacción, c) Las proteínas zipper que se unen al DNA con el “scissors grip”. Las proteínas con zipper de leucina y hélice-loop-hélice tienen dominios de unión a DNA formados por dímeros. Por otra parte hay factores de transcripción cuyos dominios de unión al DNA no han sido bien caracterizados.

Hay dominios de activación de la transcripción que tienen naturaleza acídica, que son residuos ricos en cargas negativas como ácido aspártico y glutámico. Se piensa que estos dominios pueden estimular la transcripción por interacción con factores generales de la transcripción, facilitando el ensamble del complejo de transcripción sobre el promotor (Cooper, G.M., 2000). La forma en que los activadores acídicos interactúan con sus blancos es variada y en ocasiones depende de la formación de complejos proteína-DNA, en otras ocasiones de la interacción entre proteínas globulares ó de la unión de cofactores. En estudios donde se han eliminado residuos acídicos de este tipo de proteínas se ha observado que la actividad transcripcional decrece abruptamente (Hahn S., 1993).

6. Dfos

Dfos es el homólogo del proto-oncogen *fos* en *Drosophila melanogaster* (Rousseau y Goldstein, 2001). El locus de *kayak* (*kay*) está mapeado en la posición 99B9-99B10, y es el locus del gen *Dfos*. Los dos alelos mejor caracterizados en la literatura son *kay*¹ y *kay*². El primero es un alelo nulo y el segundo es un alelo hipomorfo. Los embriones homocigotos mutantes de ambos alelos presentan deficiencia en el cerrado dorsal, y en estos embriones, cuando se expresa *Dfos* ectópicamente a partir de un transgen en el ectodermo, se revierte el fenotipo mutante (Riesgo-Escovar y Hafen, 1997).

La proteína *Dfos* se encuentra en niveles altos en la amnioserosa y la epidermis lateral durante el proceso de cerrado dorsal (figura 5). Al inicio del cerrado dorsal la transcripción de *Dfos* se eleva en el núcleo de las células del *leading edge* ya

que éstas inician el alargamiento y después también en las células más ventrales (Zeitlinger y col.,1997).

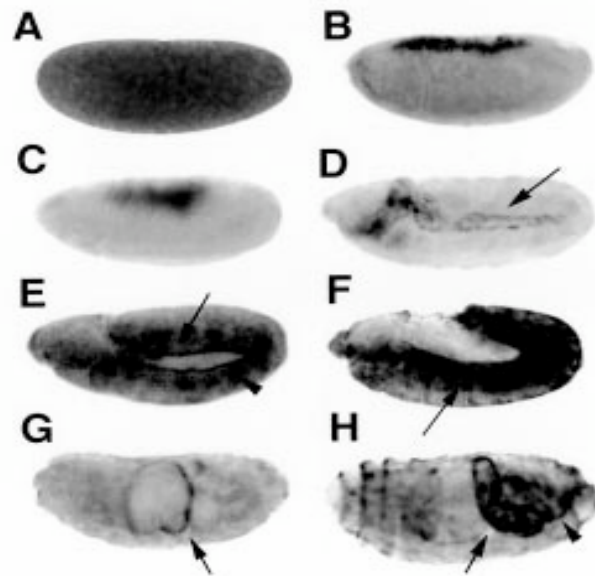


Figura 5. Expresión de *Dfos* en embriones silvestres. Hibridación *in situ* en embriones silvestres en diferentes etapas de la embriogénesis. Los embriones están colocados con la parte anterior hacia la izquierda y dorsal arriba de A-F, H y G con la parte dorsal hacia el frente. A. Contribución materna. B. Expresión en las células más dorsales. C. Expresión en las células *anlagen* de amnioserosa y epitelio lateral. D. Expresión en las células de la amnioserosa. E. Expresión en las células del epitelio lateral y principalmente en las células de *leading edge*. F. Etapa más avanzada con un patrón parecido al de (E). G. Tinción en una porción del endodermo, el intestino medio. H. Tinción en el intestino posterior (Riesgo-Escovar y Hafen, 1997).

7. Amigo de fos (*amfos*)

En el laboratorio se caracterizó una mutante nueva de cerrado dorsal, *amigo de fos* (*amfos*). El nombre *amfos* proviene del hecho de que mutaciones en este gen presentan el fenómeno de no complementación no alélica, o letalidad sintética con alelos del gen *Dfos* (figura 6). Esto quiere decir que alelos de dos genes distintos no complementan uno al otro, aún cuando esté presente una copia silvestre de cada gen. A este fenómeno también se le conoce como no complementación de segundo sitio, no complementación extragénica y no complementación transheterocigota. Este fenómeno está reportado en un gran número de procesos

biológicos como la formación de la cutícula, regulación transcripcional, crecimiento neuronal y ovogénesis. La no complementación no alélica frecuentemente se interpreta como una significativa interacción física entre los productos de los genes (Yook K.J. y col., 2001).

El gen *amfos* codifica para una proteína hipotética de 608 aminoácidos, con un dominio conservado de aproximadamente 200 aminoácidos (Figura 7). Este dominio conservado tiene homología con proteínas predichas (aunque con función aún desconocida) de humanos, ratones y levaduras, por lo que es posible que proteínas con funciones semejantes existan en otros organismos. Sin embargo, se desconoce la función de este dominio y de la proteína. Se han caracterizado varios alelos de este gen, y todos ellos son homocigotos letales en la etapa embrionaria.

Alelos mutantes de *Dfos* presentan fenotipos embrionarios letales de apertura dorsal. Lo anterior sugiere también que este nuevo gen, *amfos*, es un gen que participa en la vía de la cinasa de Jun, posiblemente regulando y/o interaccionando con *Dfos* (Riesgo-Escovar, datos no publicados). El dominio ácido de Amfos podría tener una función como activador de la transcripción, o como proteína de anclaje, o como armazón del complejo de transcripción.

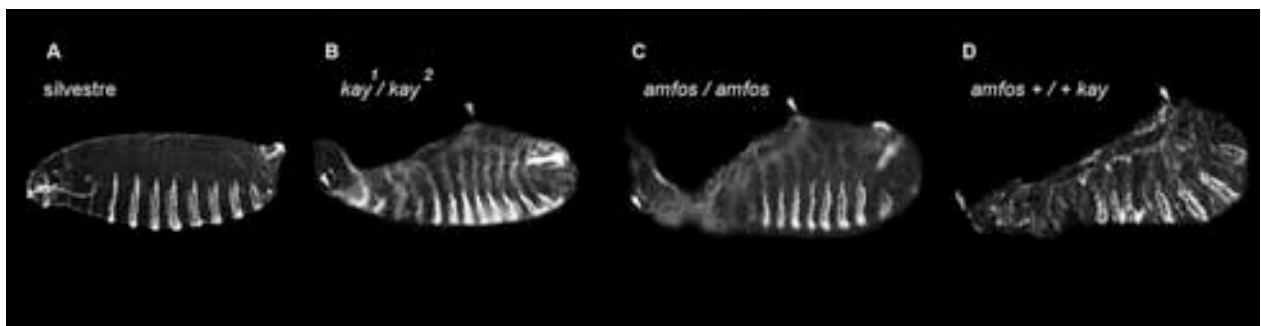


Figura 6. Interacción genética entre *Dfos* y *amfos*. Cutículas de embriones vistas por microscopia de campo oscuro: A. Embrión silvestre. B. Embrión con combinación heteroalélica para alelos mutantes de *Dfos* (kay^1 es un alelo con actividad nula, kay^2 es un alelo con actividad hipomórfica de *Dfos*). C. Embrión homocigoto para el gen *amfos*. D. Embrión doble heterocigoto para los genes *Dfos* y *amfos*. Las puntas de flecha señalan los límites de la apertura dorsal.

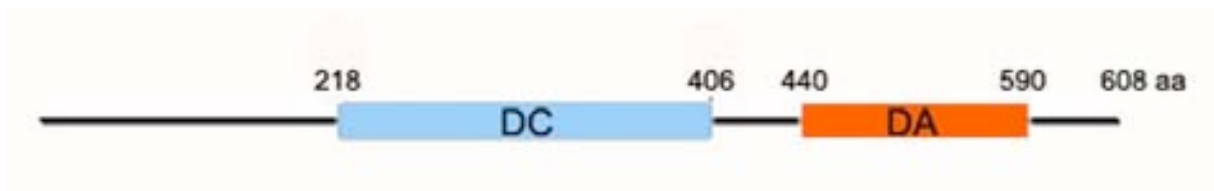


Figura 7. Esquema de la proteína Amfos. El gen *amfos* codifica para una proteína hipotética de 608 aa, con un dominio conservado (DC) de 188 aa con homología en otras especies, pero con función desconocida y un dominio ácido (DA) de 90 aa. Este dominio tiene un porcentaje alto de ácido aspártico.

Se mandó sintetizar un péptido (en Sigma-Aldrich) a partir de la secuencia del cDNA de *amfos*, y se usó para generar y purificar anticuerpos policlonales en conejo. Estos anticuerpos reconocen una banda en homogenados de *Drosophila* (figura 8) de peso molecular consistente con el peso predicho para el producto proteico del cDNA de *amfos*. También se han generado sondas de RNA antisentido marcadas con digoxigenina a partir del cDNA de *amfos* para poder realizar experimentos de hibridación *in situ*.

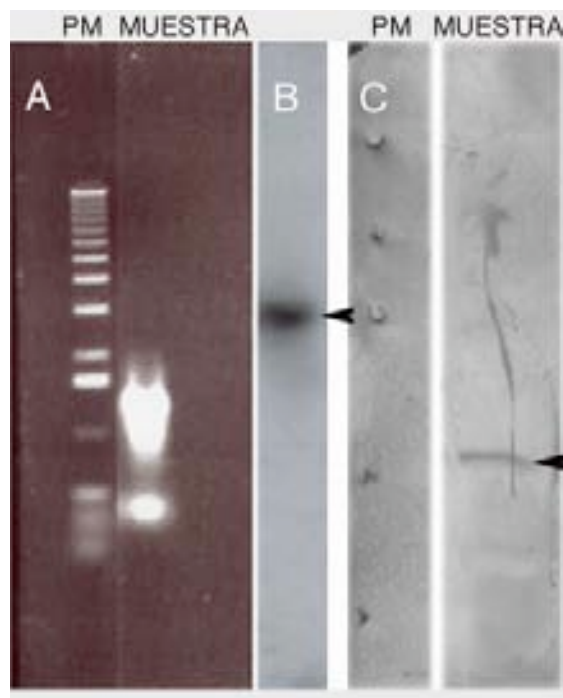


Figura 8. Northern blot y Western blot de Amfos. A. Muestra la electroforesis del RNA extraído de un homogenado de *Drosophila*. B. La punta de flecha muestra una sola banda para la sonda en el análisis de Northern blot. C. La punta de flecha muestra una sola banda que es reconocida por el anticuerpo anti-Amfos en el análisis de Western blot. Los pesos moleculares a la izquierda son de arriba abajo, 177, 113, 81, 60 y 47 kD.

Resultados recientes muestran que la distribución del mRNA tanto de *amfos* como de *Dfos* es muy dinámica durante toda la embriogénesis. Se observa expresión de *amfos* desde etapas embrionarias muy tempranas, en el inicio de la gastrulación, en células de las tres capas germinales. Después, durante la extensión de la banda germinal, en el tejido que conforma la banda germinal y en las células de la amioserosa. Cuando se ha completado la extensión de la banda germinal, nuevamente la distribución cambia y la expresión se da en las células del ectodermo incluyendo las células de *leading edge*. Durante el cerrado dorsal, este gen se expresa en las células del epitelio lateral con una distribución de tipo segmentada, sugiriendo su participación en el cambio de forma celular del epitelio (figura 9).

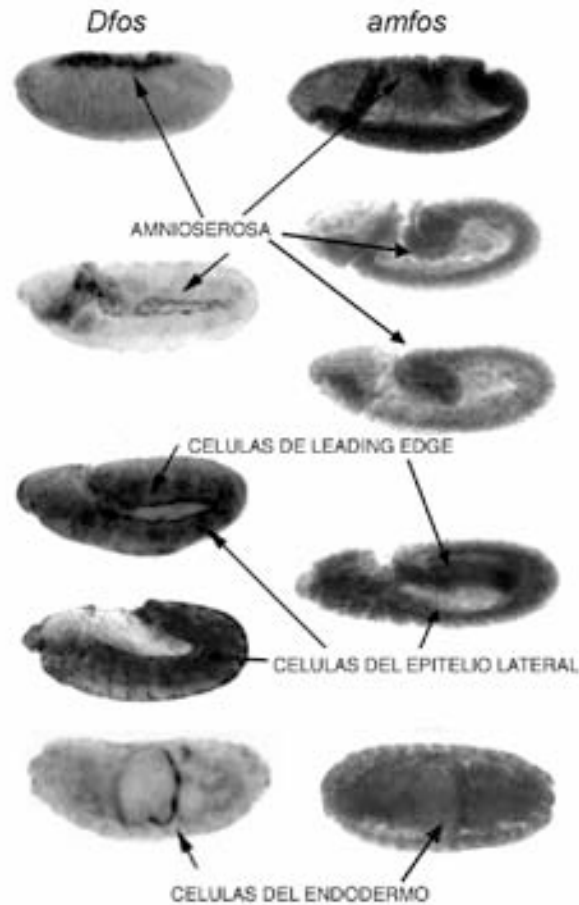


Figura 9. Expresión del transcrito de *Dfos* y *amfos*. Hibridación *in situ* en embriones silvestres. Similitud de la expresión del mRNA de *amfos* (columna derecha) y *Dfos* (columna izquierda).

Actualmente se ha encontrado que existe una colocalización de las dos proteínas (Amfos y Dfos) por experimentos de doble tinción con anticuerpos fluorescentes. Se ha observado que las marcas colocalizan en el citoplasma de las células del epitelio lateral y en la amnioserosa antes del proceso de cerrado dorsal. Cuando el proceso de cerrado dorsal se ha activado se observa que ahora las proteínas colocalizan en el núcleo de estos dos tejidos (figura 10), indicando que estas proteínas pudieran estar interaccionando ya sea formando heterodímeros o macrocomplejos con otras proteínas. También se encontró que una es dependiente de la otra para su transporte al núcleo (Riesgo-Escovar, 2005, datos no publicados).

Colocalización de Dfos y Amfos

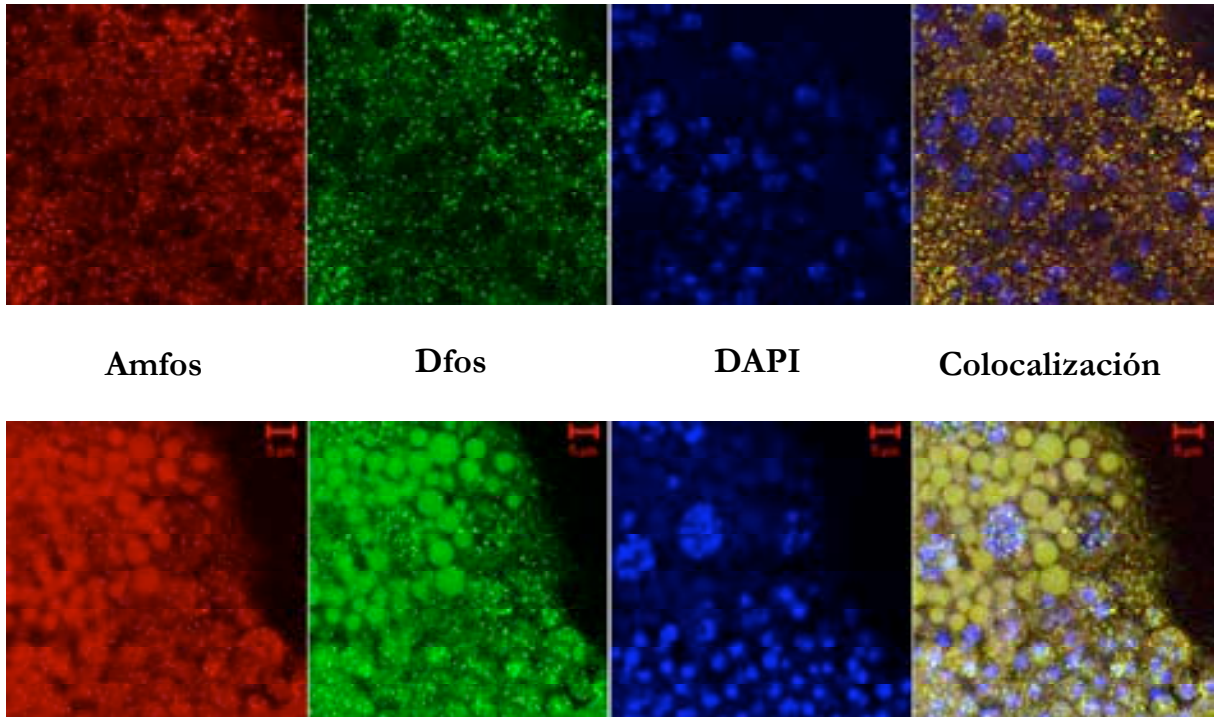


Figura 10. Colocalización de Amfos y Dfos. Imágenes de microscopía confocal, utilizando anticuerpos policlonales acoplados a fluoróforos. Se muestra la tinción para Amfos (rojo), Dfos (verde), DAPI (azul) que tiñe el DNA en el núcleo y el último recuadro muestra la colocalización de las dos proteínas. En el panel de arriba se muestra la colocalización en el citoplasma de las células del epitelio lateral. En el panel inferior hay colocalización en el núcleo tanto de las células del epitelio lateral (núcleos pequeños) como en las de la amnioserosa (núcleos grandes) (Riesgo-Escovar, 2005, datos no publicados).

HIPÓTESIS

El gen *amfos* (*amigo de fos*) de *Drosophila melanogaster* participa en la vía de transducción de la cinasa de Jun regulando y/o interaccionando físicamente con *Dfos* en los procesos de cerrado dorsal.

OBJETIVOS

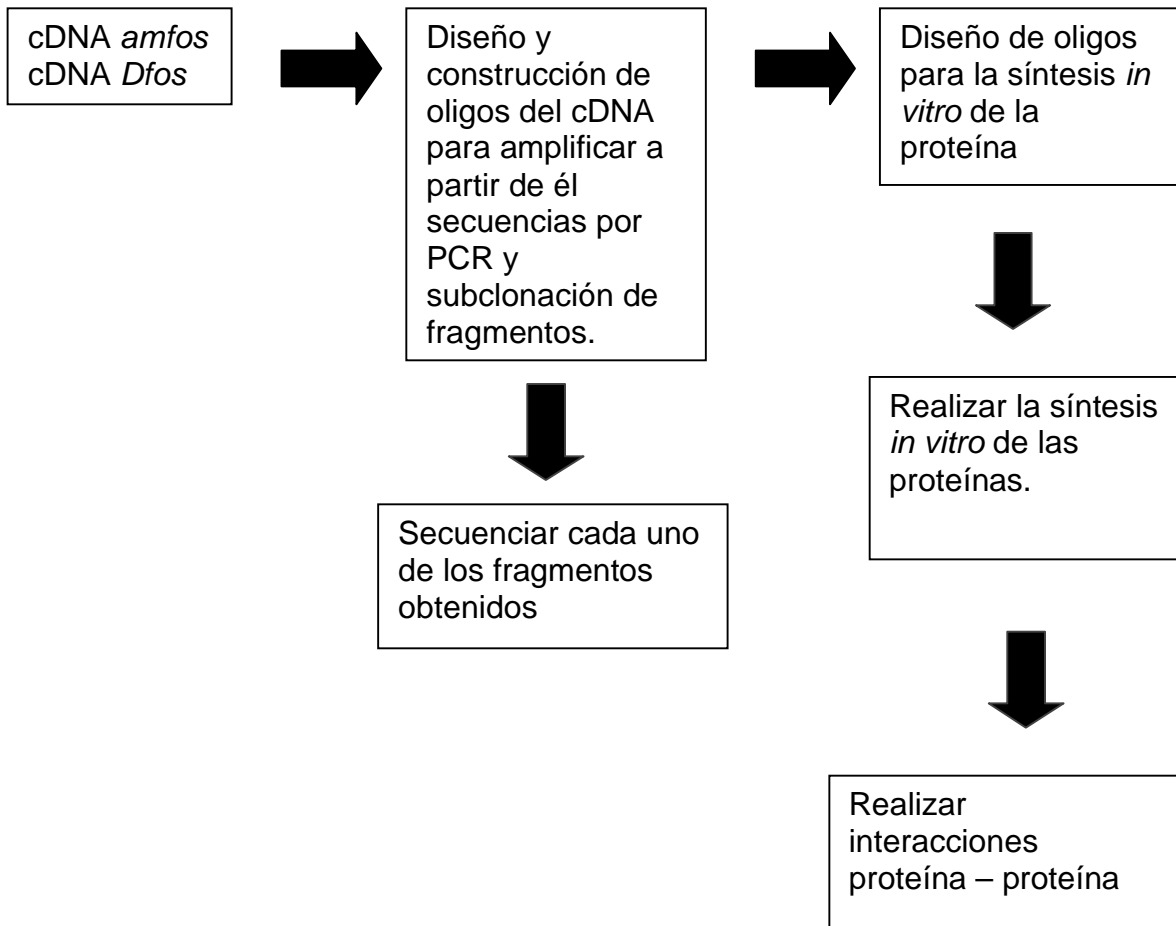
General

Determinar la interacción de los productos proteicos de los genes *amfos* y *Dfos* de *Drosophila melanogaster*.

Específicos

- Síntesis *in vitro* de las proteínas Amfos y Dfos con etiquetas moleculares.
- Determinar interacciones proteína – proteína de Amfos y Dfos mediante ensayos de coinmunoprecipitación.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



MATERIAL Y MÉTODOS

1. Diseño de oligonucleótidos

A partir del cDNA se hizo el diseño de oligonucleótidos para amplificar la secuencia correspondiente al marco de lectura abierto para cada uno de los genes.

2. Reacción en cadena de la polimerasa, PCR.

Para una reacción de 20 μ l, se adicionan 2 μ l (aproximadamente 500 ng) del plásmido que contiene el cDNA de *amfos*, con 0.25 μ l de dNTPs 10 mM de concentración inicial para obtener una concentración final de 0.125 mM, 1 μ l de cada uno de los oligonucleótidos a una concentración de 20 pmol inicial para obtener una concentración final de 1 pmol/ μ l, 2 μ l del buffer Taq 10 X sin Mg^{2+} , 0.6 μ l $MgCl_2$ 25 mM (0.75 mM de concentración final), 0.5 μ l Taq polimerasa y 12.25 μ l de H_2O para PCR.

Después de la reacción se separa y se observa el o los productos de amplificación mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8%, para comprobar si se han amplificado correctamente los fragmentos. Estos fragmentos se ligan al vector y se transforman en bacterias competentes.

3. Ligación del vector.

Después de determinar el volumen a utilizar del amplicón purificado se hace la mezcla de ligación. En un tubo se adicionan 125 ng (normalmente 3 μ l) del fragmento de interés, 50 ng del vector (pGEM-T Easy), 5 μ l del amortiguador de ligación (2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase), 1 μ l de T4 DNA ligasa (3u/ μ l) (Promega) y H_2O para completar 10 μ l finales. Se incuban a 16 °C toda la noche.

4. Transformación de bacterias.

La transformación se hace en bacterias *E. coli* competentes como se menciona en Sambrook J. y col., 1989. Se adicionan 5 μ l de la ligación a las células competentes y se hace la transformación por el método de choque térmico

(Sambrook J. y col., 1989). Se agita la mezcla suavemente y se pone en hielo 30 minutos, se calienta a 42°C durante 90 segundos sin agitar. Se ponen en hielo por 2 minutos y se adicionan 400 µl de medio LB y se incuban a 37°C por una hora con agitación. Se siembran las bacterias en placas de agar con el antibiótico cuya resistencia está codificada en el plásmido transformado y se incuban a 37°C toda la noche. Las bacterias que, en principio, incorporaron el plásmido pueden crecer en el medio selectivo, de manera que al día siguiente se toman algunas colonias y se crecen en un medio líquido con el antibiótico usado en las placas de agar para seleccionar colonias. El plásmido transformado se purifica a través de minipreparaciones utilizando el método de lisis alcalina (High Pure Plasmid Isolation Kit, Boehringer Mannheim), para su posterior secuenciación.

5. Síntesis *in vitro*.

Los productos de PCR obtenidos se utilizaron como templados para la generación de proteínas de Amfos y Dfos mediante un estuche comercial, un sistema acoplado de transcripción-traducción *in vitro* RTS 100 *E. coli* (Rapid Translation System: Roche). Para esto se requiere de la generación de templados lineales por PCR. La generación de estos templados requiere de dos reacciones de PCR. En una primera reacción se amplifican las regiones que se desean a partir de la secuencia de DNA inicial. En la segunda reacción se agregan los elementos regulatorios necesarios para la expresión de la proteína (figura 11).

Posterior a la segunda PCR se toman 10 µl de producto final de la reacción y se mezclan con 40 µl de la premezcla de reacción RTS 100 *E. coli* HY, que es un extracto bacteriano con la maquinaria correspondiente para la transcripción y traducción *in vitro*. Esta mezcla se coloca en un equipo para la expresión de proteínas libre de células (RTS 100 Proteomaster) y se incuba en las siguientes condiciones: 4hr, 30°C y 200 rpm. Terminada la reacción se hace un Western Blot con el extracto.

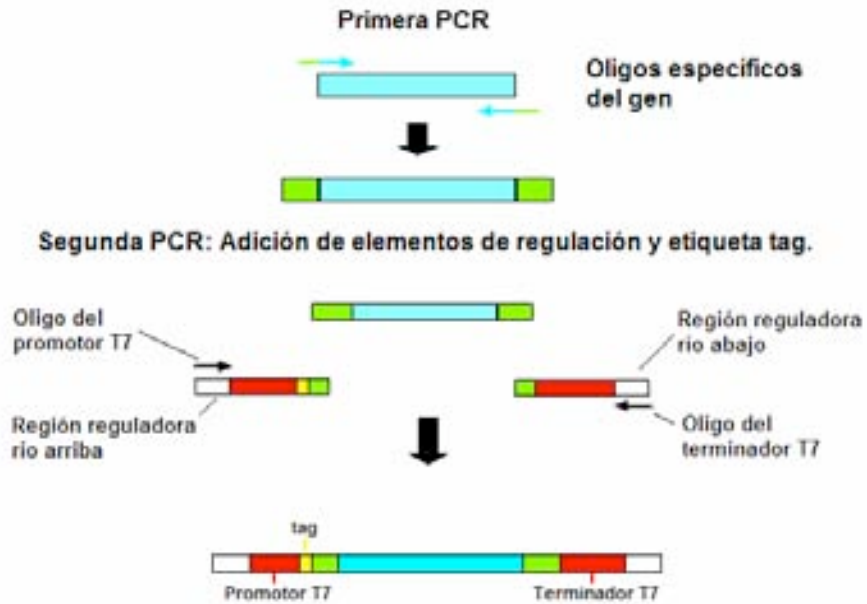


Figura 11. Preparación del templado lineal por PCR, marcado con un sitio promotor y un terminador, así como una etiqueta molecular (tag).

6. Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE)

Para un gel de poliacrilamida al 10%, se mezclan 5 ml de agua desionizada, 2.5 ml de buffer "lower tris 4x" pH = 8.8 (36.3g Tris-Base, 8ml de SDS 10%, agua desionizada a 200 ml), 2.5 ml de una mezcla de gel resolutive que contiene acrilamida/ bisacrilamida (29:1) al 40%, 5 µl de TEMED, 50 µl de persulfato de amonio (0.1g de APS en 1 ml de agua) y se vierte esta mezcla entre dos placas de vidrio. Se deja polimerizar aproximadamente 30 min. Posteriormente se preparan 5 ml de un gel preparativo. El gel preparativo se hace mezclando 3.25 ml de agua desionizada, 1.25 ml de buffer "upper tris 4x" (6.06g de Tris-Base, 8ml de SDS 10%, agua desionizada a 100 ml) y se ajusta a pH 6.8 con HCl, junto con una pequeña cantidad de azul de bromofenol), 0.5 ml de la mezcla de acrilamida/ bisacrilamida (29:1) al 40%, 7 µl de TEMED y 50 µl de persulfato de amonio. Esta mezcla se vierte entre las dos placas de vidrio arriba de la anterior ya polimerizada, se coloca el peine y se deja polimerizar. Ya polimerizado el gel, se

coloca en el equipo de electroforesis y se agrega buffer de corrida (3.03 g de Trizma base, 14.4 g de glicina y 1 g de SDS en un litro de agua desionizada).

7. Preparación de las muestras.

Se agrega 4µl de buffer de muestra Laemli por cada 20 µl de muestra de proteínas y se calientan a 92° C por 3 minutos. El buffer de Laemli 2x es 130 mM de Tris-HCl, pH 8.0, 20% (volumen/volumen) de glicerol, 4.6% (peso/volumen) de SDS, 0.02% de azul de bromofenol y 2% de DTT. Después, se carga la muestra en el gel. En un carril se cargan proteínas estándares preteñidas de pesos moleculares conocidos y se realiza la migración electroforética de las proteínas a 200 mV. Terminada la electroforesis se sacan las placas de vidrio del equipo y se separa el gel colocándolo en buffer de transferencia (14.4g glicina, 3g Tris, 900 ml agua destilada y 100 ml metanol), se corta una membrana de nitrocelulosa de 0.2 µm de tamaño del poro, del tamaño del gel y se transfieren las proteínas a la membrana en un equipo para transferencias semi-secas de BioRad por media hora a 15 mV. La membrana se tiñe con reactivo de Ponceau de uno a dos minutos para corroborar la transferencia, y se destiñe con agua desionizada. Si la transferencia es correcta, la membrana se bloquea por 30 minutos en una solución de TBS-Tween al 0.05% (TBST) adicionada de 5% de leche libre de grasa (Biorad).

8. Western blot.

Posterior a esto la membrana se incuba en una solución de TBST con leche al 1% con el primer anticuerpo diluido de 1:200 a 1:400 toda la noche a 4° C o 1 hr a temperatura ambiente. Se lava tres veces con TBST (5 minutos por cada lavado) y se incuba por 45 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario acoplado a fosfatasa alcalina, a una concentración 1:2000 en TBST. Se lava la membrana tres veces con TBST (5 min cada lavado). Después se revela la membrana con el sustrato NBT-BCIP en solución reveladora AP (NaCl 100mM, MgCl₂ 50 mM, Tris-HCl, 100 mM, pH 9.5) y se incuba en la oscuridad. Se monitorea el desarrollo de la reacción cada 5 minutos. La reacción se detiene lavando con agua desionizada y se seca la membrana con papel filtro. Se toman fotografías.

9. Coinmunoprecipitación.

Se recolectan embriones de una placa de puestas y se lavan con agua desionizada, posteriormente se lavan con 250 μ l de buffer RIPA (1% Nonidet P-40, 0.5% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS en PBS 1x) y se hace un homogenado añadiendo 40 μ l de una mezcla de inhibidores de proteasas 25x y se completa a un volumen de 1 ml. Este lisado se guarda en hielo.

Se toman 25 μ l de perlas de proteína A-sefarosa de una suspensión homogénea y se lava 3 veces con buffer RIPA, un lavado con 250 μ l y 2 con 100 μ l. En cada lavado se centrifugan las perlas durante 1 minuto a 2000 rpm a 4°C, dejándolas en el volumen inicial de 25 μ l.

El lisado se centrifuga a 13000 rpm durante 1 minuto y todo el sobrenadante se pasa al tubo con perlas de sefarosa, se añaden 20 μ l de proteína sintetizada *in vitro* (mezcla del extracto de *E. coli* y proteína sintetizada), 5 μ l de anticuerpo que reconoce a la proteína sintetizada *in vitro*. La mezcla se incuba a 4°C en el cuarto frío durante dos horas o toda la noche en rotación.

La mezcla se centrifuga 2 minutos a 2000 rpm a 4°C, se retira el sobrenadante y se lava 3 veces con buffer RIPA (2 veces con 250 μ l y 1 vez con 150 μ l), se centrifuga a 2000 rpm durante 1 minuto por lavado. Después se elimina el sobrenadante cuidando de dejar aproximadamente 40 μ l de buffer. Se agregan 9 μ l de buffer de carga para proteínas con β -mercaptoetanol y se desnaturaliza a 92°C por 3 minutos. Esto se separa por pesos en un gel SDS – PAGE al 10%. El gel se revela por tinción argéntica o Western blot.

10. Tinción con azul de Coomassie.

Se coloca el gel en un recipiente limpio y se añade una solución de azul de Coomassie (0.1% azul de Coomassie, 40% metanol, 10% ácido acético, agua) que cubra el gel completamente y se mantiene en agitación por media hora o hasta que el gel adquiera un color azul intenso.

Posteriormente se quita el colorante y se agrega la solución de desteñido (40% metanol, 10% ácido acético, agua) hasta que el gel se aclare y sólo se observen las bandas.

Se seca el gel para su análisis.

11. Tinción con plata.

Después de separar las proteínas, colocar el gel en un recipiente limpio y agitar durante todo el proceso.

Solución	Tiempo
50% Metanol, 12% TCA y 2% CuCl ₂	20 min
Solución A (Etanol 10%, ácido acético 5%)	10 min
KMnO ₄ 0.005%	10 min
Solución A	10 min
Etanol 10%	10 min
Agua	10 min
AgNO ₃ 0.1%	10 min
Agua	20 segundos
K ₂ CO ₃ 10%	1 min
K ₂ CO ₃ 2%, formaldehído 0.01%	Hasta que aparezcan las bandas
Solución A	2 min

El gel se puede dejar en agua hasta que se vaya a secar. Se toman fotografías y se analiza.

RESULTADOS

Para la síntesis *in vitro* de la proteína Amfos se hizo el diseño de un par de oligonucleótidos a partir del cDNA de *amfos* (figura 12). En el esquema se observa un fragmento de 2300 pb, el rectángulo amarillo representa la secuencia que codifica para el dominio conservado de la proteína Amfos y el rojo corresponde a la secuencia que codifica para el dominio ácido de la proteína. En la parte inferior de la figura se esquematizan los oligonucleótidos en verde (1 y 2), que se usaron para amplificar un fragmento de 2300 pb a partir del cDNA de *amfos*.

Amfos 1 5' **GGGGGAATTCGATGTTGAATGGACAGAATGCACACAG** 3'

Amfos 2 5' **GGGGGTCTAGACTTTGCTTGCAGCACCAACAATATCG** 3'

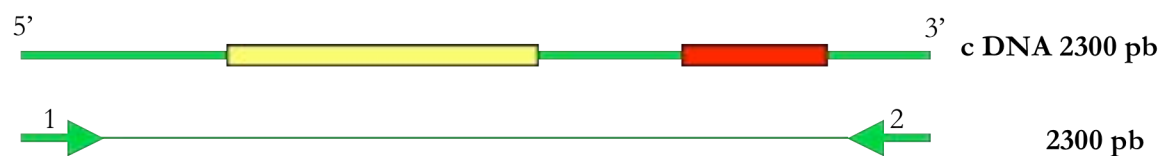


Figura 12. Esquema de los oligonucleótidos para amplificar un producto de 2300 pb a partir del cDNA de *amfos*. Los rectángulos representan el dominio conservado (amarillo) y el dominio ácido (rojo), de la proteína Amfos.

Se utilizaron los oligos anteriores para la reacción de PCR y las condiciones fueron las siguientes: 94°C x 5'; 94°C x 1', 62°C x 1', 72°C x 1' x 30 ciclos; 72°C x 5'; 4°C. El producto de la reacción se analizó en un gel de agarosa 0.8% (figura 13). En la figura se observa en el primer carril el marcador de peso molecular λ , digerido con Hind III (PM, usado en todos los casos) y en los dos siguientes una banda de 2.3 kb que corresponde al fragmento que amplifican los oligos 1 y 2 (carriles 1 y 2).

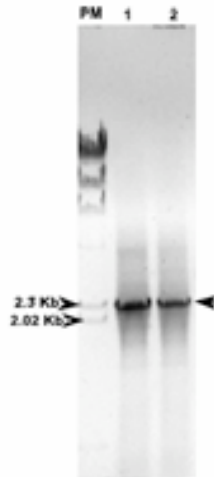


Figura 13. Producto de PCR a partir del cDNA de *amfos*. Se observa una banda de 2.3 kb que corresponde al amplificado del cDNA completo; como marcador de peso molecular se utilizó λ digerido con Hind III (PM).

Cada uno de estos fragmentos se purificó del gel de agarosa y se subclonó en el vector (pGEM-T Easy). Los plásmidos resultantes se purificaron por minipreps. Para la liberación del inserto se hizo una digestión con la enzima de restricción Not I. La figura 14 muestra el gel de agarosa donde se observa el marcador de peso molecular (PM) y la liberación del inserto (12). El plásmido utilizado es de 3015 pb.

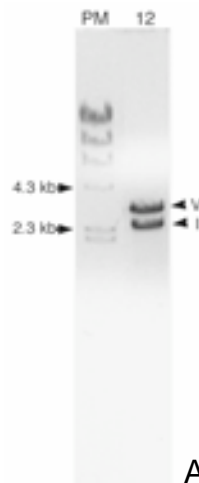


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa para mostrar la liberación del inserto del vector (pGEM-T Easy Vector). Carril 1, marcador de peso molecular (PM), Carril 2 fragmento de 2300 pb (banda inferior, I) liberado mediante una digestión con Not I, el vector tiene 3015 pb (banda superior, V).

El fragmento ya secuenciado se utilizó como templado. Se diseñaron oligonucleótidos para la primera PCR del método para la síntesis *in vitro*, para añadir la etiqueta de hemaglutinina (HA) en el extremo C-terminal.

Para el cDNA de *amfos*.

Am-pro 1 5' CTTTAAGAAGGAGATATACCATGTTGAATGGACAGAAT 3'

Am-pro 2 5' ATCGTATGGGTAGCTGGTCCCTTTGCTTGCAGCACC 3'

El oligonucleótido 1 es sentido y 2 antisentido.

Las condiciones del termociclador para la PCR son las siguientes: 94°C x 4'; 94°C x 1', 40°C x 1', 72°C x 1'30'' x 20 ciclos; 72°C x 7'; 4°C.

Se analizaron los productos de la primera PCR en un gel de agarosa a 0.8% (figura 15). En la figura se observa una banda de 2.3 kb que corresponde al fragmento esperado que se amplificó a partir del cDNA. De la primera reacción de PCR se usaron 2 µl del producto como templado para la segunda reacción de PCR en la que se añaden los sitios de regulación de la transcripción y traducción. Los oligonucleótidos utilizados para la segunda PCR están incluidos en el Kit de reacción de RTS de Roche.

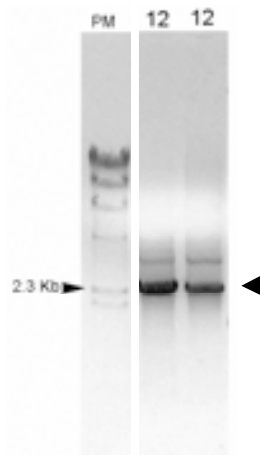


Figura 15. Producto de la primera PCR para el fragmento de 2300 pb. Estos se obtuvieron de la primera PCR para la síntesis *in vitro*. Marcador de peso molecular (PM) y fragmento de 2300 pb por duplicado (12).

Las condiciones del termociclador para la segunda PCR son las siguientes: 94°C x 4'; 94°C x 1', 60°C x 1', 72°C x 1'30'' x 25 ciclos; 72°C x 7'; enfriar a 4°C.

Se analizaron los productos de la segunda PCR en un gel de agarosa a 0.8% (figura 16). Los productos de la segunda PCR se purifican del gel de agarosa para la traducción *in vitro*.

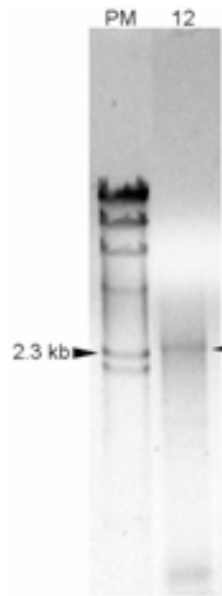


Figura 16. Producto de la segunda PCR para la síntesis *in vitro*. PCR 2 para el fragmento de 2300 pb (12). A este fragmento se les han añadido los elementos regulatorios para la traducción y la etiqueta HA.

Para determinar la concentración óptima del anticuerpo anti-Amfos que se utilizó en ensayos para detectar la proteína Amfos se hizo un Western blot previo a la síntesis de proteínas. Para esto se hizo un homogenado de 30 moscas silvestres en PBS 1x, se separaron las proteínas por medio de una electroforesis y se reveló el Western Blot de acuerdo al protocolo descrito en la metodología. La concentración óptima obtenida fue 1:200, en los que se observa una banda de aproximadamente 55 kDa que corresponde al peso molecular esperado de la proteína predicha (Figura 17).

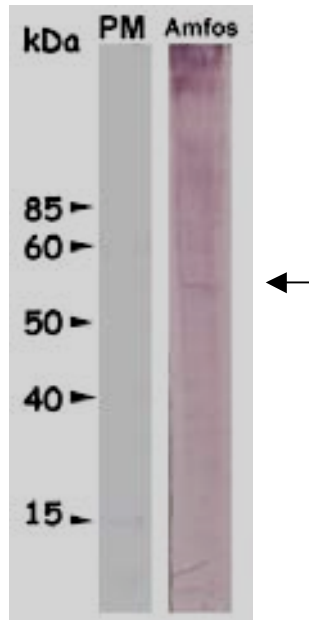


Figura 17. Western blot de un homogenado de moscas silvestres. En la primera columna se observan los marcadores de peso molecular (PM) y en la segunda el homogenado de moscas utilizado como control positivo para determinar la concentración del anticuerpo anti-Amfos. Se observa una banda de aproximadamente 55 o 60 kDa correspondiente al peso predicho de la proteína (Amfos).

Obtenidos los productos de la segunda reacción de PCR se preparó la mezcla de reacción (10 μ l del templado de PCR y 40 μ l del extracto de *E.coli*) y se colocó en el equipo de reacción a 30°C, 200 rpm por 4 horas. Al término de la reacción se corrió la muestra, que en principio contiene la proteína sintetizada, en un gel SDS-PAGE en condiciones desnaturizantes, junto con un control negativo donde sólo se puso la mezcla de reacción sin producto de PCR. Después se realizó un Western Blot para poder detectar la presencia de la proteína. Cada una de estas muestras se incubó con dos anticuerpos primarios diferentes: anti-Amfos que en principio reconoce el extremo C-terminal de la proteína y anti-HA que es la etiqueta con la que se marcaron las proteínas sintetizadas *in vitro* (figura 18). En la figura 18 se observa que tanto en el control negativo como en la muestra de interés hay presencia de diferentes bandas que se observan más claramente cuando se incubó con anti-HA, mientras que con anti-Amfos no son tan claras. En A (control) esperábamos que no se presentaran ningún tipo de bandas ya que la

premezcla en teoría no tendría la proteína de nuestro interés y dado que el anticuerpo anti-HA es monoclonal, esperábamos que no cruzara con proteínas contenidas en la mezcla de reacción. En B esperábamos que en la columna de la izquierda se observara una banda del peso esperado tal y como se observó en el homogenado de la figura 17. En la columna de la derecha se observan dos bandas de aproximadamente 50 y 55 kDa que se observan también en A (columna derecha). Lo anterior nos indica que el anticuerpo anti-HA a pesar de ser monoclonal no es específico para la etiqueta que se agregó a la proteína sintetizada, o bien que no se está llevando a cabo la transcripción y traducción de la proteína, ya que las bandas que observamos no corresponden al peso de la proteína buscada.

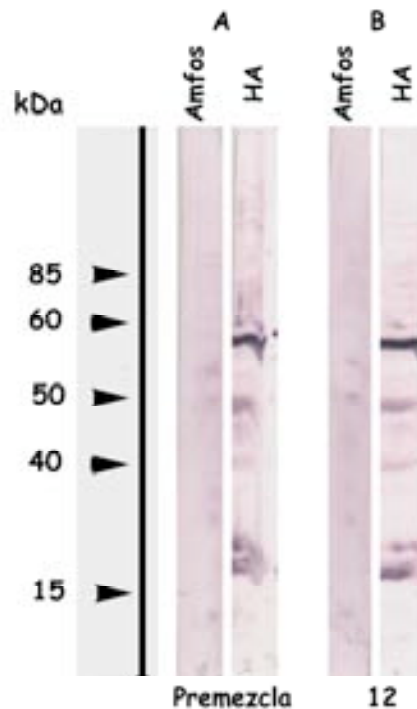


Figura 18. Western Blot de los productos proteicos de la síntesis *in vitro*. En la primera columna se observan los pesos en kDa de los marcadores de peso molecular. A) Se muestra un control negativo que corresponde a la premezcla para la síntesis *in vitro* sin templado de PCR. B) Producto de la síntesis *in vitro* para la proteína completa (12). En los dos casos la columna de la izquierda corresponde a la membrana que se incubó con anti-Amfos y la columna de la derecha la que se incubó con anti-HA como anticuerpo primario. Todas éstas se incubaron con un segundo anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina.

Dado que no se observó la presencia de la banda correspondiente a la proteína sintetizada in vitro se hizo un análisis de la secuencia del cDNA de *amfos* con la secuencia de la base de datos de *Drosophila* y se encontró que en la posición 1088 existía un cambio de una guanina (G) por una timina (T) que generaba un codón de paro (TAG) en la secuencia (figura 19), por lo que la síntesis de la proteína no se pudo llevar a cabo y por lo tanto no se observa la banda de tamaño deseado en el Western blot.

```

Query: 78      egcattctgttggccatgatgctatgatgtgctggacgacgaaccaattgaccgacgtgtgaa 137
              |||
Sbjct: 3011182 egcattctgttggccatgatgctatgatgtgctggacgacgaaccaatgaccgacgtgtgaa 3011123
  
```

Figura 19. BLAST de la secuencia mutada de *amfos* con la base de datos Flybase. La cabeza de flecha muestra el lugar del nucleótido mutado; se observa una timina en lugar de una guanina que genera un codón de paro TAG.

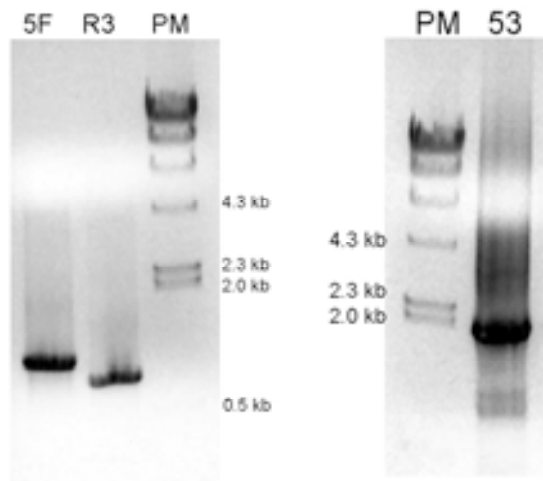
Se diseñaron oligonucleótidos para reparar la mutación en el cDNA y hacer el cambio de T por G utilizando PCR. El oligonucleótidos FOR AMFOS se diseñó con el cambio del nucleótido como se muestra en la secuencia (en rojo), tomando en cuenta el marco de lectura abierto que es de 1800 pb aproximadamente.

```

AMFOS 5      5' TTGAATGGACAGATTGCACACAGTTATTTG 3'
FOR AMFOS 5' GACGAACAATGAGCCGACGTG 3'
REV AMFOS 5' CACGTCCGGCTCATTGTTCGTC 3'
AMFOS 3      5' TTATGTGGTGCTGGCTGCTGTCTCAGTG 3'
  
```

Se utilizaron los oligos AMFOS 5 y FOR AMFOS para amplificar un fragmento de 1013 pb y los oligos REV AMFOS y AMFOS 3 para amplificar un fragmento de 828 pb. Las condiciones para la PCR fueron las siguientes: 94°C x 5'; 94°C x 45", 57°C x 45", 72°C x 1'30" x 30 ciclos; 72°C x 7; enfriar a 4°C. El producto de estas dos reacciones se corrió en un gel de agarosa 0.8% (figura 20). Los productos se purificaron del gel y se usaron como templados para otra reacción de PCR, donde se utilizaron los oligos AMFOS 5 Y AMFOS 3 para amplificar un fragmento de

1820 pb, utilizando las mismas condiciones que en la PCR anterior; se corrieron estos en un gel de agarosa 0.8% (figura 20). En la figura 20 se observa una banda



de 1800 pb aproximadamente que corresponde al fragmento completo del cDNA de *amfos* que en principio tiene la corrección del cambio de nucleótido (53).

Figura 20. PCR para corrección del cDNA de *amfos*. Productos de PCR para los fragmentos amplificados por los oligonucleótidos AMFOS 5 Y FOR AMFOS (5F) que da un fragmento de 1013 pb, REV AMFOS y AMFOS 3 (R3) que amplifican un fragmento de 828 pb y AMFOS 5 y AMFOS 3 (53) que da un fragmento de 1820 pb, correspondiente al marco de lectura abierto del cDNA de *amfos*.

Este fragmento obtenido es el que en principio tiene la corrección del nucleótido. Para verificar esto el fragmento se insertó en un vector (PGEM-T easy vector, Promega) y se mandó secuenciar, para lo cual se hizo el diseño de un oligonucleótido que reconoce una zona cercana a la mutación.

Sec - amfos 5' TCTACGAGACTTCCATGACCCAGG 3'

Haciendo el BLAST de la secuencia con la base de datos encontramos que en efecto se había hecho la corrección del nucleótido (figura 21). Ya corregido, se utilizó este cDNA de *amfos* para hacer la síntesis *in vitro* de la proteína.

```

Query: 76      ctgataagcattctggttggccatatgctatgatgtgctggacgacgaacaatgagccgac 135
              |||
Sbjct: 3011188 ctgataagcattctggttggccatatgctatgatgtgctggacgacgaacaatgagccgac 3011130

```

Figura 21. BLAST de la secuencia corregida de *amfos* con la base de datos Flybase. La cabeza de flecha muestra el lugar del nucleótido corregido; se ha cambiado una timina por guanina en la secuencia del cDNA.

Síntesis *in vitro* de Amfos

Para la síntesis *in vitro* de la proteína Amfos se diseñó un par de oligonucleótidos, donde se adiciona una etiqueta molecular de cola de histidinas (His₆) en la parte carboxilo terminal (figura 22).

His₆ C-terminal

AMFOS H1 5' CTTTAAGAAGGAGATATACCATG TTGAATGGACAGATTGC 3'

AMFOS H2 5' TGATGATGAGAACCCCCCCC TGTGGTGCTGGCTGC 3'

Figura 22. Oligonucleótidos para la síntesis *in vitro* de Amfos. AMFOS H1 y H2 corresponden a aquellos en los que la etiqueta de histidinas está localizada en la región C-terminal (H1 es sentido y H2 antisentido).

Para las PCR 1 se usaron las siguientes condiciones: 94°C x 4'; 94°C x 1', 50°C x 1', 72°C x 1'30''x 25 ciclos; 72°C x 7'; enfriar a 4°C. El productos de la reaccion de PCR se analizó en un gel de agarosa al 0.8%. El producto de la primera reacción se utilizó como templado para la segunda PCR, con las condiciones antes mencionadas, y una Tm de 60°C. Estos productos se analizaron en gel de agarosa al 0.8% (figura 23). Se puede observar para la PCR1 una banda de aproximadamente 1800 pb y para la PCR 2 una banda de un peso molecular un poco mayor debido a los sitios de regulación de inicio y termino de la transcripción que se han agregado.

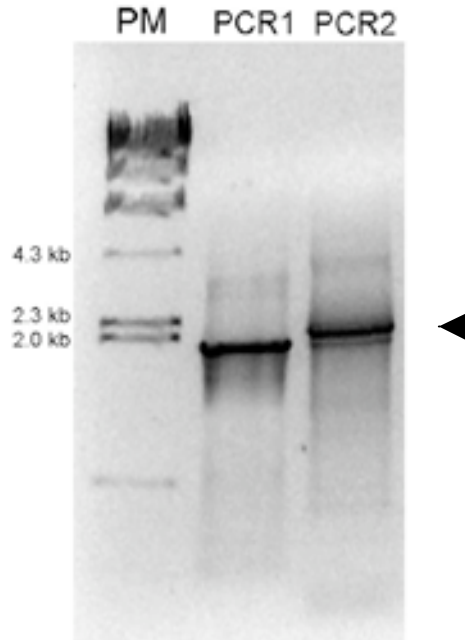


Figura 23. PCR de la primera y segunda reacción para la síntesis *in vitro* de Amfos. En el primer carril se muestra el producto de la primera reacción de PCR usando como templado el cDNA de *amfos*, y en el siguiente carril el producto de la segunda reacción para el fragmento que tiene la etiqueta de His en la región carboxilo terminal. PM es el marcador de peso molecular (λ Hind III).

El producto de la segunda PCR se utilizó como templado para la síntesis *in vitro* de la proteína como se menciona en la metodología. Esta se corrió en un gel SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes y se hizo un Western blot, utilizando un anticuerpo anti-His₆ (Roche) que reconoce la etiqueta molecular y un segundo anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina. En el Western blot se observa una banda de aproximadamente 55 kDa (figura 24), que corresponde aproximadamente con la proteína predicha en la base de datos de *Drosophila*. Esta ligera discrepancia puede deberse a que las condiciones *in vitro* son diferentes a las endógenas, y por lo tanto pudiera estar generando un producto más pequeño que no sufre modificaciones post-traduccionales. Como control se utilizó sólo la premezcla de reacción sin templado de la segunda PCR y se observa una banda de bajo peso molecular que es detectada por inespecificidad del anticuerpo, que se observa también en el carril de la proteína sintetizada (C-His).

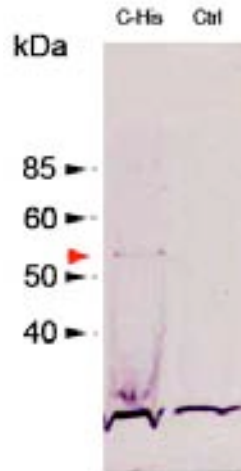


Figura 24. Western blot para Amfos-His₆. Proteína sintetizada *in vitro* con etiqueta de histidinas en la región carboxilo terminal (C-His). La punta de flecha indica una banda de aproximadamente 55 kDa. Como control se usó la premezcla sin templado de la segunda PCR (Ctrl).

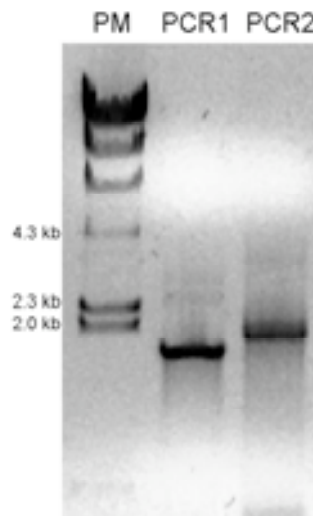
Síntesis *in vitro* de Dfos.

Partiendo del cDNA de *Dfos*, éste se mandó secuenciar para corroborar que no existiera error alguno en la secuencia. De la secuenciación no se observó ninguna alteración, por tanto al igual que para Amfos, se diseñaron un par de oligos para amplificar todo el marco de lectura abierto a partir del cDNA de *Dfos*. Para este caso se utilizó hemaglutinina (HA) como etiqueta molecular en la región carboxilo terminal (figura 25).



Figura 25. Esquema de oligonucleótidos para Dfos. 1 y 2 son los oligonucleótidos que amplifican el marco de lectura abierto total del cDNA de *Dfos*, y a los que se le ha adicionado una secuencia que codifica para HA como etiqueta molecular en la región carboxilo terminal.

Para la PCR1 se usaron las mismas condiciones en el termociclador que en las reacciones anteriores, excepto por la T_m , que fue de 52°C y para la PCR2 las condiciones son las mismas. Los productos de reacción se analizaron en un gel de agarosa 0.8% (figura 26), donde se observa una banda de aproximadamente 1600 pb para el caso de la primera reacción y para la PCR2 el tamaño de la banda es un poco mayor dado que se han agregado las secuencias de reconocimiento de inicio y termino de la transcripción y traducción; PM es el marcador de peso



molecular.

Figura 26. Productos de la primera y segunda reacción de PCR para *Dfos*. En PCR1 se muestra una banda de un amplificado de aproximadamente 1650 pb, y en PCR2 se muestra el producto de la segunda reacción y se observa una banda de peso molecular mayor debido a las secuencias de regulación de la transcripción. Marcador de peso molecular (PM).

El producto de la segunda reacción de PCR se tomó como templado para la síntesis *in vitro* de la proteína, tal como se menciona en la metodología. Para detectar la proteína se hizo un Western blot utilizando como anticuerpo primario anti-HA y como secundario uno acoplado a fosfatasa alcalina (figura 27); en la figura se observa una banda de aproximadamente 60 kDa (DFos) que corresponde al tamaño predicho en la base de datos, como control se utilizó la premezcla de reacción en donde no observamos presencia de bandas inespecíficas.



Figura 27. Western blot para la proteína Dfos sintetizada *in vitro*. Se observa una banda de aproximadamente 60 kDa (Dfos HA), como control se usó la premezcla de reacción del extracto de *E.coli* (Ctrl). Marcador de peso molecular (PM).

Interacciones proteína – proteína.

a) Dfos

Para observar la interacción física entre la proteína Amfos y Dfos se hicieron pruebas de coimmunoprecipitación, donde se probó si cada una de las proteínas sintetizadas inmunoprecipitaba a la otra de origen endógeno, para lo cual se hizo un homogenado de embriones silvestres. Se inmunoprecipitó usando Dfos sintetizada *in vitro* como se indica en la metodología. En este caso se puede observar en un gel teñido con azul de coomassie la presencia de dos bandas de peso molecular muy cercano que pensamos corresponden a Amfos y Dfos (figura 28 carriles HA y Amfos). En los carriles ctrl HA y ctrl Amfos se observan como control los anticuerpos usados para las coimmunoprecipitaciones desnaturalizados y se pueden ver dos bandas, una correspondiente a la cadena pesada y otra a la cadena ligera. Los carriles HA y Amfos corresponden a las muestras y se observa una serie de bandas por encima de la cadena pesada del anticuerpo que pueden ser proteínas presentes en el extracto de *E.coli*, usado para la síntesis *in vitro*; sin embargo se observan dos bandas de peso molecular muy cercano,

aproximadamente de 45 kDa que pudieran corresponder a Amfos y Dfos, aunque no corresponden exactamente al tamaño predicho en la base de datos y que no están presentes en los carriles control.

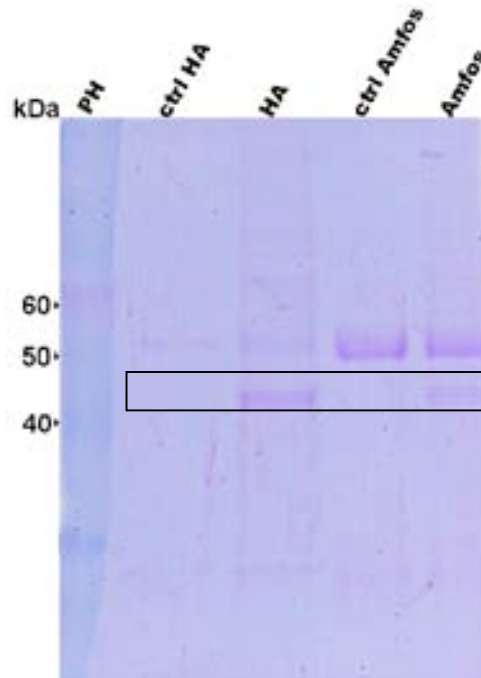


Figura 28. Coinmunoprecipitación de Dfos y Amfos. Usando Dfos sintetizado *in vitro* y un homogenado de embriones silvestres óregon R (ORR). Los carriles ctrl HA y ctrl Amfos son los controles y se observan las bandas con el anticuerpo desnaturalizado. En los carriles HA y Amfos se muestran las bandas de las proteínas que inmunoprecipitaron (enmarcadas en un rectángulo). Marcador de peso molecular (PM). El gel se tiñó con azul de Coomassie

b) Amfos

Para Amfos se realizó el mismo experimento, sólo que en este caso utilizamos para inmunoprecipitar anti-HA y anti-His y el gel se tiñó con azul de Coomassie, y dado que sólo se observaban las bandas de los anticuerpos, se hizo una tinción con plata después de la tinción con azul de Coomassie, la cual es mucho más sensible y al igual que en la figura anterior, en los carriles control (CTRL), se observa el anticuerpo desnaturalizado, y en los carriles HA e His se observan unas bandas de aproximadamente 45 kDa que pensamos corresponden a las proteínas que se formaron en el complejo de coinmunoprecipitación (figura 29), como en la figura 28.

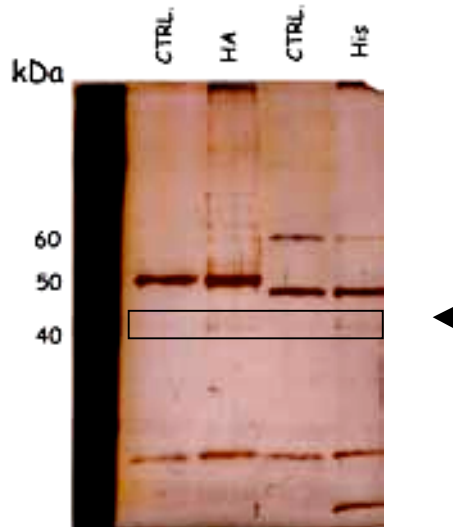


Figura 29. Coimmunoprecipitación de Amfos y Dfos. En los carriles controles (CTRL) se observa las dos bandas del anticuerpo desnaturalizado. En los carriles HA e His se observan a 45 kDa un par de bandas que pensamos corresponden a las proteínas Amfos y Dfos que se formaron en el complejo de coimmunoprecipitación (enmarcadas en un rectángulo). Tinción con nitrato de plata

c) Dfos y Amfos *in vitro*.

Posteriormente en un ensayo como los dos anteriores se utilizaron las dos proteínas sintetizadas *in vitro* para el ensayo de coimmunoprecipitación. Para poder detectar si existe interacción física entre estas dos proteínas, usamos como anticuerpos para la inmunoprecipitación anti-HA y anti-His, que se unirán a Dfos y a Amfos respectivamente. En el gel que se tiñó con azul de comassie y posteriormente con nitrato de plata; se observan en los carriles controles (Ctrl) los anticuerpos desnaturalizados. En el carril HA y en el carril His se pueden observar una serie de bandas por encima de la banda correspondiente a la cadena pesada del anticuerpo y otras por debajo de esta, las cuales pensamos que pueden corresponder a las dos proteínas sintetizadas *in vitro* que inmunoprecipitaron (figura 30).

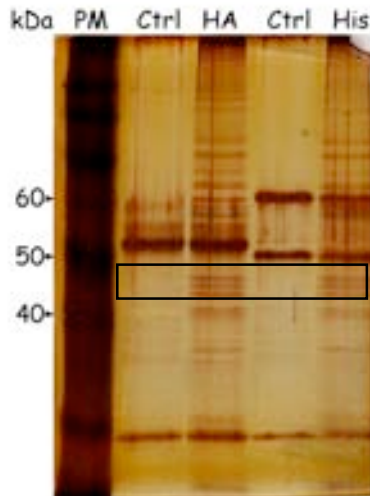


Figura 30. Coinmunoprecipitación de Amfos y Dfos sintetizadas *in vitro*. En los carriles controles (Ctrl) se observa el anticuerpo desnaturalizado: las cadenas pesada y ligera. Los carriles HA e His son las muestras y aproximadamente a 45 kDa se observan un par de bandas que pensamos corresponden a las proteínas sintetizadas *in vitro* (enmarcadas en el rectángulo). Tinción con nitrato de plata.

Cada uno de estos experimentos de coinmunoprecipitación se realizó con un mínimo de tres repeticiones y para todos ellos también se hizo análisis de Western blot, transfiriendo el gel a una membrana de nitrocelulosa; sin embargo en ninguno de ellos se pudieron detectar las bandas que pensamos son las proteínas coinmunoprecipitadas de acuerdo al peso molecular predicho; sólo se observan las bandas del anticuerpo usado para la inmunoprecipitación (figuras no mostradas).

DISCUSIÓN.

Para entender el funcionamiento de alguna proteína en un organismo, se puede hacer uso de una gran cantidad de herramientas moleculares, es por ello que hoy en día el uso de técnicas *in vitro* en sistemas libres de células es de gran ayuda, ya que ofrece muchas ventajas para estudiar la función de la(s) molécula(s) de interés. Esto es particularmente de gran importancia para tener una visión mas amplia acerca de la función del gen *amfos*, ya que sabemos que este gen tiene una fuerte interacción genética con el gen *Dfos*; sin embargo no se conoce si los productos proteicos de estos dos genes tienen interacción física. Por lo anterior decidimos generar dichas proteínas en un sistema libre de células y así observar mediante técnicas de coimmunoprecipitación, si las proteínas sintetizadas *in vitro* interactúan.

El sistema utilizado emplea como base un templado lineal generado por reacciones de PCR a partir de un cDNA base, lo que ofrece la ventaja de realizar cambios en la secuencia, así como adicionar otros elementos. En nuestro caso utilizamos como herramienta el adicionar etiquetas moleculares como hemaglutinina (HA) y una cola de histidinas (His₆) para detectar la proteína, para lo cual se sintetizaron los oligonucleótidos respectivos. En una primera aproximación se hicieron reacciones para un amplificado de *amfos* de 2300 pb; este producto se clonó en un vector y se mandó secuenciar para corroborar que era el gen de estudio y obtuvimos una secuencia de aproximadamente 300 pb de la región 5' y haciendo el BLAST con la base de datos de *Drosophila* corroboramos que corresponde al gen *amfos*. Por lo tanto se utilizó este cDNA para realizar las reacciones de PCR y generar el templado que se usó para la síntesis *in vitro*. Para detectar la proteína que marcamos con la etiqueta HA, se realizó un Western blot que se muestra en la figura 18, en donde se observa la membrana correspondiente al control y a la muestra. Como control se utilizó la premezcla de reacción que contiene el lisado de *E.coli* con la maquinaria necesaria para la transcripción y traducción *in vitro*. Esta membrana se dividió en dos y una fue incubada con anticuerpo anti-Amfos y la otra con anti-HA. Como era de esperarse

en la membrana control incubada con anti-Amfos no se observa nada, mientras que en la que se incubó con anti-HA se observan diferentes bandas y una muy intensa a aproximadamente 55 kDa; lo mismo ocurre para la membrana correspondiente a la muestra que en principio contiene la proteína. Esto quiere decir que el anticuerpo anti-Amfos que fue generado en el laboratorio –que debería reconocer una sola banda como se muestra en la figura 17-, no lo hace, lo que nos hace pensar que la proteína no se sintetizó de manera adecuada y por lo tanto el anticuerpo no la reconoce. Por otro lado el anticuerpo anti-HA reconoce varias proteínas tanto en el control como en la muestra y se observa un mismo patrón de bandas indicando que no hubo síntesis proteica y que el anticuerpo está cruzando con proteínas de la premezcla de reacción que no son de nuestro interés, aunque en un principio parecía que una de estas bandas inespecíficas era la proteína que buscábamos ya que se observa una banda muy intensa a aproximadamente 55 kDa, que es el tamaño de la proteína predicha. Por lo tanto este anticuerpo comercial que es monoclonal no es específico y cruza con otras proteínas de la mezcla de reacción.

Debido a esto se realizó una nueva búsqueda en la base de datos y encontramos que en la secuencia correspondiente al marco de lectura abierto había una mutación de cambio de una base, el cual genera un codón de paro. En primer lugar se mandó secuenciar la zona cercana a la mutación usando un oligo diseñado por nosotros para verificar la mutación y posteriormente hacer la corrección del nucleótido. Para corregir esta mutación se utilizó PCR con oligonucleótidos modificados, de los cuales obtuvimos dos productos de reacción, que posteriormente se unieron en una tercera reacción de PCR para obtener un fragmento de 1600 pb. Este fragmento se mandó secuenciar usando el mismo primer cercano a la zona de la mutación, donde obtuvimos el resultado esperado del cambio de T por G. Por esta razón no se podía llevar a cabo la traducción *in vitro* de la proteína, ya que al generarse un codón de paro en este sitio se truncaba la expresión de la proteína y tampoco era posible reconocer una proteína más pequeña dado que la etiqueta molecular que se le agregó a ésta se encontraba en la región carboxilo terminal, al igual que el epítipo que se usó para

generar el anticuerpo policlonal anti-Amfos. Hecha la corrección del nucleótido se llevó a cabo la síntesis de Amfos, en esta ocasión usando como etiqueta molecular una cola de histidinas. Para Dfos se utilizó como etiqueta molecular HA. Estas dos proteínas se detectaron por ensayos de Western blot, usando como anticuerpo primario anti-His y anti HA respectivamente y como anticuerpo secundario se utilizó uno acoplado a fosfatasa alcalina. En los diferentes ensayos se observó la presencia de una banda de un peso aproximado al reportado en la base de datos de *Drosophila*. En el caso de Amfos se observó una banda de 55 kDa, mientras que el peso predicho fue de 60 kDa y para Dfos se observó una banda de 60 kDa como la predicha en la base de datos. Existe una diferencia entre el peso molecular de Amfos predicho y observado: de acuerdo a la secuencia aminoacídica predicha se debe de obtener un peso de 60 kDa; sin embargo, esto puede variar (la diferencia entre el peso predicho y el observado es de aproximadamente 10%). Los anticuerpos reconocen tanto la proteína endógena como la sintetizada *in vitro* (en esta última las condiciones de síntesis son muy diferentes y las modificaciones post traduccionales no deben de existir); a pesar de esto en ambos casos las bandas son de un peso molecular semejante (aproximadamente 55 kDa para la proteína endógena como para la sintetizada *in vitro*).

Para corroborar los datos de la interacción genética y la inmunohistoquímica, donde pensamos que estas dos proteínas pudieran tener una interacción física (Riesgo-Escovar, datos no publicados) hicimos pruebas de inmunoprecipitación en donde se espera que dos proteínas que interaccionan físicamente coprecipitan al unirse una de ellas a un anticuerpo unido a una matriz inerte (proteína A acoplada a sefarosa). Con las proteínas sintetizadas se hicieron 3 diferentes ensayos. En el primer ensayo se inmunoprecipitó Dfos *in vitro* con Amfos endógena, en el segundo inmunoprecipitamos Amfos *in vitro* y Dfos endógena y en el tercero inmunoprecipitamos las dos proteínas sintetizadas *in vitro*. En los tres casos observamos en geles SDS-PAGE un par de bandas de aproximadamente 45 kDa que pensamos son las correspondientes a Dfos y Amfos ya que en el control donde no hay presencia de proteína, sólo la mezcla de anticuerpo y proteína A

acoplada a sefarosa no se observan. En estos carriles control no se observan estas bandas, sólo observamos las bandas de la cadena pesada y ligera del anticuerpo. Para corroborar que se trataba de estas dos proteínas se hicieron transferencias a membranas de nitrocelulosa para hacer Western blot de cada uno de los ensayos, y detectar si las bandas que observamos corresponden a las proteínas que estamos estudiando. No obstante, no se logró detectar ninguna de las proteínas, revelando con un anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina, por lo que usamos un sistema más sensible como lo es el método de quimioluminiscencia. En este caso tampoco pudimos observar bandas correspondientes a las proteínas estudiadas (datos no mostrados). Esto puede significar que a) la cantidad de proteína usada en el ensayo no es suficiente para poder detectarla por estos métodos, o b) que esas dos bandas no corresponden a las proteínas en estudio y que las proteínas de interés, dado el peso molecular de cada una, se están enmascarando con la banda correspondiente a la cadena pesada del anticuerpo y no las hayamos podido resolver, o bien c) que la interacción no es muy fuerte dadas las condiciones de ensayo. Alternativamente las proteínas en estudio no interaccionan de manera física significativamente. Por lo tanto pensamos que hacer electroforesis bidimensional de estas muestras podría revelar si en esa banda que caracterizamos como del anticuerpo se encuentran más de una proteína y si éstas corresponden a las proteínas Amfos y Dfos.

CONCLUSIONES

Aportamos evidencia de una posible interacción entre estas dos proteínas en ensayos *in vitro* de coinmunoprecipitación. Cada una de las proteínas sintetizadas *in vitro* coinmunoprecipitó proteína(s) endógena(s) de homogenados.

Nuestros resultados no precluyen una interacción física entre las dos proteínas sintetizadas *in vitro*.

REFERENCIAS

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

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: 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>.

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.

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

Coffin, J.M. Hughes, S.H. y Varmus, H.E. **1997**. Retroviruses. New York.

Cooper, G. M. **2000**. The Cell. A Molecular Approach, Sunderland (MA).

Ellenberger TE, Brandl CJ, Struhl K, Harrison SC. **1992**. The GCN4 basic region leucine zipper binds DNA as a dimer of uninterrupted alpha helices: crystal structure of the protein-DNA complex. *Cell*: 71:1223-37.

Hahn, S. **1993**. Structure (?) and function of acidic transcription activators. *Cell*. Vol. 72: 481-483.

Harden, N. 2002. Signaling pathways directing the movement and fusion of epithelial sheets: lesson from dorsal closure in *Drosophila*. *Differentiation*: Vol. 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.*: Vol. 21: 3009-3018.

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

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: 919-946.

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

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

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

Sambrook J., Fritsch E. y Maniatis T. 1989. Molecular Cloning a Laboratory Manual. 2a Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1.74 – 1.84.

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

Su, Y. Treisman, J. y Skolnik, E. **1998.** The *Drosophila* Ste20-related kinase missapen is required for embryonic dorsal closure and acts through a JNK MAPK module on an evolutionarily conserved signaling pathway. *Genes Development*: Vol. 12: 2371-2380.

Yook, K. Proulx, S. y Jorgensen, M. **2001.** Rules of Nonallelic Noncomplementation at the Synapse in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*: Vol. 158: 209-220.

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.*: Vol.16: 7393–7401.

Zhang K, Chaillet JR, Perkins LA, Halazonetis TD, Perrimon N. **1990.** *Drosophila* homolog of the mammalian jun oncogene is expressed during embryonic development and activates transcription in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. Vol. 87: 6281-5.