

03072  
20  
28j

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFECIONAL Y DE  
POSGRADO DEL CCH

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

FALLA DE ORIGEN  
CARACTERIZACION FUNCIONAL DEL GENE C3 DE  
*Drosophila melanogaster* y *Anopheles gambiae*.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA  
PRESENTA  
ENRIQUE REYNAUD GARZA.

Cuernavaca, Mor.

marzo, 1995.

1995



## **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 está 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.

A mis Padres.

A Diana.

A mis Amigos: Alberto, Alejandro, Pepe,  
Silvia, Ruben y Werner.

Que no se olvidan de mi.

## AGRADECIMIENTOS

A los doctores:

Alejandra Covarrubias.  
Carmen Gómez.  
Xavier Soberón  
Jorge Nieto  
Por haber aceptado revisar esta tesis.

A Mario Zurita por aceptarme en su grupo de investigación, por todas la oportunidades de superarme que me ha dado y por los buenos momentos que he pasado con el.

A Félix Recillas por haber sufrido tan estoicamente y críticamente los embates de mi cruda prosa.

A Martha Vazquez por sus valiosísimos consejos.

A Virginia Barajas que es la mejor técnica que conozco (y porque hacemos un magnifico equipo de trabajo).

Resumen: .....	1
Introducción .....	2
El mosquito como modelo experimental .....	2
Biología básica de los mosquitos transmisores de la malaria .....	2
Ciclo de vida de los mosquitos anofelinos .....	3
Los huevos- .....	3
Las larvas - .....	4
Las pupas - .....	4
Los adultos - .....	5
El ciclo gonadotrófico y de postura - .....	6
Biología Molecular de los anofelinos: .....	6
Clasificación - .....	7
Genética - .....	8
Mosquitos Transgénicos - .....	9
Porque estudiar a los mosquitos anofelinos .....	10
Drosophila melanogaster como modelo experimental .....	11
Ciclo de vida: .....	14
Copulación e inicio de la ovogénesis - .....	15
Ovogénesis .....	16
Anatomía del ovario - .....	17
El desarrollo temprano del embrión - .....	18
Antecedentes: .....	21
Objetivos: .....	24
Objetivos Particulares: .....	24
I) Determinación de la estructura genómica y regulación del gen c3: .....	24
II) Análisis de homología de c3 .....	24
III) Caracterización de la expresión y localización del producto de c3 el desarrollo D. melanogaster .....	25
Materiales y métodos: .....	25
Estrategia experimental y resultados: .....	29
I) Caracterización de la zona reguladora del gen c3 de An. gambiae .....	29
A) Aislamiento de la clona genómica de c3 .....	29
B) Identificación y secuenciación del extremo 5' regulatorio .....	29
C) Identificación del sitio de inicio de la transcripción .....	32
D) Cuantificación de la transcripción de c3 en distintas fases del desarrollo larvario de D. melanogaster .....	32
II) Análisis de homología de c3 .....	32
A) Alineamiento de secuencias peptídicas de c3 vs homólogos de diversos organismos .....	32
Alineamiento de las secuencias peptídicas de c3 de D. melanogaster vs A. n. gambiae .....	35
III) Caracterización de la expresión y localización del producto de c3 durante el desarrollo de D. melanogaster .....	35

A) Clonación de la región codificadora de c3 en el vector de expresión pGEX1 .....	35
B) Purificación de la proteína de fusión y producción de anticuerpos anti-c3. ....	35
C) Western blot de los distintos estadios larvarios. ....	38
D) Inmunocitoquímica de ovarios. ....	38
E) Inmunocitoquímica de embriones enteros. ....	38
Discusión:.....	40
Conclusiones:.....	47
Perspectivas:.....	48
A) Estudios funcionales de del producto de c3. ....	48
B) Regulación de la expresión del gen c3. ....	49
Bibliografía .....	50

## **Resumen:**

En nuestro laboratorio estamos interesados en los procesos moleculares que ocurren durante la formación del huevo en los dípteros *Anopheles gambiae* y *Drosophila melanogaster*. Estos dos organismos son un modelo ideal para estudiar este fenómeno ya que en el primero (*An. gambiae*) la ovogénesis se induce cuando la hembra chupa sangre, mientras que el segundo (*D. melanogaster*) es el metazoario mejor caracterizado a nivel de genética y biología molecular. Ambos organismos tienen un desarrollo embrionario casi idéntico y sus procesos de ovogénesis también son muy similares.

En este trabajo reportamos el aislamiento y caracterización de un gen (c3) cuyo transcrito está muy enriquecido en el ovario en producción de *An. gambiae*. Se han aislado genes homólogos en otros organismos tales como: levadura, plantas, ratón y humano. El gen c3 codifica para una proteína de 269 aminoácidos muy básica cuya función no se ha podido determinar claramente en ninguno de los organismos en que ha sido descrita, ya que se le han adjudicado funciones tan dispares como que es una proteína ribosomal (humano), está involucrada en la entrada a la fase "S" del ciclo celular (plantas), es un efector de Fos (ratón) o que es parte del sistema de transporte de proteínas a mitocondrias (levadura). Utilizando el cDNA del gen c3 aislamos el gen homólogo a c3 de *D. melanogaster*. Este tuvo una similitud mayor al 90% a nivel de nucleótidos con el gen de *An. gambiae*.

Con el objetivo de saber cual es la distribución de la proteína codificada por c3 durante el desarrollo tanto en ovarios como en embriones de *D. melanogaster* generamos anticuerpos contra una proteína de fusión (glutación-s-transferasa-c3) e hicimos ensayos de inmunocitoquímica y de tipo "Western Blot". Los resultados así obtenidos sugieren que la proteína codificada por c3 es sintetizada activamente desde las primeras etapas en la formación del huevo en las células nodrizas y solo se transfiere al huevo en las últimas etapas en las que el contenido de estas se vacía al huevo. Por otro lado, la cantidad absoluta de proteína, al parecer, se mantiene más o menos constante durante las primeras 16 horas de desarrollo del embrión. Sin embargo, el patrón de distribución dentro del mismo cambia de una manera muy dinámica: las zonas de alta concentración parecen correlacionar con las regiones del embrión en las que hay mayor proliferación celular.

## Introducción

### **El mosquito como modelo experimental.**

#### **Biología básica de los mosquitos transmisores de la malaria**

La malaria es la enfermedad tropical de mayor importancia clínica. Esta es causada principalmente por los protozoarios *Plasmodium falciparum* y *P. vivax* los cuales son responsables de aproximadamente 1,000,000 de muertes anuales, principalmente en países en desarrollo.

El principal transmisor a nivel mundial es el mosquito *Anopheles gambiae* el cual es endémico de África. En América, la malaria se transmite por varias especies de mosquitos anofelinos. Los más comunes son: *An. albimanus*, *An. aquasalis*, *An. darlingi* y *An. nuñestovari*. Todos estos son capaces de transmitir la malaria con diferentes grados de eficacia, pero el vector que se ha establecido como modelo internacional de investigación sobre la transmisión de malaria es *An. gambiae*, ya que es el mosquito que la transmite con mas eficiencia.

El proceso de lucha contra la malaria ha sufrido una transición entre la estrategia de erradicación del mosquito mediante el uso intensivo de insecticidas (principalmente DDT) que fue muy popular en los años 60 y que se demostró equivocada con la selección de mosquitos resistentes. La aparición de mosquitos resistentes hizo que se pensara en una estrategia de control (tanto del mosquito como del *Plasmodium*), basada en una serie de aproximaciones multidisciplinarias, entre las que cabe destacar: 1) la utilización cíclica de distintos insecticidas y 2) el control biológico. Sin embargo estas últimas no han sido completamente satisfactorias. Esto ha generado la necesidad de obtener

mas información a nivel epidemiológico y poblacional, tanto del mosquito como del *Plasmodium* ; así como de su interacción entre éstos y el ser humano. También ha sido importante el estudio de la interacción de una población de un vector en particular con otras poblaciones de mosquitos (no necesariamente de la misma especie) y de la relación del mosquito con su nicho ecológico. Ya en otro plano, es importante generar conocimiento sobre la biología molecular del mosquito, en todas las etapas de su desarrollo y de la relación huésped parásito, porque será útil para el control en general de este problema. Una etapa muy interesante del ciclo de vida del mosquito es la ovogénesis ya que representa una encrucijada crítica, en la que se puede detener o desviar el proceso normal reproductivo del mosquito. A largo plazo, el conocimiento de detallado del proceso de ovogénesis nos podría dar la oportunidad de controlar de manera indirecta a la población de mosquitos importantes como vectores de enfermedades. Sin mencionar el interés básico de estudiar un fenómeno tan importante para la biología del desarrollo como la ovogénesis en sí. En nuestro laboratorio estamos interesados en estudiar el proceso de ovogénesis en los dípteros. Hemos decidido utilizar como modelos experimentales al mosquito *An. gambiae* y a la mosca de la fruta *D. melanogaster*. Para poder hacer preguntas relevantes acerca de estos organismos es necesario conocer algunos detalles relacionados con el ciclo de vida y la biología básica tanto de los mosquitos anofelinos como de *D. melanogaster*.

### **Ciclo de vida de los mosquitos anofelinos**

#### Los huevos-

Los huevos de los anofelinos son depositados por la hembra en la superficie del agua y flotan gracias a unas estructuras llamadas flotadores, éstas estructuras

permiten la identificación de la especie a la que pertenecen. Los huevos se depositan durante el vuelo o cuando la hembra reposa cerca de la superficie del agua. Una hembra es capaz de poner de 75 a 150 huevos por ingesta sanguínea. A una temperatura de 25 a 30°C los huevos tardan en eclosionar de 2 a 3 días, a temperaturas mas bajas el proceso de embriogénesis se alarga. Los huevos de algunas especies soportan desecación total.

#### Las larvas.-

Las larvas de los mosquitos anofelinos son acuáticas y pasan por 4 estados de mudas denominados estadios o "instars". La morfología de las larvas es similar en los cuatro estadios, la única diferencia notable a simple vista es un incremento en el tamaño, a nivel mas detallado los instars se definen por una serie de marcadores solamente distinguibles en el microscopio de disección. Las larvas de los anofelinos se distinguen de las de otros mosquitos porque reposan horizontalmente con respecto a la superficie del agua en contraste con otras especies de mosquitos las cuales lo hacen de 45° a 90°.

El período larvario en la naturaleza dura de 7 a 10 días dependiendo de la temperatura y la disponibilidad de alimento. Las larvas de los anofelinos son capaces de ocupar una gran variedad de hábitats. Prueba de esto es que se les encuentra a lo largo de toda América.

#### Las pupas.-

Las pupas de los anofelinos son generalmente inactivas pero si son molestadas pueden nadar vigorosamente. Por lo general flotan en la superficie del agua y respiran por dos estructuras llamadas trompetillas. Las pupas no se alimentan. Esta fase del desarrollo dura de 2 a 3 días. Por lo general las pupas macho son más pequeñas que las hembras.

## Los adultos.-

Los mosquitos anofeles machos se distinguen de las hembras porque tienen pelos en las antenas más largos que las hembras (los mosquitos machos tienen "bigotes"). Las hembras se diferencian de otras especies de mosquitos porque tienen los palpos casi tan grandes como la proboscis.

Los anofelinos se reconocen entre los mosquitos en general por que cuando reposan o se alimentan su cuerpo adopta una posición de  $30^\circ$  con respecto a la superficie; los otros mosquitos adoptan una posición paralela a la del sustrato. Otra característica distintiva de los anofelinos es que, en la mayoría de los casos, los mosquitos anofelinos tienen las alas moteadas mientras que otras especies de mosquitos carecen de esta característica.

La proporción de emergencia de la pupa entre sexos es por lo general de 1:1. Al emerger de la pupa los adultos (ímagos) no pueden volar y tienen que reposar varias horas para permitir la esclerotización del tegumento de sus alas. El apareamiento de estos mosquitos se lleva a cabo en enjambres durante el vuelo y de preferencia al atardecer. La cópula dura aproximadamente un minuto. Ambos sexos pueden aparearse varias veces en el transcurso de su vida, pero la mayoría de los huevos que pone la hembra son fecundados por el esperma del primer macho con el que copuló.

Casi todas las hembras se aparean antes de su primera alimentación sanguínea, esto permite que la hembra inicie la ovogénesis inmediatamente después de alimentarse, reduciendo así el ciclo de postura.

Los machos no tienen una proboscis adecuada para perforar y chupar sangre, por lo que su alimentación se restringe a néctar y fluidos vegetales. Las hembras también se alimentan de estos fluidos, sin embargo, requieren de una ingestión sanguínea para el desarrollo de cada lote de huevos. En algunas

especies es necesario dos ingestiones de sangre para que se pueda iniciar el desarrollo del primer lote de huevos.

#### El ciclo gonadotrófico y de postura.

El ciclo de postura no sólo incluye al ciclo gonadotrófico sino también al período en el que la hembra encuentra un criadero adecuado y pone los huevos, así como el tiempo que la hembra tenga que invertir en encontrar un hospedero para obtener una alimentación sanguínea.

El ciclo gonadotrófico es el período de desarrollo de los ovarios que comienza con una alimentación sanguínea adecuada y termina con la maduración de los huevos no fecundados (ovocitos) listos para la fecundación y postura. La duración de este ciclo es de 2 a 5 días dependiendo de la especie y la temperatura ambiental. La rapidez del desarrollo de los ovarios es inversamente proporcional a la temperatura.<sup>1</sup>

El hecho de que la ovogénesis sea inducible por una ingesta sanguínea representa una gran ventaja ya que es posible alimentar a los mosquitos y observar los fenómenos tempranos de este proceso, una posibilidad es la de aislar los genes inducidos al principio de la ovogénesis.

#### Biología Molecular de los anofelinos:

La Biología Molecular ha significado una enorme revolución en todos los campos de la biología moderna. El caso de las enfermedades parasitarias no ha sido una excepción. Al contrario, este ha sido un campo profundamente influenciado y beneficiado, ya que el uso de las nuevas metodologías moleculares ha causado recientemente una explosión de conocimiento, tanto a nivel básico como aplicado.

La Biología Molecular ha sido utilizada para estudiar a los mosquitos anofelinos y su relación con el *Plasmodium* y el humano. Es muy importante destacar que la generación de conocimiento básico en esta área influye de manera dramática

en nuestra perspectiva con respecto al problema mosquito-humano-  
*Plasmodium*.

Las principales áreas en las que ha contribuido la Biología Molecular en el conocimiento de la biología general del mosquito son las siguientes:

#### **Clasificación.-**

Desde hace mucho tiempo se sospechaba que en las poblaciones de mosquito anofelinos existían especies simpátricas morfológicamente indistinguibles, cuyas propiedades como vectores de enfermedades (en nuestro caso malaria) variaban significativamente. Por otro lado los marcadores morfológicos con los que se contaba eran insuficientes para hacer estudios de genética de poblaciones y de especiaciones incipientes. Como complemento a estas técnicas se empezó a hacer uso de estudios de citogenética del cambio en los patrones de bandedo de cromosomas politénicos, en especies simpátricas<sup>2, 3</sup>. Otras aproximaciones usadas para el discernimiento de especies simpátricas son estudios de incompatibilidad en cruza<sup>4</sup>, citotaxonomía<sup>3</sup> y zymotaxonomía<sup>5</sup>. Estas técnicas, aunque poderosas, requieren de personal y equipo especializados; la gran dificultad técnica que implican estos experimentos limita seriamente el tipo de preguntas que se puede abordar con ellos. Por estas razones se han desarrollado técnicas alternativas de taxonomía molecular muy versátiles y poderosas, entre las que destacan:

Métodos que utilizan a la reacción de polimerasa en cadena (PCR) para amplificar secuencias especie específicas<sup>6, 7</sup>, la utilización de polimorfismos de fragmentos de restricción<sup>8</sup>(RFLP), sondas específicas de DNA sintético para identificar especies dentro del complejo de especies de *Anopheles*<sup>9, 10, 11</sup> y la amplificación de DNA polimórfico al azar (RPD)<sup>12</sup>. La identificación de especies crípticas de mosquitos es esencial para estudios epidemiológicos y programas

de control. Las metodologías antes mencionadas no excluyen sino complementan a los métodos tradicionales de taxonomía de estos organismos.

#### **Genética.-**

Hasta hace muy poco tiempo no existía nada establecido sobre la genética en general de los mosquitos. las razones básicas de esta deficiencia eran la ausencia de marcadores observables fenotípicamente así como el número relativamente pequeño de individuos que se pueden mantener en una colonia de mosquitos en el laboratorio. Recientemente, gracias al empleo de técnicas citogenéticas<sup>13</sup> y el advenimiento de técnicas moleculares<sup>14, 15</sup>, se han podido hacer mapas físicos de baja resolución del genoma de *An. gambiae* utilizando fragmentos derivados por microdissección de cromosomas politénicos<sup>15, 16</sup>. Por otro lado utilizando una estrategia híbrida de cruza y amplificación de secuencias repetidas (como marcadores) se generó un mapa genético mas detallado con una resolución promedio de 2 centimorgans para el cromosoma X del mismo organismo<sup>14</sup>. El uso de estas técnicas de genética molecular facilitara el aislamiento y caracterización de genes que tendrán influencia tanto en el control del número de mosquitos como en su capacidad como vectores de malaria y otras enfermedades.

Esto nos lleva a la idea de la selección de mosquitos que siendo refractarios al *Plasmodium*, también tengan alguna ventaja sobre la población natural, de manera que sean capaces de desplazarla<sup>17, 18, 19</sup>. Otro tipo de características que es importante estudiar para generar a un mosquito por ingeniería genética que sea mal vector del *Plasmodium* es determinar cuales son las particularidades bioquímicas que están involucradas en la transmisión de la malaria<sup>20</sup>, de forma que podamos seleccionar mosquitos que carezcan de estos caracteres.

### **Mosquitos Transgénicos.-**

Una vez conociendo los factores genéticos y moleculares que intervienen en la refractividad a la transmisión de la malaria y contando con un sistema eficiente de transformación en mosquitos<sup>21, 22, 23, 24, 25</sup> (cosa que aún no existe ya que con las técnicas actuales es posible generar mosquitos transgénicos pero con una eficiencia menor a la de 1:1000 y sin ninguna garantía sobre la funcionalidad del DNA insertado), sería posible especular con la construcción de un mosquito genéticamente modificado que sea capaz de desplazar a las poblaciones naturales y que sea totalmente incapaz de transmitir malaria (e incluso otras enfermedades). Para esto es necesario no solo caracterizar genes que puedan conferir refractividad (tanto endógenos como de otros organismos) sino que también es necesario contar con una batería de promotores que los regulen de manera óptima para el bloqueo de la transmisión del *Plasmodium*. Lo anterior es una estrategia muy poderosa y moderna para el control biológico de enfermedades; es, por otro lado, motivo de muchas preocupaciones de tipo práctico y ético. Sin embargo, es de esperar de que todos estos impedimentos sean solucionables. Otro punto en el que el estudio de la biología molecular de los mosquitos toma importancia aparece cuando se estudian genes que podrían conferir resistencia o sensibilidad a diferentes tipos de insecticidas ya sean sintéticos como el DDT o biológicos como toxinas bacterianas (por ejemplo de *Bacillus turingensis*) o de otra fuente<sup>26, 27, 28</sup>.

Por último, el uso de técnicas de biología molecular nos permitirá monitorear los cambios en las estructuras de las poblaciones de los mosquitos anofelinos, así como en sus hábitos y capacidad como vectores, causados por la destrucción y modificación de los nichos ecológicos originales de éstos. También nos permitirá detectar la aparición de especies hasta ahora no descritas provenientes de sitios antes no accesibles<sup>29, 30</sup>.

## Porque estudiar a los mosquitos anofelinos

Por todas las razones antes expuestas es evidente que el estudio de la Biología Molecular de los mosquitos en general y de los vectores de malaria (anofelinos), en particular, tiene una gran relevancia tanto a nivel básico como aplicado. En cuanto a esto, vale la pena reiterar que solamente debido a la malaria hay aproximadamente 1,000,000 de muertes anuales<sup>14</sup>. Debido a que el mosquito *An. gambiae* es el vector de malaria responsable de la mayoría de los casos reportados (porque es muy antropofílico, agresivo y compatible con el *Plasmodium*) se ha convertido en el modelo internacional para el estudio de los mosquitos transmisores de esta enfermedad esto se ve solamente en el hecho de que en *An. gambiae* es en donde se han construido los mejores mapas y donde se han hecho la mayoría de los estudios en Genética Molecular. Este mosquito presenta grandes inconvenientes para su estudio *in vivo* en México por las siguientes razones:

- 1) Es endémico de África y no se encuentra en América, donde las condiciones climáticas son ideales para su proliferación. Esto significa que sería un acto de imprudencia introducir un vector tan eficiente en un país como México.
- 2) Las colonias no pueden ser muy grandes y son muy difíciles de mantener ya que requieren de ambientes controlados. Esto restringe el tipo de análisis genéticos que quedan a nuestro alcance.
- 3) El mosquito *An. gambiae*, es hematófago y requiere de al menos una ingesta sanguínea para producir huevos. Esto, aunado a que prefiere sangre humana, significa que la dificultad de mantener a la colonia aumenta. Sin embargo, el hecho de que la ovogénesis se induzca con la ingesta sanguínea es una ventaja para aquellos que, como nosotros, quieren estudiar este proceso.

Por otro lado, la Biología del Desarrollo de los anofelinos así como su proceso de ovogénesis son muy similares a los de los demás dípteros. Es por eso que

nosotros proponemos como una alternativa y complemento para estudiar *in vivo* los genes aislados de mosquitos anofelinos a la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* ya que este organismo además de ser un díptero, es el organismo metazoario mejor caracterizado tanto a nivel de Biología del Desarrollo como de Genética Molecular. Por esta razón presentare una descripción de la biología de *D. melanogaster* con la finalidad de mostrar las ventajas que presenta como modelo experimental.

### ***Drosophila melanogaster:***

#### ***Drosophila melanogaster* como modelo experimental**

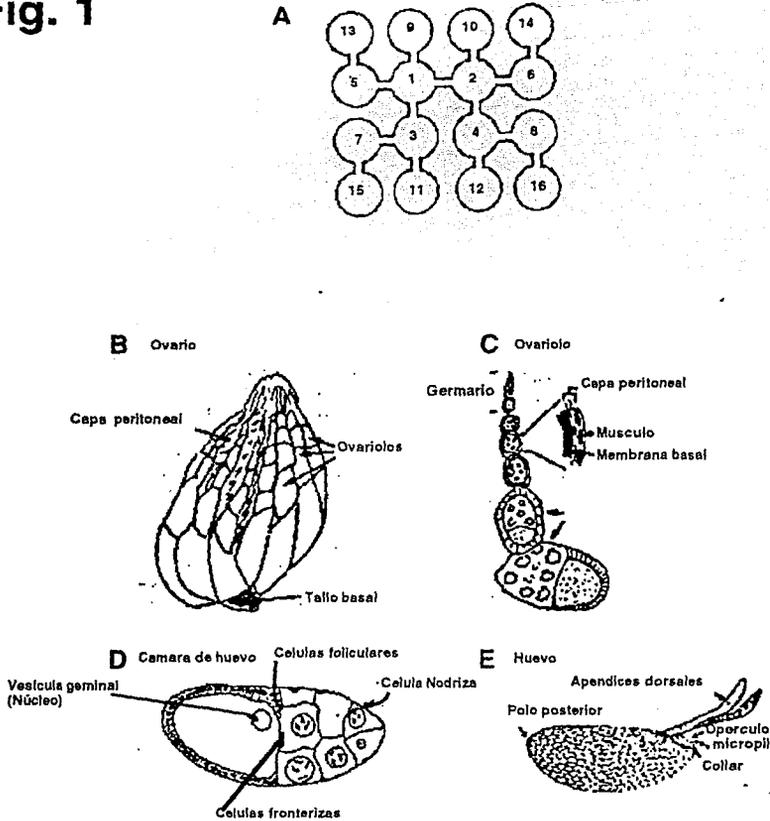
*Drosophila melanogaster* es un díptero y por lo tanto comparte muchas de las características del desarrollo de *An. gambiae*.

Las *Drosophilas* en la naturaleza se alimentan de levaduras que crecen naturalmente en la fruta. Es por eso que estas moscas se encuentran comúnmente en los fruteros domésticos. Este pequeño insecto es muy fácil de mantener en el laboratorio ya que se necesitan medios de cultivo muy simples, que idealmente van complementados con levadura viva de panadero. También se pueden mantener en medios de cultivo completamente definidos. Por otro lado su ciclo de vida es muy corto; dura de 15 a 20 días dependiendo de la temperatura y disponibilidad de alimento.

A nivel experimental, las ventajas que presenta *D. melanogaster* la hacen un modelo extraordinario.

a facilidad de cultivo permite tener grandes cantidades de moscas en el laboratorio y de mantener muchas líneas de mutantes distintas<sup>31</sup>. Uno de los atractivos más relevantes de este organismo es que su genética está perfectamente establecida y se cuenta con catálogos detallados de mutaciones mapeadas físicamente en cromosomas politénicos, de manera que el geneoma está saturado de éstas<sup>32</sup>. *Drosophila* genera cromosomas politénicos muy grandes y con una morfología muy definida lo cual los hace ideales para hacer experimentos de citogenética en donde se ven cambios en los patrones de bandeo de los cromosomas causadas por mutaciones (por ejemplo rearrreglos). Los cromosomas politénicos también son ideales para realizar experimentos de hibridación *in situ* lo que permite mapear la localización cromosómica del gen de interés sin la necesidad de hacer un análisis genético detallado.

**Fig. 1**



**Fig. 1.- A)** Relación y notación standard de las células generadas por una célula germinal en una cámara de huevo, solo las células numeradas 1 y 2 tiene capacidad de convertirse en huevo (no se sabe como deciden cual va a ser), las otras 15 se convierten en células nodriza. **B)** Anatomía del ovario. **C)** Esquema de un ovariole. Note las distintas etapas en la construcción de un huevo (los estadios más tempranos se encuentran en la parte superior, que corresponde a la zona más anterior de ovario.) **D)** Cámara de huevo tardía (estadio 10). La célula que va a dar origen al huevo ya es mucho más grande que las nodrizas y las células foliculares ya están recubriéndola. **E)** Huevo maduro listo para la fecundación, las estructuras exteriores están hechas de corion y fueron secretadas por las células foliculares que son de origen materno. (Tomado de \* The Developmento *Drosophila melanogaster*\* Michael Baie and Alfonso martinez Arias. Cold spring Harbor Laboratory Press, 1993.

Gracias a las características mencionadas arriba, *D. melanogaster* cuenta con los mejores mapas genéticos físicos y de encadenamiento genético que existen para cualquier metazoario<sup>32</sup>.

Otra de las grandes ventajas que presenta *D. melanogaster* es que su desarrollo embrionario es muy fácil de observar.

Además existen técnicas para mutageneizar y transformar a *D. melanogaster* con una gran eficiencia mediante la utilización de elementos transponibles llamados elementos "P". Estos no solo son mutágenos inespecíficos, sino que también sirven como vectores de transformación y para capturar zonas de alta actividad transcripcional (enhancer traps)<sup>31</sup>.

#### Ciclo de vida:

El ciclo de vida de *D. melanogaster* comienza cuando un huevo fecundado es ovopositado, del cual eclosiona una larva en aproximadamente 24 hrs. (a 18°C). La larva pasa por 3 estadios llamados "instars" en un período de 5 días. En este período no existe una diferencia morfológica macroscópica evidente entre los diferentes "instars", aparte del aumento de tamaño. En el transcurso de estos días las larvas se alimentan y se mantienen enterradas en el medio de cultivo dejando afuera solamente los espiráculos posteriores. Esto se prolonga hasta que la larva consigue un peso mínimo de 0.3 mg. Una vez que alcanza ese peso puede retirársele la comida y seguirá teniendo una pupación normal tras la cual generará a un adulto. Una vez que la larva llega al final del período de alimentación entra en una etapa de vagabundeo que antecede la entrada al período de pupación.

El proceso de pupación es reversible en sus primeras etapas antes de que el *pupario* (tegumento exterior de la larva) se endurezca: si la larva es molestada

severamente en este período es capaz de activarse nuevamente, vagabundea otro poco y luego prosigue normalmente el proceso de pupación. Sin embargo cuando el pupario se endurece, la pupación se vuelve irreversible.

Durante la pupación la mayoría de los tejidos de la larva se lisan y hay una muerte celular masiva, los tejidos que van a formar parte del adulto se generan a partir de 19 "discos imagales" cada uno de los cuales es precursor de algún órgano. Los discos imagales son reconocibles desde el primer "instar". Estos se encuentran determinados para construir el órgano para el cual están programados. Los discos imagales tienen memoria y no pierden su determinación aún después de varios pases de cultivo. Solamente, el sistema nervioso de la larva es "reciclado"; es decir, no se desintegra y es utilizado tanto en la larva como en el adulto. En el transcurso de la pupación hay una gran proliferación celular en los discos imagales, esta proliferación se lleva a cabo utilizando los recursos generados a partir de los otros tejidos larvarios. El proceso de pupación dura aproximadamente 9 días y después de este emerge un adulto (imago) capaz de reproducirse con lo que el ciclo puede volver a iniciarse.

Una mosca adulta puede vivir hasta 50 días, y en el transcurso de su vida una hembra puede producir hasta 3000 huevos, aunque en condiciones no óptimas lo normal es que produzca de 700 a 1000. El macho puede tener una progeneie de hasta 30,000 moscas<sup>31</sup>.

#### Copulación e inicio de la ovogénesis.-

La mosca hembra copula unas horas después de que eclosiona de la pupa y deposita el semen en su espermateca, en la cual tiene capacidad para almacenar alrededor de 1000 espermatozoides por varias semanas.

La ovogénesis comienza cuando la hembra esta bien alimentada y su mantenimiento depende de la disponibilidad de alimento. Antes de que comience el proceso de ovogénesis los ovarios son pequeños e indiferenciados, pero una vez comenzada ésta, los ovarios, crecen y pueden llegar a pesar la mitad de la masa de la hembra (una hembra en producción pesa el doble que un macho)<sup>31</sup>.

### Ovogénesis

La ovogénesis es uno de los procesos biológicos mas fascinantes que existen. La célula que va a dar origen al huevo sufre una serie de modificaciones extraordinarias que tienen como fin último la fecundación. Es en esta etapa, cuando el ovocito ha sido determinado, donde comienza el establecimiento de patrones de desarrollo y la construcción de un organismo multicelular. Se podría decir que el desarrollo de un organismo comienza estrictamente con la ovogénesis. Los pasos relativamente simples del comienzo de la ovogénesis nos permiten enfocar nuestros esfuerzos para comprender lo que se podría llamar la programación de un proceso de desarrollo. La fisiología de la célula se modifica profundamente durante el proceso de ovogénesis; el ciclo celular se vuelve meiótico, existen rearrreglos cromosómicos y cambia la relación entre el volumen citoplasmático y nuclear.

Es muy importante hacer notar que la mayoría de los organismos aíslan a sus células germinales de las somáticas muy temprano en el desarrollo, de manera que éstas no sufran las modificaciones que se llevan a cabo en las células somáticas. Sin embargo, durante la ovogénesis las células germinales deben de interactuar con células somáticas para llevar a cabo la construcción del huevo. Esta interacción sitúa a las gónadas en una categoría de regulación e interacción celular distinta a todos los demás tejidos<sup>33</sup>.

Al ver un proceso cuya importancia es tan grande, tan complejo y rico, no es de sorprender el interés que el fenómeno de la ovogénesis ha causado siempre a los biólogos.

### Anatomía del ovario.-

Para poder preguntarnos que es lo que pasa durante la ovogénesis es necesario que tengamos una idea de la anatomía del ovario (Fig. 1 B). Un ovario típico contiene aproximadamente 16 ovariolos de los cuales cada uno de ellos representa una línea independiente de ensamble de huevos (Fig. 1 C). Cada ovario tiene en su punta anterior un grupo de células somáticas y germinales llamado germario. Cuando las células germinales de un germario se dividen se organizan en estructuras conocidas como "cámaras de huevos"<sup>33</sup>. Una cámara de huevo empieza a construirse cuando una célula germinal del germario se divide anómalamente, de manera que no completa la citocinesis y quedan dos células unidas por un puente citoplásmico (Fig. 1 A), este proceso se repite cuatro veces dando lugar a un "quiste" de 16 células de origen clonal interconectadas entre sí. De estas 16 células solo dos tienen 4 interconexiones, una de las cuales se convertirá en el huevo y las otras 15 en células nodrizas (las 16 células de la cámara de huevo nunca pierden los puentes citoplasmáticos). La función de las células nodrizas es sintetizar los componentes del huevo. Para lograr esto las células sufren una amplificación de su DNA por el proceso de politenización, lo que aumenta dramáticamente su capacidad de síntesis<sup>34</sup>.

Una vez que las cámaras de huevos están formadas, salen del germario y continúan migrando hacia la parte posterior del ovario (y de la mosca) mientras continúa el desarrollo del ovocito. Cada ovario contiene cinco o seis cámaras de huevos en distintas etapas de desarrollo. Cada una de estas cámaras están

recubiertas por células foliculares y están interconectadas entre si por células interfoliculares (Fig. 1D). Cada cámara de huevos que ha salido del germario esta constituida por 3 tipos distintos de células; el ovocito, con su núcleo prominente o vesícula germinal, el cual esta conectado a quince células nodrizas y todo esto esta cubierto por aproximadamente 1000 células foliculares.

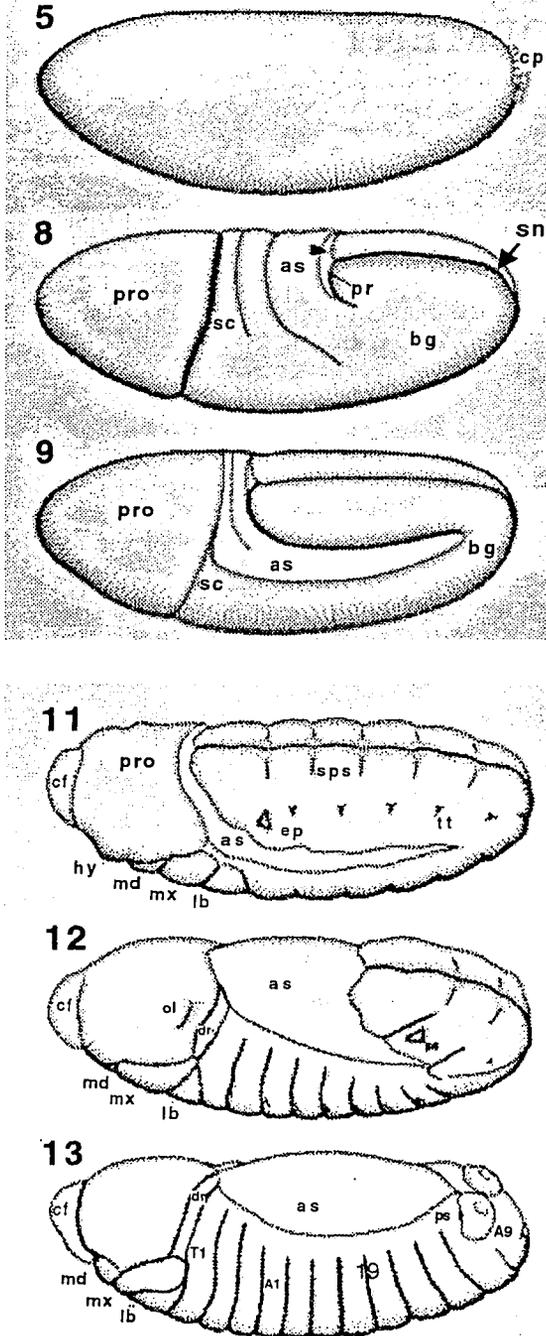
Los ovariolos están separados entre si por las paredes ovariolares. Esta pared mantiene a los ovariolos alineados entre si. Toda esta estructura es mantenida en su lugar por tejido conectivo. Este es llamado capa peritoneal e incluye una gran abundancia de traqueas que están encargadas de oxigenear al ovario. La ovogénesis se divide en 14 etapas delimitadas de manera mas o menos arbitraria. En las etapas mas tempranas se puede ver el aumento en el tamaño del ovocito y de las células nodrizas. En las etapas intermedias se observa la aparición de estructuras del ovocito maduro. Finalmente, en las etapas más tardías el núcleo de las células nodrizas se fragmenta y el citoplasma y los organelos son "bombeados" hacia el ovocito. Eventualmente las células nodrizas desaparecen. Durante este proceso las células foliculares rodean al ovocito, secretan "corion" que constituye al cascarón y producen las estructuras exteriores del huevo (ver fig. 1 E)<sup>33</sup>.

Este patrón de ovogénesis se llama "meroístico" y es característico de Dípteros y de Coleópteros<sup>34</sup>.

#### El desarrollo temprano del embrión.-

El desarrollo temprano del embrión de *D. melanogaster* es uno de los fenómenos biológicos mejor descritos. A continuación se presenta un listado de los eventos más relevantes en el embrión de *D. melanogaster* desde que es fecundado hasta el término de la gastrulación.

fig. 2



**Fig. 2.-** Desarrollo embrionario de *D. melanogaster* : La embriogénesis comienza cuando el núcleo del huevo fertilizado comienza a dividirse en 13 divisiones rápidas y sincrónicas (etapa: 1-4). La mayoría de los núcleos así generados se distribuyen homogéneamente en una sola capa de la superficie del huevo, esto lleva al blastodermo celular (etapa 5). En esta etapa algunas células (34-37) migran al polo posterior y se convierten en células polares (cp) que van a dar origen a la línea germinal. Es en este momento cuando comienza la gastrulación. **Etapa 8:** en esta etapa se determina la zona que va a dar origen a la cabeza (procéfalo = pro) y se forma el surco céfalico (sc), el más longevo de los surcos característicos de la embriogénesis. También en esta etapa se diferencia la banda germinal (bg) y se separa a la amnioserosa (as) del tejido proliferativo. La frontera entre la amnioserosa y la banda germinal está determinada por la invaginación aminoproctodeal (pr). En las siguientes etapas la banda germinal se elonga y se dobla sobre sí misma para generar tres capas (ectodermo, mesodermo y endodermo) las cuales van a dar origen a los distintos órganos larvarios y a los discos imagales. Es en la etapa 11 cuando se determinan los dominios larvarios y se delimitan los segmentos con los surcos parasementales (sps) también en este momento se determinan los tubos traqueales (tt) y los espiráculos posteriores (ep). En la etapa 13 todos los órganos son reconocibles en el embrión y los segmentos larvarios también están completamente establecidos (T1=segmento torácico 1, A1=segmento abdominal 1, A9=segmento abdominal 9). tomado de Volker Hartenstein, 1993, Atlas of *Drosophila* Development. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Una vez fecundado dentro del oviducto, el núcleo del ovocito que se encuentra en metafase I termina la meiosis y los dos pronúcleos se fusionan. Una vez fecundado el embrión, es ovopositado y su núcleo comienza una serie de divisiones sincrónicas con un período muy corto. Al cabo de 13 divisiones nucleares se generan 8192 núcleos, formándose una célula multinucleada. Los núcleos migran y se reparten homogéneamente en una sola capa abajo de la superficie del huevo, generando lo que se llama el blastodermo sincicial. Una vez que los núcleos se distribuyeron solo queda yema en el centro del embrión. La membrana plasmática comienza a invaginarse alrededor de los núcleos, hasta que éstos quedan envueltos por membrana citoplásmica formándose finalmente células aisladas. Este estadio es llamado blastodermo celular y es el inmediato anterior al comienzo de la gastrulación. Para este momento, las células que van a dar origen a la línea germinal ya están determinadas y se encuentran agrupadas en un cúmulo en la parte posterior del embrión; estas células son llamadas células polares. Una vez formado el blastodermo celular comienza la gastrulación cuyas características más llamativas son la formación de dos surcos, el surco cefálico que rodea completamente al embrión y delimita la zona que va a ser ocupada por la cabeza y todas sus estructuras, y el surco neural que sale a partir del surco cefálico a lo largo de la zona ventral, pasa a través del polo germinal y termina aproximadamente a la mitad del embrión en la parte dorsal. A partir de la zona donde termina el surco neural hasta la parte dorsal del surco cefálico las células ceden y permiten la aparición de la amnioserosa (la yema del huevo) en la superficie del embrión (Fig. 2). En las etapas tardías de la embriogénesis todas las células se concentran en lo que se llama la banda germinal que esta se forma alrededor del surco neural. Durante estas etapas el número de células aumenta, y se redistribuyen en tres capas. Es entonces cuando se forman los surcos parasegmentales y se

determina los segmentos de la larva y se generan los discos imagales quedando así definidos los dominios de los órganos adultos<sup>35</sup>. Todo el proceso de embriogénesis dura aproximadamente 20 hrs. y culmina con la eclosión de una larva de primer "instar" que continúa el ciclo.

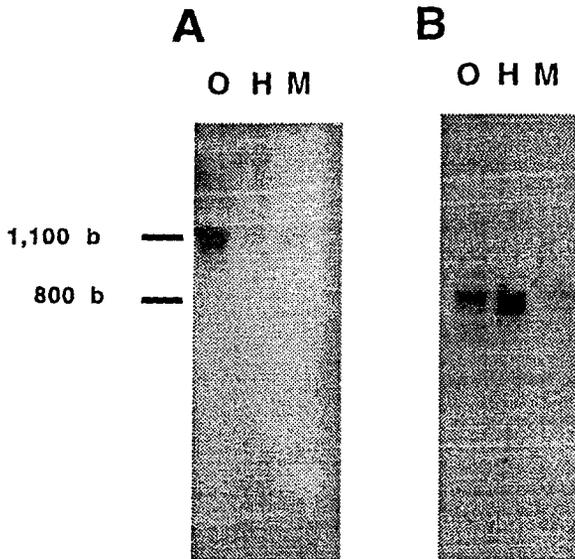
### **Antecedentes:**

Como ya mencionamos antes, uno de los intereses básicos de nuestro laboratorio consiste en explicar a nivel molecular algunos de los eventos que suceden durante la ovogénesis en los dípteros y cuales son las moléculas que intervienen en este proceso.

La estrategia tradicional para identificar un gen relevante para un proceso dado consiste en encontrar una función y a partir de ella determinar cuales son las moléculas responsables de ésta. Este proceso se puede llamar "Genética Directa" y consiste en el aislamiento de un mutante cuyo fenotipo es observable y a partir de este, definir la región del genoma que contiene al gen de interés utilizando diversas metodologías genéticas. Solamente una vez que el locus se encuentra perfectamente definido se puede pensar en caracterizarlo molecularmente. Esta estrategia si bien es muy poderosa, tiene grandes inconvenientes: I) Es estrictamente necesario contar con un fenotipo observable. Situación que limita el número de estrategias accesibles. II) Solo se pueden aislar genes cuyo fenotipo mutante no sea letal dominante. III) Los experimentos de genética son muy largos y requieren de mucha experiencia metodológica. IV) Para poder observar mutaciones cuya probabilidad es baja es necesario mantener poblaciones sumamente grandes de moscas. V) El sistema de selección es estrictamente "visual" lo que implica muchas horas hombre de trabajo (fuerza bruta).

Gracias al avance de técnicas moleculares es posible aislar genes relevantes mediante el uso de una lógica inversa al proceso descrito en el párrafo anterior, es decir primero aislar un gen que pudiera ser relevante para un proceso y después preguntarse cual es su función y relevancia ( fenotipo). El proceso de "Genética Reversa", puede tener el inconveniente de que se puede perder el contexto de la biología del organismo con el que se esta trabajando, sin embargo, esta estrategia es una alternativa a la "Genética Directa".

Entre las diversas estrategias que se siguen en nuestro laboratorio decidimos intentar aislar genes relevantes en la ovogénesis utilizando un enfoque de "Genética Reversa" de los procesos de maduración del ovario y ovogénesis en dípteros. Siguiendo la lógica antes mencionada se hizo un "Tamizado Diferencial". Este enfoque nos pareció particularmente adecuado ya que es posible controlar e identificar el inicio del proceso de ovogénesis debido a que es inducible en *An. gambiae* y además, es relativamente fácil disecar grandes cantidades de ovarios prácticamente sin contaminación de otros tejidos y por lo tanto de mRNA específico, como testigo se utilizo mRNA de hembras totales sin ovarios. Para este tamizado se construyo un banco de cDNA de ovarios de 48 hrs. después de inducidos por una alimentación sanguínea. Este banco se tamizó diferencialmente utilizando como sonda RNA total extraído de carcass de hembras sin ovario (hembras enteras a las cuales se les había extraído los ovarios) contra RNA total de ovario. Mediante esta estrategia se logro aislar un transcrito que estaba muy enriquecido en este tejido. Utilizando la técnica de "Northern blot" se determinó que este transcrito parece ser de un peso molecular de 1000 bases y es aproximadamente 20 veces mas abundante en el ovario que en el resto del mosquito hembra y que en machos enteros. Sin embargo nunca es particularmente abundante. (Fig. 3) Esta clona fue denominada Clona 3 (c3), se secuenció y se encontró que contenía un cDNA



**Fig. 3.-** Northern blot utilizando como sonda al cDNA de c3 de *An. gambiae*. RNA total de ovario (O), hembras sin ovario (H) y machos (M), observese que el transcrito se encuentra mucho mas enriquecido en el ovario con respecto al resto del mosquito. B) Como control de la cantidad de RNA cargado en el gel se utilizo el mismo filtro que en "A" pero hibridado con otro cDNA inespecifico obtenido en el tamizado difencial en el que se obtuvo el transcrito de c3. La hibridación se llevo a cabo en condiciones de alta astringencia (50% formamida a 42°C).

completo que codifica para una proteína muy básica de 269 aminoácidos (aa.) de los cuales el 20% son básicos (33 Lisinas y 15 Argininas).

La secuencia se comparó con el banco de secuencias Genbank y demostró tener homología con genes recién descritos que podrían estar implicados en el control de la proliferación celular a todo lo largo de la escala filogenética (esto será discutido mas adelante).

### **Objetivos:**

El objetivo general de este trabajo fue la caracterización funcional del gen c3 de *An. gambiae* y *D. melanogaster*.

Por las razones de índole metodológico que se mencionaron en la introducción, todos los análisis *in toto* así como la mayor parte de la extracción de material biológico fueron llevados a cabo en *D. melanogaster*.

### **Objetivos Particulares:**

#### **I) Determinación de la estructura genómica y regulación del gen c3:**

- A) Aislamiento de la clona genómica de c3 de *An. gambiae*.
- B) Identificación y secuenciación del extremo 5' regulatorio.
- C) Identificación del sitio de inicio de la transcripción mediante un ensayo de primer extension.
- D) Cuantificación de la transcripción de c3 en distintas fases del desarrollo larvario de *D. melanogaster*.

#### **II) Análisis de homología de c3.**

- A) Alineamiento múltiple de las secuencias peptídicas de c3 vs homólogos de diversos organismos (de levadura a mamíferos)
- B) Alineamiento de las secuencias peptídicas de c3 de *D. melanogaster* vs *An. gambiae*.

### III) Caracterización de la expresión y localización del producto de c3 el desarrollo *D. melanogaster* .

- A) Clonación de la región codificadora del gen c3 en el vector de expresión pGEX1.
- B) Purificación de la proteína de fusión y producción de anticuerpos anti-c3.
- C) Western blot de los distintos estadios larvarios.
- D) Inmunocitoquímica de ovarios enteros.
- e) Inmunocitoquímica de embriones enteros.

#### Materiales y métodos:

##### Medios

Los embriones de *D. melanogaster* fueron colectados en el siguiente medio (Uva)<sup>45</sup>:

500 ml Boing de Uva.  
596 ml H<sub>2</sub>O.  
24 g Bacto Agar.  
100 g Sacarosa.  
20 g Levadura seca activa (de panadero).  
2.75 ml NaOH 10N

Mezclar todo menos el NaOH calentar lentamente en el mechero hasta que se disuelva todo, cuando rompa a hervir agregar el NaOH mezclar bien y alicuotar en matraces y autoclavear a 120°C por 20 min.

Los stocks de *Drosophila* se mantuvieron en el siguiente medio de cultivo (muy rico)

10 g Levadura.  
10 g Dextrosa.  
35 g Bacto Agar.

Aforar a 100 ml y autoclavear a 120°C por 20 min. Agregar 0.5 ml de la solución Stock de Nipagin justo antes de usar. Espolvorear levadura en polvo al gusto.

Nipagin Solución Stock<sup>45</sup>:  
(fungicida para *Drosophila* )

25 ml H<sub>2</sub>O  
475 ml Etanol  
50 g Nipagin

## **Métodos:**

En este trabajo se utilizó la línea de *D. melanogaster* "oregon", y la de *An. gambiae* "suococo".

Todas las enzimas de restricción usadas en este trabajo fueron comerciales y se utilizaron de acuerdo a las indicaciones del proveedor.

**Purificación de RNA:** el RNA total se extrajo en todos los casos según el protocolo de Chomczynski et al (1987)<sup>37</sup>

**Northern y Southern Blot:** el DNA se fragmentó utilizando enzimas de restricción y se separó de acuerdo a su peso molecular en geles de agarosa en buffer de boratos. El RNA se separó según su peso molecular en geles desnaturizantes de agarosa con formaldehído.

Los ácidos nucleicos se transfirieron por capilaridad a una membrana de Nylon (Hybond N+, Amersham)

Las sondas se marcaron con diversos juegos "Kits" comerciales y se siguieron las instrucciones que venían incluidas en ellos.

Las sondas se hibridaron con los ácidos nucleicos de acuerdo al protocolo de Sambrook et al.<sup>38</sup>

## **Hibridaciones en colonia:**

Contamos con una biblioteca de cDNA de ovario de *An. gambiae* construida en el vector lambda Zap y con una biblioteca geneómica construida en lambda Dash, estas se usaron para infectar bacterias de las cepas Sure y p2392 respectivamente. La transferencia de las colonias se hizo en filtros de nitrocelulosa en condiciones muy estrictas (50% formamida) de acuerdo al protocolo de Sambrook et al 1989<sup>38</sup>.

## **Clonación del cDNA de c3 en el vector pGEX1<sup>39</sup>**

Con la intención de expresar a la proteína codificada por c3 en un sistema bacteriano, la región codificadora del cDNA de c3 fue clonada en fase con la glutation -S-Transferasa en el sitio BamHI del vector pGEX1 construyéndose así el pGEX1-c3<sup>39</sup>

La proteína de fusión resultante fue purificada de acuerdo al protocolo de Current protocols in Molecular biology<sup>40</sup> Brevemente: se crecieron células DH5 $\alpha$  que contienen el plasmido pGEX1-c3 en 2 ml de medio con ampicilina (100 $\mu$ g/ml) por 5 hrs. 37°C con agitación. (con un inoculo de 1:1000).

La producción del péptido de fusión se indujo con IPTG 0.1 mM final después de esto se incubaban 2 hrs más a 37°C con agitación. Las bacterias así inducidas se concentraron en tubos ependorf por centrifugación y se resuspendieron en 300 $\mu$ l de PBS helado. Las células se lisaron por ciclos de congelación-descongelación o por sonicación y se les agregó 50 $\mu$ l de resina (agarosa-s-glutatin al 50%

lavada 3 veces en PBS). Esto se mezcló suavemente por 2 min. a temperatura ambiente, se agrego 1 ml de PBS helado y se centrifugó por 5 seg. Se tiró el sobrenadante y se repitió el lavado 3 veces. La proteína de fusión se eluyó incubando a la resina 2 min. a temperatura ambiente con 50  $\mu$ l de Glutación reducido 5 mM. Se centrifugó y se guardó el sobrenadante. La proteína obtenida se cuantificó con el método de Bradford<sup>41</sup> y se analizó en geles desnaturalisantes de poliacrilamida<sup>42</sup>

### **Inmunización de Ratones<sup>43</sup>**

Los ratones fueron Sangrados para aislar suero preimmune y después inmunizados 1 vez utilizando 5  $\mu$ g/50  $\mu$ l de proteína de fusión c3-glutation-S-Transferasa emulsionada con 50  $\mu$ l de Coadyuvante completo de Freunds. A este tratamiento siguieron dos inmunizaciones con 5  $\mu$ g/50  $\mu$ l de proteína de fusión c3-glutation-S-Transferasa emulsionada con coadyuvante Freunds incompleto. El tiempo transcurrido entre cada inmunización fue de dos semanas. Después de la última inmunización los ratones fueron sangrados y el título de los anticuerpos generados se midió en un ensayo de "western blot".

### **Western blot<sup>44</sup>**

Las proteínas fueron corridas en geles desnaturalisantes de poliacrilamida<sup>50</sup> y electrotransferidas a corriente constante (0.5 amperes) por 30 min. a 4°C en buffer de transferencia (3.03g Tris-base y 14.5g de Glicina en un litro de H<sub>2</sub>O). Las proteínas ya transferidas al papel de nitrocelulosa fueron detectadas utilizando los anticuerpos obtenidos con el protocolo de inmunización descrito arriba. El complejo IgG antigéneo fue revelado utilizando el "Kit" de detección Protoplot de "Amersham" para detectar IgG de ratón (Anti IgG de ratón acoplado a fosfatasa alcalina).

### **Secuencia de DNA mediante el método de terminación por ddNTPs<sup>45</sup>**

Se utilizó el "Kit" de secuencia con secuenasa versión 2.0 (DNA polimerasa de fago T7) de United States Biochemical, de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

**Inmunocitoquímica** (Adaptado del protocolo de inmunocitoquímica de Sara Bray del laboratorio de Fotis C. Kafatos )

Brevemente:

Se colectaron embriones menores de 16 hrs puesto que embriones mas viejos son impermeables debido a la deposición de cutícula.

Los embriones se descorionaron 5 min. en Hipoclorito al 5% y se lavaron con agua extensamente.

Una vez decorionados los embriones se fijaron 20 min. en Engreiled Fix Buffer (140 mM KCl, 40 mM NaCl, 4 mM EGTA, 1 mM Espermidina, 0.2%  $\beta$ -Mecapto-etanol, 30 mM PIPES pH 6.9, Formaldehído 4%) y un volumen igual de n-heptano en agitación suave.

Para devitelinizar a los embriones se removió la fase acuosa y se agregó un exceso de metanol, éste se sustituyó por mas metanol fresco.

El metanol se desechó y los embriones se lavaron con etanol en el cual se incubaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  por lo menos por 12 hrs.

Se removió el etanol y los embriones se hidrataron con BSS 1X ((5X) 1.6 g NaCl, 1.5 g KCl, 0.9 g  $\text{MgSO}_4$ , 0.345 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{HO}$ , 0.85 g Tricina, 1.8 g Glucosa, 8.5 g Sacarosa, Aforar a 100 ml y esterilizar por filtración.) durante 5 min.

Los embriones se lavaron 2 veces con BBT (BBT = TBS + 0.5% BSA + 0.05% Triton X-100.) por 10 min. cada una a temperatura ambiente y en agitación.

El BBT se renovó y se incubo 10 hrs a temperatura ambiente en agitación, esto hace que los embriones se permeabilisen. Una vez permeabilizados se agregó el anticuerpo adecuado en la dilución correcta en BBT.

Los embriones se incubaron 12 hrs. en presencia del anticuerpo a  $4^{\circ}\text{C}$  en agitación.

Todos los pasos siguientes se hicieron a partir de este paso a temperatura ambiente y en agitación.

Los embriones se lavaron 3 veces en BBT por 15 min. cada una despues se lavaron 3 veces en TBST (TBST = TBS + 0.05% Tween.) por 10 min. cada una. Después de los lavados se agregó el anticuerpo secundario a la dilución correcta en TBST y se incubo por 3 hrs.

los embriones se lavaron 5 veces en TBST por 5 min., 3 veces en TBS por 10 min. y 3 veces en buffer de Fosfatasa alcalina. Este se substituyó con buffer de fosfatasa con sustrato (100 mM NaCl, 100 mM Tris-Base pH 9.5, MgCl 5 mM, Nitroblutetrazolium 0.15 mg/ml y BCIP 0.33 mg/ml).

El revelado se monitoreo en el microscopio de disección y la reacción se paró con TBS (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl); los embriones se lavaron por lo menos 3 veces con TBS antes de montar y almacenar.

Es posible hacer transparentes a los embriones con salicilato de metilo mediante una deshidratación con una serie de etanoles (50, 70, 80, 90 y 100%). Una vez deshidratados se substituye al etanol al 100% con salicilato de metilo y se montan en el mismo salicilato donde hay que verlos inmediatamente.

## **Estrategia experimental y resultados:**

### **I) Caracterización de la zona reguladora del gen c3 de *An. gambiae*.**

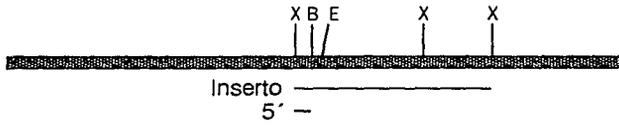
#### A) Aislamiento de la clona genómica de c3.

Con el objetivo de caracterizar la zona reguladora de c3 hicimos un tamizado de una biblioteca genómica construida en lambda DASH<sup>98</sup>, utilizando como sonda al cDNA de c3 (Fig. 4 A). Con esta estrategia aislamos una clona genómica que se denominó 6222 de aproximadamente 5000 pares de bases flanqueado por los sitios XbaI.

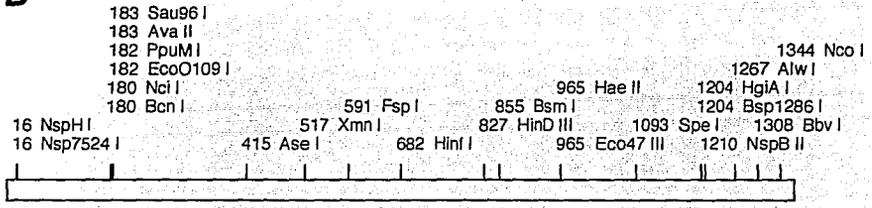
#### B) Identificación y secuenciación del extremo 5' regulatorio.

A esta clona se le hizo un análisis de sitios de restricción y se determinó que contenía a la zona codificadora (por hibridación con el cDNA) del gen c3 mas un fragmento de aproximadamente 1500pb que se liberaba con una doble digestión con las enzimas XbaI y BamHI. Asumimos que éste fragmento genómico contenía secuencias "río arriba" del codón de inicio de la traducción (ATG) ya que sabíamos que había un sitio único para BamHI en la región codificadora del cDNA de c3. Esto se comprobó mediante una hibridación de "Southern blot" utilizando como sonda el fragmento del cDNA de c3 que abarcaba de los sitios a parte mas 5' del transcrito así como 60 pb de la región codificadora. El fragmento 5' XbaI-BamHI fue subclonado en los vectores MP18 y MP19 para luego ser secuenciado con lo que se confirmó que correspondía al extremo 5' de la clona genómica y que contenía 1350 pb por arriba del codón de iniciación ver Fig. 4 B.

**A**

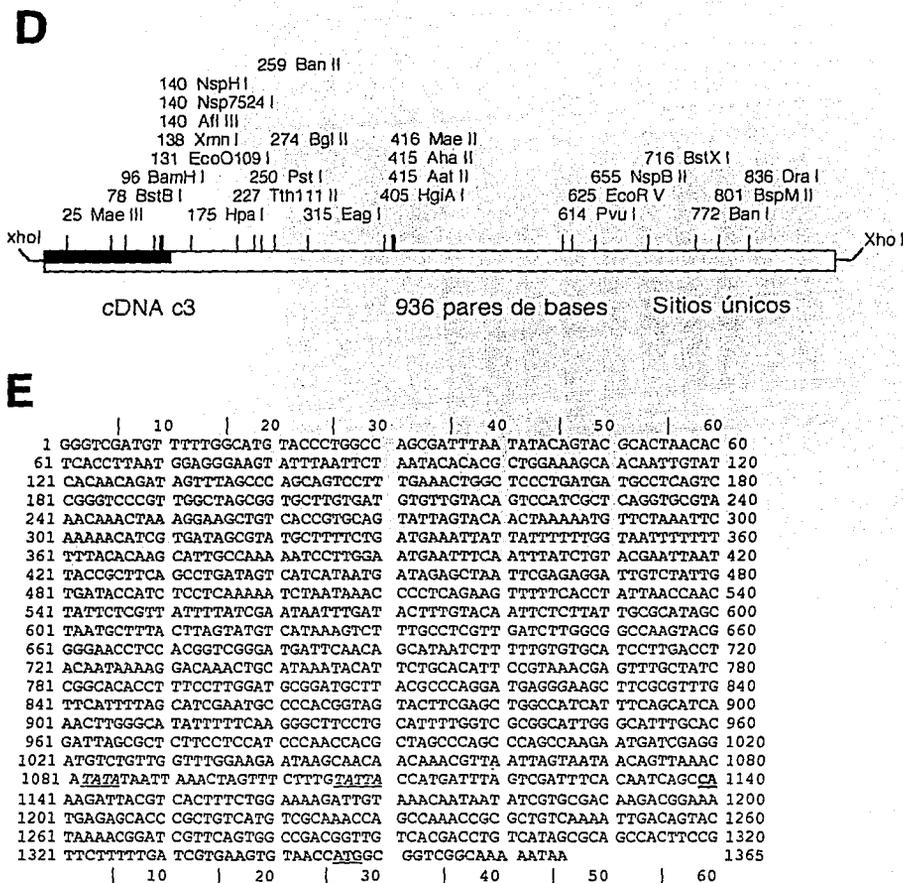


**B**



**C**





**Fig. 4.- Estructura de las clonas genómica, de cDNA y reguladora del gen c3.**  
 A) Mapa de restricción de la clona genómica de *An. gambiae*, de c3. B) Mapa de restricción del fragmento XbaI Bam HI de la zona reguladora del gen c3 (solo se muestran sitios únicos). C) Primer extensión de c3. D) Mapa de restricción del cDNA de c3 (solo se muestran sitios únicos), la barra negra representa a la sonda utilizada para aislar al extremo 5' regulador. E) Secuencia de la zona reguladora del gen c3 de *An. gambiae*: el sitio de inicio de la traducción está subrayado, el sitio de inicio de la transcripción (-205) está subrayado y en negrillas y dos posibles cajas "TATA" a -225 y -240 en itálicas y subrayados.

### C) Identificación del sitio de inicio de la transcripción.

Una vez conocida la secuencia de la zona reguladora de c3 decidimos conocer el sitio de inicio de la transcripción como parte de la caracterización de este promotor. Esto se hizo mediante un ensayo de "primer extention" y se determino que la transcripción comienza a 205 pb "rio arriba" del codón de inicio Fig. 4B.

### D) Cuantificación de la transcripción de c3 en distintas fases del desarrollo larvario de *D. melanogaster*.

El hecho de que se había reportado que el producto de los genes homólogos a c3 podría estar involucrados en el control del desarrollo o de la proliferación celular nos llevó a determinar si la cantidad de transcrito varía con respecto al estado de desarrollo de los embriones de *D. melanogaster* y *An. gambiae*. Por esta razón se hizo un "Northern blot" de diferentes fases del desarrollo, utilizando RNA total de *An. gambiae* de los primeros tres instars para cuantificar los cambios en los niveles de transcripción. En la Fig. 6 A. se puede ver que la cantidad de transcrito se mantiene constante durante el desarrollo de *Drosophila.*, cosa que no esperábamos ya que creíamos que la expresión esta regulada durante el desarrollo.

## **II) Análisis de homología de c3.**

### A) Alineamiento de secuencias peptídicas de c3 vs homólogos de diversos organismos.

Hicimos una búsqueda en la base de datos Genbank utilizando al algoritmo de Tfasta y descubrimos que el gen c3 estaba muy conservado en la escala filogenética, en la (fig. 5A) se observa un alineamiento múltiple hecho con la utilería "pileup" con secuencias de cDNA homólogos a c3 donde es evidente el

altísimo grado de conservación que tiene la proteína codificada por c3 y sus homólogos a lo largo de la escala evolutiva. En el caso de la levadura la

**A**

	1				50
an	MAVGKNGKVS	KGGKKGSKKK	VVDPFTRKDW	YDVKAPNMFK	NRPVGKTLVN
droso	MAVGKNGKVS	KGGKKGSKKK	VVDPFSRKDW	YDVKAPNMFK	NRQSGKTLVN
arroz	MAVGKNNKRIS	K.GKKGGSKKK	TVDPFARKDW	YDIKAPSVFN	VRNIGKTLVS
catr	MAVGKNNKRIS	K.GKKGGSKKK	AADPFARKDW	YDIKAPSVFS	VRNIGKTLVT
homo	MAVGKNNKRLT	KGGKKGAKKK	VVDPFSKKDW	YDVKAPAMFN	IRNIGKTLVT
rat	MAVGKNNKRLT	KGGKKGAKKK	VVDPFSKKDW	YDVKAPAMFN	IRNIGKTLVT
mus	.....RLT	KGGKKGAKKK	VVDPFSKKDW	YDVKAPAMFN	IRNIGKTLVT
aplicia	MAVGKNNKRLT	KGGKKGAKKK	VVDPFTRKEW	YDIKAPSMFA	VRIGKTLVT
ce	MAVGKNN.N	KMGKKGSKKK	AVDPSRKDW	YDIKAPMNFN	TRQVQKTLIN
sac	MAVGKNNKRLS	R.GKKGLKKK	VVDPFTRKEW	FDIKAPSTPE	NRNVGKTLVN
	51				100
an	RTQGTKIASD	GLKGRVFEVS	LADLQNEPDA	ERSFRKFKLV	AESVNGRDVL
droso	RTQGTKIASD	GLKSRVFEVS	LADLQNEP.I	ERSFRKFKLV	AESVNGRDVL
arroz	RTQGTKIASE	GLKHRVFEVS	LADLQNDE..	DQAYRKIRLR	AEDVQGNVL
catr	RTQGTKIASE	GLEHRVFEIS	LADLQGDE..	DHSFRKIRLR	AEDIQGNVL
homo	RTQGTKIASD	GLKGRVFEVS	LADLQNDE..	V.AFRKFKLI	TEDVQGRNCL
rat	RTQGTKIASD	GLKGRVFEVS	LADLQNDE..	V.AFRKFKLI	TEDVQGRNCL
mus	RTQGTKIASD	GLKGRVFEVS	LADLQNDE..	V.AFRKFKLI	TEDVQGRNCL
aplicia	RSQGTKIASD	NLKGRVFEVS	LADLQNDE..	V.TFRKFKLI	AEZVGRNVL
ce	RTQGTKIASE	GLKGRVFEVS	LDGLNNSE..	A.DFRKFKLI	AEDVQGNVL
sac	KSTGLKNASD	ALKGRVFEVC	LADLQGSN..	DHSFRKVKLR	VDEVQGRNL
	101				150
an	TNFGHMALTT	DKLRSHVNKK	QTLIECSVDV	KTTDGFMLRV	FCIGFTIKDS
droso	RNFHGMALTT	DKLRSLVKKK	QTLIECSVDV	KTTDGFMLRV	FCIGFTIKDS
arroz	TNFGWMSFTT	DKLRSLVKKK	QTLIEAHVDV	KTTDGYMLRL	FCIGFTIKRA
catr	TNFGWMDFTT	DKLRSLVKKK	QSLIEAHVDV	KTTDSYTLRM	FCIGFTIKRA
homo	TNFGHMDLTR	DKMCSMVKKK	QTHIEAHVDV	KTTDGYLLRL	FCVGPTKRRN
rat	TNFGHMDLTR	DKMCSMVKKK	QTHIEAHVDV	KTTDGYLLRL	FCVGPTKRRN
mus	TNFGHMDLTR	DKMCSMVKKK	QTHIEAHVDV	KTTDGYLLRL	FCVGPTKRRN
aplicia	TNFGSMGLTR	DKLCSMVKKK	QTLIEANVDV	KTTDGYLLRV	FAIGFTIKRN
ce	TNFAHSMTH	DKLCSIVKKK	HTLIEANVTV	KTTDGYTLRV	FVIAFTIKSV
sac	TNFGWMDFTT	DKLRSHVKKK	QTLIEANVTV	KTSDDYVLRV	FAIAFTIKRA
	151				200
an	HSQRKTCYQA	HSQIKNIRAK	HTAIKREIT	STDLEGVVEK	LIPDSIAKDI
droso	MTQRKTCYQA	HSQIKNIRAK	HTAIKREIT	STDLEGVVEE	LIPDSIAKDI
arroz	NOVKRTCYQA	ASQIRQIRRK	MVEIMANQAS	SCDLKELVSK	FIFEVIGKEI
catr	NQQRKTCYQA	SSQIRQIRRK	MREIMVNQAK	SCDLKDLVQK	FIPESIGREI
homo	NQIRKTCYQA	HQQVRQIRRK	MMEINTREVQ	TNDLKEVVNK	LIPDSIGKDI
rat	NQIRKTCYQA	HQQVRQIRRK	MMEINTREVQ	TNDLKEVVNK	LIPDSIGKDI
mus	NQIRKTCYQA	HQQVRQIRRK	MMEINTREVQ	TNDLKEVVNK	LIPDSIGKDI
aplicia	NOVKKTCYQA	HAQVKAIRKK	MVEIVSREVS	SNDMKEVVNK	LIPDSIGKDI
ce	NOVKKTSYTK	TSKIRKIRSE	MIGCIEKEVT	GCDLKEVVSK	LIPDSIGKDI
sac	NOVKRHSYQA	SSHIRAIRKV	ISEILTREVQ	NSTLAQLTSK	LIPEVINKEI
	201				250
an	EKACQVVVPL	HDVYIRKVKV	LKKPRFDLSS	LMELHGDGGG	KAEVSTGGA
droso	EKACQVVVPL	HDDYIRKVKV	LKKPRFDLSS	LMELHGDGGG	KAEVSTGGA
arroz	EKATSSIFPL	QNVFVRKVKI	LKAPKFDLGR	LMEVHGD...	...Y.AKED
catr	EKATSSIFPL	QNVFIRKVKI	LKAPKFDLGR	LMEVHGD...	...Y.NEDR
homo	EKACQSIYPL	HDVYVRKVKM	LKKPKFELGK	LMELHGEVS	SSGKA.TGDE
rat	EKACQSIYPL	HDVYVRKVKM	LKKPKFELGK	LMELHGEVS	SSGRT.TGDE
mus	EKACQSIYPL	HDVYVRKVKM	LKKPKFELGK	LMELHGEVS	TSGKA.AGDE
aplicia	EKSCQSIYPL	HDVLHKVKV	LKKPKFDVKG	LMELHGEVST	TTSGK.VTSE
ce	EKTCISKLYPL	QEVYIRKVKI	IKRPKVDLGR	LMELHGDGS...	...I.TVGA
sac	ENATKDFIFPL	QNIHVKVKVL	LKQPKFDVGA	LMALHGEVS	.....
	251				284
an	SGVVVVRPEG	YEPVQASV	.....	.....	.....
droso	SGVVVDRFK	YEPVQASV	.....	.....	.....
arroz	IGTKLDRPAE	DEAMAGQEVA	A.E	.....	.....
catr	YNYQVG	.....	.....	.....	.....
homo	TGAKVERADG	YEPVQESV	.....	.....	.....
rat	TGAKVERADG	YEPVQESV	.....	.....	.....
mus	TGAKVERADG	YEPVQESV	.....	.....	.....
aplicia	GGEKVDRVDG	YEPVVLQNV	NPDF**QIK	SPIC	.....
ce	DGEKVDRPDD	YEPVQOEV	.....	.....	.....
sac	GEKGGKVS	FKDEVLETV	.....	.....	.....



identidad es de "solo" 55% a nivel de aminoácidos, sin embargo, con mamíferos, plantas e invertebrados la identidad aumenta hasta el 70%.

#### Alineamiento de las secuencias peptídicas de c3 de *D. melanogaster* vs *A.n. gambiae*.

Debido a que el nivel de homología a lo largo de la línea filo genética es tan alto nos pareció interesante comparar el nivel de divergencia entre el cDNA de mosquito con el cDNA homólogo de *D. melanogaster*. La identidad entre estos resultó ser extraordinariamente alta teniendo una identidad 96% a nivel de aminoácidos (Fig. 5B), además, tenía una identidad muy alta a nivel de nucleótidos incluso en el extremo 3' no traducido.

### **III) Caracterización de la expresión y localización del producto de c3 durante el desarrollo de *D. melanogaster*.**

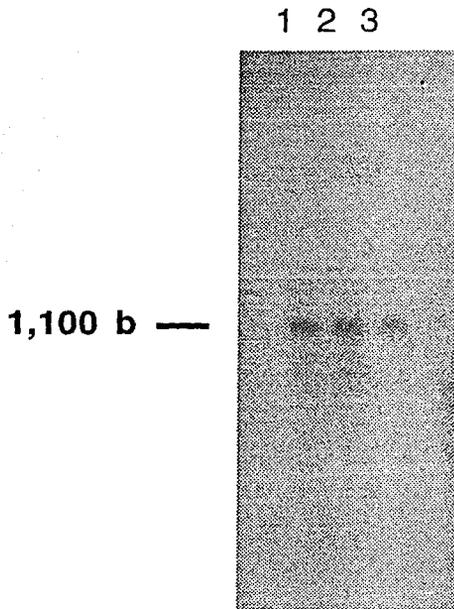
#### A) Clonación de la región codificadora de c3 en el vector de expresión pGEX1.

También era interesante determinar la localización (mediante inmunocitoquímica) de la proteína codificada por c3 durante el desarrollo del embrión de mosca así como en los diversos estadios del ovario (que fue el tejido original de donde se aisló). Para esto era necesario producir anticuerpos policlonales contra el producto de c3 por lo que se clonó la región codificadora de éste en el vector de expresión bacteriano pGEX1, el cual está diseñado para producir una proteína de fusión con la enzima Glutacion-S-transferasa.

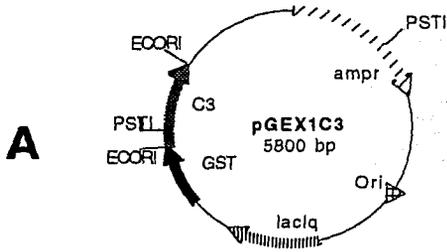
#### B) Purificación de la proteína de fusión y producción de anticuerpos anti-c3.

Este sistema se ha demostrado muy útil ya que las proteínas de fusión son fácilmente purificadas casi a homogeneidad mediante un solo paso de cromatografía de afinidad. La proteína purificada fue utilizada directamente para

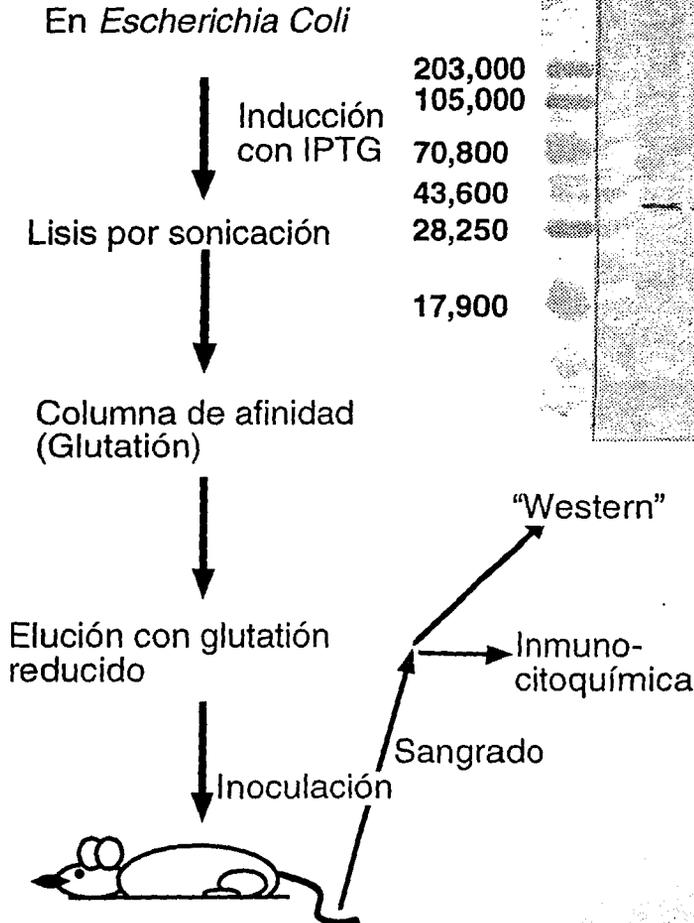
**Fig. 6**



**Fig. 6.-** "Northen Blot" de los primeros tres instars del desarrollo de mosquito (1, 2, 3).

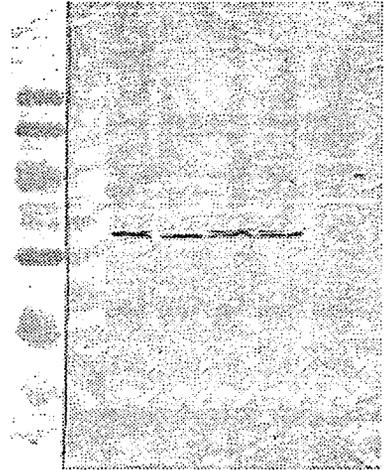


**B**



4 8 12 16

203,000  
105,000  
70,800  
43,600  
28,250  
17,900



**Fig. 7.-** Estrategia de clonación del cDNA de C3 en un vector de expresión para *E. coli*, protocolo de purificación de la proteína de fusión para la producción de anticuerpos anti C3. B) “Western Blot” de desarrollo de extracto crudo de embriones de *D. melanogaster*, la concentración del producto de C3 es constante con respecto al tiempo (4,8,12,16 hrs de desarrollo postovoposición)

inocular ratones (BalbC)(Fig. 7). El antisuero así generado tuvo un título de 1 en 10,000.

#### C) Western blot de los distintos estadios larvarios.

Este antisuero se utilizó en experimentos de tipo "western blot". Estos experimentos se utilizaron para determinar los cambios en la cantidad de la proteína codificada por c3 en extractos totales de *D. melanogaster* durante el desarrollo. En la figura 6 B se puede ver un " western blot" en el que la cantidad de proteína no cambia con respecto al tiempo lo que confirma el resultado del northern.

#### D) Inmunocitoquímica de ovarios.

El mismo antisuero fue utilizado para hacer inmunocitoquímica de embriones enteros así como de ovarios.

En la figura 8. se puede ver que la proteína por c3 se sintetiza en los ovariolos desde los primeros estadios de la ovogénesis y que ésta se mantiene en las células nodriza durante casi todo el proceso. Solamente al final de la ovogénesis el producto protéico de c3 es transferido al ovocito, donde se distribuye homogéneamente.

#### E) Inmunocitoquímica de embriones enteros.

En las figuras 9 y 10 se observa que la distribución de la proteína en el embrión de *Drosophila* cambia de una manera dinámica con respecto a los distintos estadios del desarrollo, ya que, comienza con una distribución homogénea al o largo del embrión(Fig. 9A). Después cuando los núcleos ya han migrado a la superficie, la proteína se mantiene citosólica y se excluye de los núcleos (fig. 9 D y E). Mas tarde, cuando el embrión ya esta celularizado, y aparece el surco cefálico la proteína se distribuye en franjas y al parecer en algunas de ellas

**Fig. 8**



ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

**Fig. 8.-** Inmuncitoquímica de ovarios de *D. melanogaster* contra la proteína codificada por c3: A) Ovariolos que contienen varias "cámaras de huevos" (mas jóvenes hacia arriba mas maduros hacia abajo), nótese la tinción en las células nodrizas. B) Igual que en "A" pero en mayor aumento. C) Cámara de huevo estadio "10" obsevese que la mayor parte de la proteína se encuentra en las células nodrizas aunque esta ya comienza a ser transferida al huevo. D) Cámara de huevo muy tardía en la que el contenido de las células nodrizas se esta vaciando al huevo (la proteína se distribuye homogéneamente en éste).

penetra a los núcleos (Fig. 9 F). Finalmente El producto de c3 migra hacia la zona proliferativa de la banda germinal (fig. 10).

### **Discusión:**

La identidad de las secuencias nucleotídicas de los cDNAs de mosquito y *D. melanogaster* es mayor al 90%, tanto en la parte codificadora como en la zona 3' no traducida. A nivel de aminoácidos esta identidad es aún mayor (94%). Esto sugiere fuertemente que la función de este gen esta muy conservada entre el mosquito y la mosca lo que hace que esta última sea un modelo ideal para tratar de determinar cual es la función de c3.

Del análisis de aminoácidos de la proteína codificada por c3 concluimos que es tan básica como una histona. Sin embargo, este gen no pertenece a la familia de las histonas porque contiene triptofanos y no tiene homología a nivel de secuencia con estas. El hecho de que esta proteína sea tan básica sugiere la posibilidad de que ésta sea capaz de unir nucleótidos ó de que interactue con ácidos nucleicos<sup>55</sup>. Cualquiera de estas propiedades podrán ser interesantes ya que justificarían un mecanismo de interacción con moléculas importantes (por ejemplo fos y/o DNA, RNA). No importando de que tipo sean, estas interacciones explicarían que c3 funcione como modulador de la transcripción o de la traducción ya sea interactuando con una molécula en particular o a nivel más general.

Ni en el "Northern blot" ni en el "western blot" de los distintos estadios del desarrollo del embrión de *D. melanogaster* se observan cambios en los niveles de transcrito o de proteína (Fig. 6.): Esto fue sorpresivo ya que creemos en base a datos preliminares y bibliográficos (esto se discute mas adelante) que c3 está involucrado en la proliferación celular o en el desarrollo y por lo tanto suponíamos que solo se debería sintetizar en tejido proliferativo; sin embargo, no debemos olvidar que estos experimentos representan el contenido total de

todo el embrión y por lo tanto no descartan que la expresión del gen este regulada en zonas o células específicas durante el desarrollo. Los experimentos de inmunocitoquímica revelan claramente que el producto de *c3* se localiza principalmente en los tejidos altamente proliferativos de la mosca y del embrión. En los ovarios, que junto con los intestinos (no analizados) son el único tejido proliferativo de la mosca adulta, es también evidente la síntesis del producto de *c3*. Es también importante notar que la proteína se mantiene solamente en las células nodrizas (las cuales están sintetizando activamente a todos los componentes celulares) y que durante los primeros estadios la proteína se mantiene fuera de la célula que va a dar origen al ovocito (Fig. 8 A y B). Finalmente, cuando las células nodrizas se desintegran y su citoplasma se bombea al núcleo la proteína de *c3* es transferida al ovocito donde se distribuye homogéneamente (Fig. 8 C y D)

En el embrión el producto de *c3* se expresa en las zonas proliferativas como son los blastodermos sincicial y el celular (Figs. 9 ) y la zona del mesodermo (Fig. 10 A). En cambio en la amnioserosa (que es el depósito de yema y donde no hay proliferación) no se detecta (Fig. 10. A, C y E).

La secuencia de aminoácidos codificada en el cDNA de *c3* fue comparada contra la base de datos "Genbank" (versión 85) utilizando el algoritmo Tfasta<sup>36 46</sup> y se encontró que era homóloga a genes de levadura, plantas, rata, y humano (Fig. 5. B). Su función todavía no está claramente definida, ya que en cada uno de los modelos mencionados anteriormente proponen una función distinta. En levadura existen dos genes homólogos a *c3*. Uno de ellos se encuentra en un fragmento geneómico que complementa para una de las mutantes *sir* (silent information regulator). Este fragmento codifica para el gen *SIR3*<sup>47</sup> y en el extremo 3' se encuentra un marco abierto de lectura incompleto que codifica para un péptido de función desconocida que tiene un 55% de identidad a nivel

de aminoácidos con el producto de *c3*. El otro gen homólogo a *c3* en levadura se encuentra en la parte 5' (Orf1) de un fragmento geneómico, que tiene dos marcos abiertos de lectura, descrito por Garret et al., quienes propusieron al Orf1 como el capaz complementar a la mutante *mft1*<sup>48</sup> la cual es deficiente en transporte de proteínas a la mitocondria. El marco abierto de lectura Orf1 de este fragmento geneómico codifica para un péptido de 238 aa. cuya identidad con *c3* es de 56%.

En plantas el gen homólogo a *c3* es denominado *cyc07*, éste codifica para una proteína de 245 aa y también fue aislado mediante un tamizado diferencial de un banco de cDNA de células en cultivo sincrónicas de *Cataranthus roseus* en fase "S" del ciclo celular. Los autores proponen que el producto de *cyc07* esta involucrado en la entrada y el mantenimiento de la fase "S" del ciclo celular<sup>49</sup>. En este trabajo sugieren la posibilidad de que *cyc07* sea una proteína capaz de unirse ácidos nucleicos. En un trabajo posterior<sup>50</sup> el mismo grupo descarta la posibilidad de que el gen homólogo a *c3* esté involucrado en el transporte de proteínas a la mitocondria en levadura. E incluso mapean en el fragmento geneómico reportado por Garret et al., al gen que realmente esta involucrado en el transporte de proteínas a mitocondria al Orf2 que se encuentra "río abajo" del homólogo a *c3* (Orf1). En este trabajo también reportan que la doble disrupción de Orf1 y del gen que se encuentra "río abajo" del gen *sir3* es letal. Esto implica que los homólogos de *c3* en levadura son indispensables para el funcionamiento de esta célula, cosa que se esperaría de un gen necesario para el mantenimiento del ciclo celular. Posteriormente Ito et al demostraron que 589 pares de bases de la región reguladora 5' del gen de *C. roseus* dirigía la expresión del gen reportero GUS (beta-glucuronidasa) a tejido meristemático (altamente proliferativo) de *Arabidopsis Thaliana*<sup>51</sup> reforzando así la idea de que este gen esta relacionado con la proliferación celular.

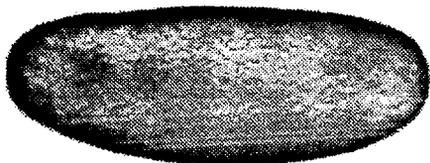
Por otro lado el grupo de Zarbi<sup>52</sup> aisló de células transformadas por v-fos en cultivo, al gen homólogo a c3 de rata y lo llamo Fte-1 (fos transformation efector), el cual codifica para una proteína de 264 aa. Fte-1 tiene un porcentaje de identidad con c3 de 68% a nivel de aminoácidos. Este gen parece ser un efector de transformación del oncogene v-fos ya que al ser interrumpido (por una inserción de un plásmido) el fenotipo transformado de la línea celular se pierde y éste puede ser recuperado al transfectar a las células con la secuencia ininterrumpida del gen. No se sabe que tipo de interacción tenga fte-1 con v-Fos, pero el hecho de que su expresión este involucrada en un fenotipo transformante sugiere nuevamente que esta familia de genes (c3) se encuentra involucrada en el control de la proliferación celular<sup>53</sup>.

El gen c3 también parece ser homólogo con el gen que codifica para la proteína ribosomal S3a humana ya que comparte una identidad con el gen reportado para esta proteína de 67% a nivel de aminoácidos<sup>53</sup>. El cDNA de la proteína S3a fue aislado de una biblioteca de expresión de cDNA de hígado de humano, utilizando anticuerpos generados contra la proteína ribosomal S3a de rata. Sin embargo no ha aparecido nada nuevo en la literatura que apoye que este cDNA realmente codifica para una proteína ribosomal y que nos pueda dar una idea si realmente existe una conexión entre la función del gen S3a y el gen c3. En el hipotético caso de que el gen s3a y el c3 sean homólogos, no sería difícil congeñar a la idea de que estos representan a un gen ribosomal necesario para la proliferación celular.

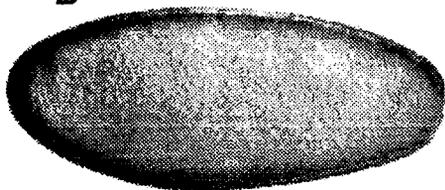
Nosotros proponemos la posibilidad de que el gen c3 sea crucial para la progresión del ciclo celular.

**Fig. 9**

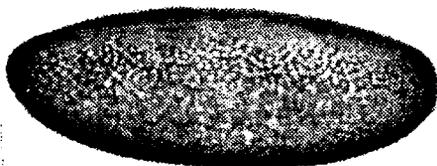
**A**



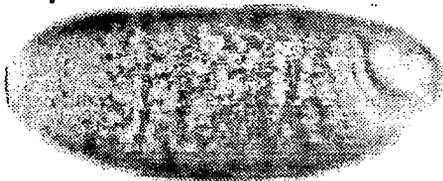
**B**



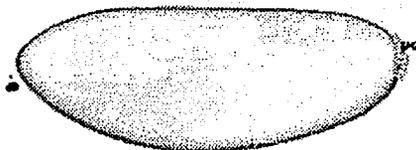
**D**



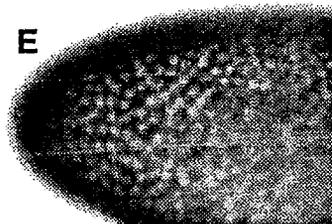
**F**



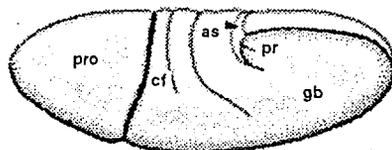
**C**



**E**



**G**



**Fig. 9.-** (pagina anterior) Inmunocitoquímica de embriones tempranos utilizando anticuerpos anti c3: A) Embrión muy temprano (etapa 1) teñido con anticuerpos anti-c3, nótese la distribución homogénea de la tinción. B) Corte óptico (Nomarski) de un blastodermo sincicial (etapa 5), la proteína sigue distribuida homogéneamente a lo largo del embrión, los núcleos se encuentran distribuidos en la periferia de la membrana plasmática y no esta teñidos. C) Esquema idealizado de un embrión en la etapa de blastodermo sincicial (etapa 5), esta etapa es la intermedia entre los embriones "D" y "F". D) Embrión en estadio de blastodermo sincicial (mismo que en "B"), los núcleos se encuentran distribuidos bajo la superficie de la membrana, obsérvese que los núcleos no están teñidos (aquí el corte óptico esta a nivel de la superficie del embrión. E) mismo embrión que en "D" pero a mayor aumento (20X). F) Embrión al comienzo de la gastrulación (etapa 7), los surcos cefálicos y neurales comienzan a formarse, el embrión esta completamente celularizado y la proteína c3 se encuentra distribuida en franjas discretas transversales al embrión. G) Esquema idealizado de un embrión en la etapa 8 del desarrollo. (pc= células polares, pro= proencefalo, cf= surco cefálico, as= amnioserosa, gb= Banda germinal).

**Fig. 10.-**(pagina siguiente) Inmunocitoquímica de embriones tardíos: A) Corte óptico (Nomarski) de un embrión en etapa 9 teñido con anti-c3, la zona que corresponde al mesodermo y a la banda germinal están teñidas mientras que la amnioserosa (yema) no. B) Esquema de un embrión etapa 9 en el que se ha dibujado la zona que corresponde al mesodermo (msc= mesodermo de la cabeza, ms= mesodermo.) C) Corte óptico de un embrión en la etapa 11 del desarrollo, la proteína se encuentra aun más localizada en la periferia del embrión, sin embargo existe una franja de tinción en el centro que corresponde a la zona de elongación de la Banda germinal. D) Esquema de un embrión en etapa 12 del desarrollo. E) Embrión en etapa 13 del desarrollo, las segmentos ya están perfectamente definidos así como casi todos los dominios de la larva, lo que queda de la amnioserosa no esta teñido. F) Esquema de un embrión en tapa 13 del desarrollo embrionario (cl= clipeolabio, md= mandíbula, mx= maxilar, lb= labio, dr= ranura dorsal, ps= espiraculo posterior, T1= segmento torácico 1, A1= Segmento abdominal 1, A9= segmento abdominal 9.)

**Fig. 10**

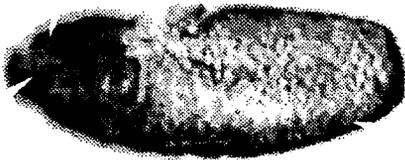
**A**



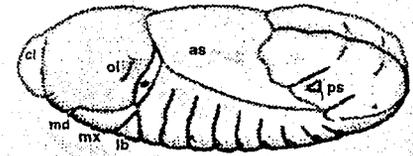
**B**



**C**



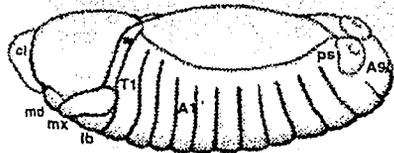
**D**



**E**



**F**



## Conclusiones:

Hemos aislado un gen *c3* cuyo transcrito está muy enriquecido en los ovarios de los dípteros *An. gambiae* y *D. melanogaster*.

El producto génico de *c3* es sintetizado durante el proceso de ovogénesis y durante desarrollo embrionario.

Esta proteína se mantiene en las células nodrizas durante casi todo el proceso embrionario y es al final de éste que la proteína es transferida al ovocito.

La cantidad absoluta de esta proteína no cambia durante el desarrollo embrionario pero su distribución en el embrión varía de una forma dinámica con respecto al tiempo. La distribución de la proteína codificada por *c3* en el embrión parece correlacionar con las zonas de alta proliferación celular.

La proteína codificada por *c3* está altamente conservada a lo largo de la escala filogenética y no se ha podido determinar una función de manera inequívoca, sin embargo, es probable que esté involucrada en la entrada y mantenimiento de la fase "S" del ciclo celular.

Nosotros proponemos la posibilidad de que el gen *c3* es importante para la progresión del ciclo celular eucariote basándonos en la evidencia generada en este trabajo así como en lo reportado por Ito et al<sup>50, 51 y 52</sup> de que el producto de este gen se expresa en tejido proliferativo y su gran conservación a lo largo de la escala filogenética. Otra evidencia es la especificidad de expresión de *cyc07* en la fase "S" en células de plantas reportada por Ito et al<sup>50, 52</sup>, así como en la función esencial de los genes homólogos a *c3* en levadura<sup>51</sup> y en la reversión del fenotipo tumorigénico que resulta de la disrupción del gen *fte-1* en mamíferos<sup>53</sup>.

## Conclusiones:

Hemos aislado un gen *c3* cuyo transcrito está muy enriquecido en los ovarios de los dípteros *An. gambiae* y *D. melanogaster*.

El producto génico de *c3* es sintetizado durante el proceso de ovogénesis y durante desarrollo embrionario.

Esta proteína se mantiene en las células nodrizas durante casi todo el proceso embrionario y es al final de éste que la proteína es transferida al ovocito.

La cantidad absoluta de esta proteína no cambia durante el desarrollo embrionario pero su distribución en el embrión varía de una forma dinámica con respecto al tiempo. La distribución de la proteína codificada por *c3* en el embrión parece correlacionar con las zonas de alta proliferación celular.

La proteína codificada por *c3* está altamente conservada a lo largo de la escala filogenética y no se ha podido determinar una función de manera inequívoca, sin embargo, es probable que esté involucrada en la entrada y mantenimiento de la fase "S" del ciclo celular.

Nosotros proponemos la posibilidad de que el gen *c3* es importante para la progresión del ciclo celular eucariote basándonos en la evidencia generada en este trabajo así como en lo reportado por Ito et al<sup>50, 51 y 52</sup> de que el producto de este gen se expresa en tejido proliferativo y su gran conservación a lo largo de la escala filogenética. Otra evidencia es la especificidad de expresión de *cycD7* en la fase "S" en células de plantas reportada por Ito et al<sup>50, 52</sup>, así como en la función esencial de los genes homólogos a *c3* en levadura<sup>51</sup> y en la reversión del fenotipo tumorigénico que resulta de la disrupción del gen *fte-1* en mamíferos<sup>53</sup>.

### **Perspectivas:**

La caracterización del gen c3 sigue siendo preliminar. Es por esto que, consideramos que se debe seguir investigando la función y las interacciones de la proteína codificada c3 debido a que parece ser importante la progresión del ciclo celular así como las características del promotor que regula su transcripción.

Para esto proponemos dividir al estudio de c3 en dos bloques:

#### **A) Estudios funcionales de del producto de c3.**

Una forma de observar cual es la función de una proteína en un sistema consiste en expresarla ectópicamente en el sistema del que proviene generando así lo que se llama una mutante con ganancia de función. En el caso de c3 sería interesante ver cual es el efecto de la sobreexpresión de c3 en células en cultivo así como la producción de moscas transgénicas que expresaran c3 bajo el control de un promotor inducible (heatshock) de manera que pudiéramos expresar a la proteína de manera ectópica y ver cual es el efecto sobre la proliferación y desarrollo. Otro enfoque que nos podría dar una idea de la función de c3 sería utilizar su cDNA para hacer hibridaciones *In situ* de cromosomas politénicos y ver si se conocen mutaciones en esa zona del genoma. Con suerte una de esas mutaciones podría corresponder a una mutación en c3 y de su fenotipo podríamos averiguar mas sobre la función de c3. También podríamos obtener información sobre el fenotipo de la falta de función de c3 mediante la construcción de moscas transgénicas que expresaran un "antisense" de manera que se inhibiera la traducción de c3.

## **B) Regulación de la expresión del gen c3.**

Desde el punto de estudios de la zona reguladora de c3 se propone que se pueden hacer ensayos de expresión transitoria de un gen reportero bajo el control del promotor de c3 de *An. gambiae* en células en cultivo. Por otro lado determinar el patrón de la transcripción de c3 en ovarios y embriones enteros de *D. melanogaster* mediante hibridaciones *In situ*. Y a nivel del organismo enteros se propone la construcción de moscas transgénicas con construcciones reporteras del promotor de *An. gambiae* y la comparación de estos patrones con los de la transcripción del gen endógeno.

## Bibliografía:

- 1 Glenn Fleming, 1986, BIOLOGÍA Y ECOLOGÍA DE LOS VECTORES DE LA MALARIA. Organización Mundial de la Salud. Washington, D.C. E.U.A.
- 2 Besansky N.Y., Powell, J.R., Hamm, D.M., Scott, J.A., Collins, F.H. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1994. 19;91(15)6885-8.
- 3 Coluzzi, M., Sabatini, A., Petrarca, V., Di Deco, M.A. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, (1979), 73,483-497.
- 4 Davidson, G. y Hunt, R.H. Parasitologia, (1973), 15;121-128.
- 5 Milles, S. Y., Bulletin of Entomological Research (1978), 68;85-96.
- 6 Scott, J. A., Brogdon, W. G. Collins, F. H., Am. J. Trop. Med. Hyg. (1993) 49(4):520-529.
- 7 Paskewitz, S. M., Coetze, M., Hunt, R. H., J. Med. Entomol. (1993), 30(5):953-7.
- 128 Severson, D. W., Mori, A., Zhang, Y., Christensen, B. M., Am. J. Trop. Med. Hyg., (1994), 50(4):425-432.
- 9 Hill, S.M., Crampton J. M., Am. J. Trop. Med. Hyg. (1994), 50(3):312-321.
- 10 Gilheko, A. K., Service, M. W., Aliell, F. K., Hill, S. M., Crampton, J. M., Am. J. Trop. Med. Hyg., (1993), 87(6); 596-601.
- 11 Hill, S., Crampton, J., Wolfson Unit of Molecular Genetics: Liverpool, 1994.
- 12 Wikerson, R. C., Parsons, T. J., Albright, D. G., Klein, T. A., Braun, M. J., Insect Mol. Biol. (1993), 1(4):205-211.
- 13 Crews, Oyen, A.E., Kumar, V., Collins, F. H., Am. J. Trop. Med. Hyg. (1993), 49(3):341-347.
- 14 Zheng, L., Collins, S.H., Kumar, V., Kafatos, F.C., Science, (1993), 261(5121):546-548.
- 15 Zheng, I., Saunders, R.D., Fortini, D., Della Torre, A., Coluzzi, M., Glover, D. M., Fotis, F.C., Proc. Natl. Acad. Sci. (1991), 88;11187-11191.
- 16 Saunders, R.D., Ashburner, M., Coulson, D., Glover, D. M., Kafatos, F. C., Louis, C., Modolell, J., Rimington, G.A., Savakis, C., Sidin, Klamos, I., Parasitologia (1993) 35(suppl)99-102.
- 17 Amy, E., Crews oyen, Kumar, V., Collins, F. Am. J. Trop. Med. Hyg. (1993), 49(3):341-347.
- 18 Rosenberg, R., Am. J. Trop. Med. Hyg. (1985); 34(4)687-691.
- 19 Tchulnkam, T., Mulder, B., Dechering, K., Stoffels, H., Verhave, J.P., Cot, M., Carnevale, P., Meuwissen, J.H., Robert, V., Trop. Med. Parasitol. (1993), 44(4)271-276.
- 21 Muller, H.M., Crampton, J.M., della Torre, A., Sinden, R., Crisanti, A., EMBO. J. (1993), 12(7):2891-2900.
- 22 Louis, C., Transposable Elements, and Hybrid Dysgenesis in *Drosophila*: prospects for germline transformation in *Anopheles*. Institute of Molecular Biology and Biotechnology, University of Crete, Heraklion, Crete, Greece. (1990).
- 23 Report of the meeting "Prospects for malaria control by genetic manipulation of its vectors", World Health Organisation, (1991).
- 24 Warren A.M., Crampton, J.M., Parasitology today, (1994), 10(2):98-103.
- 25 Mialhe, E., Miller, L., Biotechniques, (1994), 16(5):924-931.
- 26 Thanabalu, T., Berry, C., Hindley, J., J Bacteriol, (1993), 175(8); 2314-2320.
- 27 Ravoahangimalala, O., Charles, J.F., Schoeller Racaud, J. Res. Microbiol. (1993) 144(4) 271-278.
- 28 Prapanthadara, L.A., Ketterman, A.J. Biochem. Soc. Trans. (1993), 21(3):304.
- 29 Walsh, J.F., Molineux, D.H., Birley, M.H., Parasitology, (1993), 106 (suppl):55-75.
- 30 Coluzzi, M., Parasitologia, (1993) 35(suppl.), 23-29.
- 31 Michael Ashburner, 1989, *Drosophila* A Laboratory Handbook. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 32 Dan L. Lindsley and Georgiana G. Zimm, 1992. The Genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press.
- 33 Michael Bate and Alfonso Martinez Arias, 1993, The Development of *Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 34 Scott F. Gilbert, 1994. Developmental Biology, Fourth Edition, Sinauer Associates Inc. Publishers.
- 35 Volker Hartenstein, 1993, Atlas of *Drosophila* Development. Cold Spring Harbor Press.
- 36 Genetics computer group, (1991), Program Manual for the GCG Package version 7, 575 Science Drive, Madison, Wiscconsin, USA 5371.
- 37 Pearson, Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (1988), 85:2444-2448
- 38 Shore, D., Squire, M., Nashmith, K.A., EMBO. J., (1984), 3:2817-2823.
- 39 Garret, J.M., Singh, K.K., Vonder Haar, R. A., Emr, S.D., Mol. Gen. Genet., (1991), 225:483-491.
- 40 Ito, M., Kodama, H., Komamine, A., The Plant Journal. (1991), 1(2):141-148.
- 41 Ito, M., Yasui, A., Komamine, A., FEBS. Lett. (1993) 320(2):125-129.
- 42 Ito, M., Fukuda, H., Komamine, A., Plant Mol. Biol. (1994), 24(6):863-78.
- 43 Kho, C., Zarbl, H., Proc. Natl. Acad. Sci. (1992), 89:2200-2204.
- 44 Melspalu, A., Rebane, A., Hoth, S., Pooga, M., Stahl, J., Kruppa, J., Gene, 119(1992)313-316.
- 45 Michael Ashburner (1989) *Drosophila* A Laboratory Manual., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 46 Sambrook, Fritsch, Maniatis, (1989), Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- 47 Chomczynski, P., Sacchi, N., (1987). *Anal. Biochem.* 162;156-159.
- 48 Smith, D.B., Johnson, K.S., (1988), *Gene*, 67;31-40.
- 48 *Currents protocols in Molecular Biology* (1993) Current Protocols, John Wiley and Sons Inc.
- 50 Bradford, M., (1976) *Anal. Biochem.*, 72, 248.
- 51 Laemmli, E. K., (1970), *Nature*, 227:680-685.
- 52 Harlow, E., Lane, D., (1988), *Antibodies a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 53 Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76;4350-4354.
- 54 Sanger, F., Coulson, A.R., (1975) *J. Mol. Biol.*, 94;441.
- 55 Lavoie, B.D., Chaconas, G., (1993), *Genes. Dev.* , 7(12B): 2510-19.