

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

“Caracterización de los alelos mutantes de *aaquetzalli* (*aqz*), un gen
requerido para el desarrollo embrionario en
Drosophila melanogaster”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

MIGUEL ANGEL MENDOZA ORTIZ

DIRIGIDA POR

Dr. JUAN RAFAEL RIESGO ESCOVAR

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2006.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE GENERAL

Contenido	Pagina
Índice General.....	i
Índice de Figuras.....	iv
Índice de Tablas.....	vi
Resumen	
Abstract	
Introducción.....	1
Antecedentes	3
1. Ciclo vital de <i>Drosophila</i>	3
2. Embriogénesis (<i>Drosophila melanogaster</i>).....	4
3. Elementos P.....	7
4. Mutagénesis con elementos P en <i>Drosophila</i>	7
5. Mutantes de <i>aqz</i>	8
6. Información publicada de la línea mutante <i>aqz</i> ^{P1492}	9
7. Embriones mutantes de <i>aqz</i> presentan defectos en la formación del sistema nervioso.....	10
8. Información del gen <i>aqz</i> en la base de datos “Fly Base” de <i>Drosophila melanogaster</i>	11
9. Alelos mutantes de la línea <i>aqz</i> ^{P1492} y <i>aqz</i> ^{P14691} , generados a partir de escisiones de elementos P.....	14
10. Vía de señalización JNK.....	16
11. Vía de señalización JAK/STAT en <i>Drosophila melanogaster</i>	19
Hipótesis.....	21
Objetivos.....	22
General.....	22
Específicos.....	22
Diseño experimental.....	23
Metodología.....	24

1. Pruebas de complementación.....	24
1.1 Colecta de embriones.....	24
1.2 Preparación de cutículas.....	24
2. Análisis de Southern blot.....	25
2.1 Extracción y purificación del DNA.....	25
2.2 Digestión y electroforesis de prueba.....	26
2.3 Purificación del plásmido.....	27
2.4 Elaboración de la sonda.....	27
2.5 Southern Blot.....	28
3. Amplificación por PCR.....	29
3.1 Extracción de DNA.....	29
3.2 PCR.....	30
3.3 Primers para P14691.....	30
3.4 Primers para P1492.....	30
3.5 Secuenciación de DNA.....	32
3.6 Transformación de bacterias.....	32
3.7 Elaboración de medios de cultivo en placa LB/ampicilina/IPTG/ X-Gal	33
4. Análisis de expresión de <i>aqz</i>	33
4.1 Hibridación <i>in situ</i>	33
4.2 Elaboración de la sonda con digoxigenina.....	35
4.3 Generación de anticuerpos.....	35
4.4 Purificación de anticuerpos. Cromatografía de afinidad con proteína G.....	36
4.5 Western blots.....	36
4.6 Tinción con anticuerpos (Inmunohistoquímica).....	38
Resultados.....	39
1. Caracterización de los nuevos alelos mutantes de <i>aqz</i>	39
1.1 Nuevos alelos mutantes de <i>aqz</i>	41

1.2 Caracterización de la lesión molecular.....	41
1.2.1 Southern blot.....	41
1.2.2 Secuenciación de alelos por PCR.....	47
1.3 Pruebas de complementación.....	50
1.3.1 Combinaciones interalélicas	51
1.3.2 Combinaciones entre los dos grupos de alelos.....	54
2. Evaluación de la expresión del mRNA de <i>aqz</i>	55
2.1 Northern blot.....	55
2.2 Hibridación <i>in situ</i>	56
3. Evaluación de la expresión de la proteína AQZ.....	57
3.1 Obtención de anticuerpos.....	57
3.2 Secuencia de la proteína.....	59
3.3 Péptido antigénico.....	59
3.4 Anticuerpos policlonales.....	61
Discusión.....	65
1. Caracterización de los nuevos alelos de <i>aqz</i>	65
1.1 Nuevos alelos mutantes de <i>aqz</i>	65
1.2 Caracterización de la lesión molecular.....	67
1.3 Cruzas de complementación intralélicas.....	69
1.4 Cruzas de complementación entre los dos grupos de alelos.....	69
2. Expresión de <i>aqz</i> en el desarrollo embrionario.....	70
3. Expresión del gen <i>aqz</i> en moscas adultas.....	73
Conclusión.....	76
Bibliografía.....	78

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1	Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i>3
2	Estadios del desarrollo embrionario de <i>D. melanogaster</i>6
3	Sitio de inserción del elemento P en el gen <i>aqz</i> en cada alelo mutante.....8
4	Fenotipos de alelos mutantes de <i>aqz</i>9
5	<i>aqz</i> se requiere para el desarrollo del sistema nervioso en <i>D. melanogaster</i>12
6	Alineación de las secuencias homólogas a AQZ.....13
7	Nuevos alelos mutantes de <i>aqz</i>15
8	Los embriones mutantes para la vía JAK/STAT y JNK presentan fenotipos similares a los alelos de <i>aqz</i> ^{P1492} y <i>aqz</i> ^{P14691}17
9	Vía de señalización JNK.....18
10	Vía de señalización JAK/STAT.....20
11	Regiones de amplificación (amplicones) para <i>aqz</i> ^{P1492} (1 y 2) y <i>aqz</i> ^{P14691} (1 y 2).....31
12	Porcentaje de defectos.....41
13	Análisis de restricción de la región genómica 3R: 4640900..4647200 de <i>D. melanogaster</i>42
14	Southern Blot I.....43
15	Southern Blot II.....44
16	Southern Blot III.....45
17	Southern Blot IV.....46
18	Análisis del gradiente de temperatura de hibridación para los primers.....48
19	Amplificados de la región genómica aledaña a la inserción del elemento P.....49
20	Secuenciación de los amplicones obtenidos.....50

21	Cutículas de embriones heteroalélicos derivados de escisiones del elemento P de la línea <i>aqz</i> ^{P1492}	52
22	Cutículas de embriones heteroalélicos derivados de la escisión del elemento P de la línea <i>aqz</i> ^{P14691} ; las cruzas se hicieron con los alelos más penetrantes.....	53
23	Cutículas de embriones heteroalélicos derivados de la escisión del elemento P de las líneas <i>aqz</i> ^{P1492} y <i>aqz</i> ^{P14691}	54
24	Northern blot.....	55
25	El análisis de dot blot.....	57
26	Análisis de la expresión del transcrito <i>aqz</i> en embriones silvestres.....	58
27	Posibles sitios de fosforilación y modificación de la proteína predicha para AQZ en la secuencia de la misma, según el programa MacVector.	59
28	Western blot utilizando suero final (sin purificar).....	61
29	Western blot utilizando el suero final purificado (SFP).....	61
30	Análisis de la expresión de la proteína AQZ en embriones silvestres.....	63
31	Análisis de la expresión de AQZ en embriones silvestres a diferente concentración del anticuerpo.....	64
32	Alelos mutantes de <i>aqz</i> con múltiples defectos.....	65
33	Región genómica del cromosoma 3R en <i>D. melanogaster</i> que incluye la secuencia predicha de <i>aqz</i> , y los cDNAs registrados en la base de datos que abarcan la región completa.....	74
34	Expresión del transcrito <i>aqz</i> y la proteína AQZ en embriones.....	75

INDICE DE TABLAS.

Tabla	Página
1. Lista de proteínas homólogas a AQZ.....	14
2. Porcentaje de defectos encontrados en cada alelo mutante.....	40

RESUMEN

Durante el desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster* ocurren eventos morfogénicos muy marcados, tales como la segmentación, la formación del sistema nervioso, la involución de la cabeza y el cerrado dorsal. Estos procesos tienen un papel importante en la determinación de la forma y organización del embrión, y requieren de rearrreglos del citoesqueleto y de vías de señalización celular que los coordinen. Se ha reportado que se requiere del gen *aaquetzalli* (*aqz*) durante el cerrado dorsal e involución de la cabeza en embriones de línea germinal. Además, también se ha reportado que condiciones hipomorfias para *aqz* por medio de RNAi presentan defectos en la formación del sistema nervioso. Nosotros, mediante análisis de cutículas y pruebas de complementación, hemos aislado y caracterizado 27 nuevos alelos de *aqz*. Estos alelos son letales embrionarios con defectos de cerrado dorsal e involución de la cabeza y defectos adicionales de segmentación. También hemos determinado que los alelos mutantes del *locus* presentan variabilidad fenotípica entre ellos y hemos mapeado lesiones moleculares para algunos alelos. *aqz* se expresa durante el desarrollo embrionario de manera dinámica en tejidos en donde presentan defectos los embriones mutantes, y también se expresa en la etapa adulta. *aqz* codifica para una proteína que se caracteriza por contar con una secuencia rica en prolina (SRP), típica de interacción proteína-proteína presente en proteínas nucleares. Nuestro análisis de la expresión de *aqz* en adultos muestra que tanto el transcrito como la proteína codificada por *aqz* son de mayor peso molecular a lo descrito en la base de datos.

Abstract

Segmentation, induction and development of the nervous system, dorsal closure and head involution, are morphogenetic processes that occur during embryogenesis. These processes have an important role in the organization and shape changes of embryonic tissues, and they require coordinate cytoskeletal reorganizations. A network of interacting signaling molecules coordinates these reorganizations. Previous studies have shown that *aqz* is required for embryonic dorsal closure and head involution using germline clones of hypomorphic alleles. In addition, *aqz* RNAi studies in embryos produce defects in development of the nervous system. We identified and characterized a new allelic series of *aqz* by cuticle analysis and complementation test. Some of these alleles cause embryonic lethality with dorsal closure, segmentation and head involution defects. We determined that these new alleles show phenotypic variability, and we mapped the molecular lesions in some alleles. *aqz* expression occurs during embryonic development and adult stages, and is dynamic. *aqz* codes for a hypothetical protein containing a proline rich sequence domain (PRS), which may be necessary for protein-protein interactions, and is characteristic in proteins with a nuclear function. The location of defects in the mutant alleles correlates well with the expression pattern of the *aqz* transcript and protein. Gene expression analysis in adults shows that both, the apparent transcript and protein sizes, are higher than the annotation of *aqz* in Fly Base.

INTRODUCCIÓN

La importancia de *Drosophila melanogaster* como modelo experimental ha sido demostrada por muchos científicos. El potencial de combinar respuestas genéticas y moleculares a preguntas sobre expresión genética, Biología Celular y Neurobiología, hace que sea un modelo fundamental. La facilidad de obtención de fenotipos mutantes ha generado interés en el estudio de *Drosophila* en todas las etapas de su ciclo de vida, pero especialmente durante el desarrollo embrionario. La embriogénesis de *Drosophila* es un proceso rápido (alrededor de veinticuatro horas a temperatura ambiente) muy bien caracterizado. Los movimientos morfogenéticos, como la gastrulación, la segmentación, la formación del sistema nervioso, el cerrado dorsal del embrión y la involución de la cabeza tienen un papel importante en el establecimiento de la organización y forma del embrión, y la mayoría de estos movimientos involucran cambios de forma de las células. En particular para este trabajo nos interesan estos fenómenos dentro del concierto del desarrollo embrionario de *Drosophila*. La neurogénesis se inicia tempranamente después de la celularización del embrión con la segregación de los progenitores neurogénicos, los neuroblastos, originados a partir del tejido ectodérmico o neuroectodermo. Como siguiente paso, los neuroblastos entran en una serie de divisiones mitóticas para formar las células madres ganglionares. La prole de estas células se convertirá en neuronas o células gliales. Durante la segmentación subsecuente el embrión adquiere un patrón característico de segmentos a partir de los cuales se evidencia el plan corporal (*bauplan*) embrionario y en donde se originan la mayoría de los primordios (*anlagen*) de las estructuras adultas. Después de la segmentación, concomitante con la extensión/retracción de la banda germinal, se lleva a cabo el cerrado dorsal. El cerrado dorsal se inicia con el cambio de forma de las células epidermales más dorsales del epitelio lateral (ectodérmico) seguidas por el estiramiento de las células epidermales laterales y terminando con la fusión de las dos líneas dorsales, o hileras guía, en la línea media dorsal, lo que cierra al embrión en la porción dorsal. Finalmente la involución de la cabeza lleva a cabo la remodelación de los tejidos que van a dar paso a las estructuras que conformarán la porción cefálica de la larva, y eventualmente, a parte de las estructuras cefálicas del adulto. Los embriones

que fallan en completar estos procesos mueren, debido a los fenotipos de neurulación defectuosa, falta de segmentos, apertura dorsal y apertura cefálica, respectivamente (Campos-Ortega, 1997).

Estos fallos son generalmente consecuencia de mutaciones en genes requeridos para estos procesos. Una manera en la que pueden generarse mutaciones en estos genes es a través de la inserción de elementos P en el genoma de la mosca. Los elementos P son segmentos de DNA transponibles que se movilizan dentro del genoma usando una fuente de transposasa. Las mutantes aqz^{P1492} y aqz^{P14691} , objeto de este trabajo, presentan una inserción en el gen *aaquetzalli* (*aqz*; que en náhuatl significa abanico). Dado que las mutaciones son por inserciones de elementos P, se puede revertir y generar nuevos alelos por medio de escisiones de estos elementos P. Utilizando esta estrategia en el laboratorio, se realizaron cruza de las líneas mutantes con líneas que tenían fuente de transposasa y se obtuvieron 27 nuevos alelos. También con técnicas de Biología Molecular y Genética se caracterizaron los diferentes alelos a nivel molecular y se estudió el patrón de expresión de este nuevo gen en el desarrollo embrionario. *aqz* se expresa durante la embriogénesis y en la etapa adulta, y codifica para una proteína que se caracteriza por tener una secuencia rica en prolina. Esta secuencia es característica en interacciones proteína-proteína. Nosotros encontramos que el análisis de la expresión de *aqz* en etapas posteriores a la embriogénesis muestra que tanto el transcrito como la proteína codificada por *aqz* son mayores a lo descrito en la base de datos. La información de la región genómica del cromosoma 3R en *D. melanogaster* que incluye la secuencia predicha de *aqz*, y los cDNA existentes registrados en la base de datos que flanquean esa región, también sugieren que la secuencia de *aqz* presenta un marco de lectura abierto mayor a lo reportado (Grumblin y col., 2006).

ANTECEDENTES

1. Ciclo vital de *Drosophila*

El huevo de *Drosophila melanogaster* es un ovoide regular, ligeramente liso dorsoventralmente, bilateralmente simétrico; el lado dorsal es cóncavo y el lado ventral es convexo, con un promedio de 500 μm de largo y un diámetro aproximado de 180 μm . El huevo está cubierto por dos capas, una membrana vitelina más interna y por encima de esta una membrana rígida y opaca, llamada membrana coriónica. Toma cerca de un día después de la fertilización para que el embrión se transforme en una larva. La larva come y crece continuamente. Muda al final del primer día, de nuevo a los dos días, y al cuarto día aproximadamente en condiciones estándar (25°C, 50% de humedad relativa) definiendo así larvas de primero, segundo y tercer estadio. Después de dos o tres días como larva de tercer estadio, migra fuera del alimento para dar paso al inicio de la metamorfosis como pupa inmóvil. Durante los siguientes cuatro días, el cuerpo se remodela totalmente para formar al adulto con alas, que después sale de la cubierta pupal y es fértil ocho horas después (Fig. 1) a 25 °C (Weigmann y col., 2003).

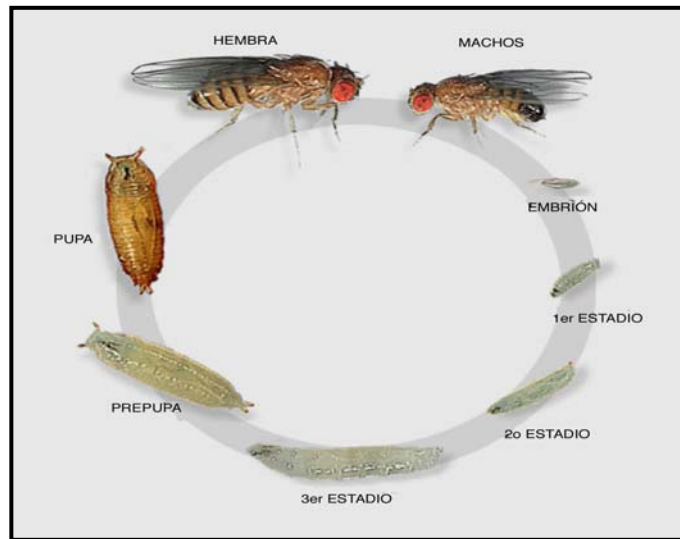


Figura 1. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* (Weigmann y col., 2003).

2. Embriogénesis (*Drosophila melanogaster*)

La embriogénesis es un proceso continuo, pero se ha organizado para su estudio en diferentes etapas (Fig. 2). Las etapas están subdivididas con límites artificiales con el objetivo de presentar un comienzo y un final del proceso embrionario en cada etapa.

Durante la primera etapa, el embrión sólo sufre divisiones nucleares. En estas divisiones del blastodermo sincicial, el huevo fertilizado consta de gránulos de yema homogéneamente distribuidos y citoplasma; solamente la periferia del huevo, ocupada por una delgada capa de periplasma, esta libre de yema. El núcleo cigótico se divide trece veces antes de la celularización. Los núcleos ya formados migran a la periferia donde se van a rodear de membrana. La celularización es un proceso rápido que dura 30 minutos a 25 °C. Las primeras células generadas durante la embriogénesis son las células polares, que constituyen la futura línea germinal (blastodermo celular). En el proceso consecuente de gastrulación van a aparecer las tres capas germinales primordiales (ectodermo, endodermo y mesodermo) así como un tejido extraembrionario llamado amnioserosa. Esta etapa da inicio con la formación de los surcos ventrales, de los cuales se originan el mesodermo y el endodermo. Las células de la extremidad anterior del surco ventral se invaginan para formar el primordio endodérmico del intestino medio anterior. Las células de la extremidad posterior se invaginan junto con las células polares. El ectodermo y mesodermo forman la banda germinal. La posterior extensión gradual de la banda germinal sobre el lado dorsal del embrión se conoce como la etapa de elongación de la banda germinal. La elongación de la banda germinal empieza inmediatamente después de la formación del surco ventral. El primer paso en la elongación coincide con parte del proceso de gastrulación. El ectodermo de la banda germinal se divide en dos regiones claramente definidas. Una es medio ventral y consiste en células largas; los neuroblastos y la epidermis ventrolateral derivan de las células de esta región. La otra región del ectodermo es lateral; la epidermis y las placodas traqueales se derivan de esta región lateral. Cuando la extensión llega a su límite máximo, el embrión de *Drosophila* presenta un patrón característico de segmentos en la región ventral. Después de la extensión, la banda germinal sufre una

retracción. Durante esta etapa ocurre la segregación de los discos imagales. Los discos imagales son sacos de células que darán paso a la formación de las estructuras adultas durante la metamorfosis. Los límites segmentales aparecen como dobleces profundos, restringidos por la epidermis ventral. La banda germinal se retrae de manera que la apertura del intestino trasero queda ubicada en el lado dorsal del polo posterior del huevo. De esta manera, se restaura la forma normal anatómica de la larva. En la retracción de la banda germinal ocurren procesos morfogénicos importantes; dichos procesos involucran la fusión del primordio del intestino medio anterior y posterior, el establecimiento de varias secciones continuas que van a dar paso al árbol traqueal, y la asociación de la línea germinal con las células mesodermales para la formación de las gónadas. Después de la retracción de la banda germinal queda un orificio en la superficie dorsal de la epidermis, este orificio es ocupado por un epitelio de células largas y planas, llamado amnioserosa (Campos-Ortega y Hartenstein, 1997). El proceso de cerrado dorsal consiste en el movimiento o migración de las células laterales de la epidermis de ambos lados del embrión hasta encontrarse en la línea media del embrión, cubriendo completamente la amnioserosa y sellando el embrión. Los movimientos morfogénicos que dan paso a la involución de la cabeza empiezan al mismo tiempo que el acortamiento de la banda germinal (Harden, 2002). Al final de la embriogénesis, las células epiteliales, que ahora cubren completamente el exterior del embrión, secretan la cutícula. Las células ectodérmicas ventrales secretan además varias hileras de dentículos característicos en número y forma para cada segmento.





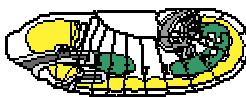
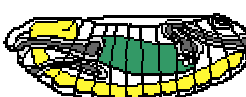
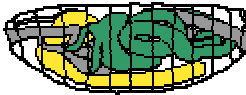
	No. de Etapa	Tiempo	Eventos
	1- 4	0:00 - 2:10 h	Divisiones del Blastodermo
	5	2:10 - 2:50 h	Blastodermo Sincicial
	6 - 7	2:50 - 3:10 h	Gastrulación
	8 - 11	3:10 - 7:20 h	Elongación de la banda germinal
	12 - 13	7:20 - 10:20 h	Retracción de la banda germinal
	14 - 15	10:20 - 13:00 h	Involución de la cabeza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

Figura 2. Estadios del desarrollo embrionario de *D. melanogaster*. Embriones en vista lateral, orientados dorsalmente hacia arriba y anteriormente hacia la izquierda. Esta es la misma orientación en la que se observarán todas las imágenes de embriones en este trabajo. Endodermo (verde), mesodermo (rojo) y sistema nervioso (amarillo) (Weigmann y col., 2003).

3. Elementos P.

Los transposones son secuencias de DNA que pueden moverse dentro del genoma de una célula. En el proceso, puede haber mutaciones. A los transposones también se les llama "jumping genes" ("genes que saltan") o "elementos genéticos transponibles". Los transposones son útiles a los investigadores como un medio para marcar y alterar la cadena de DNA dentro de un organismo vivo. La estructura mínima de un transposon consta de un gen de transposasa (enzima necesaria para la transposición) rodeado de repeticiones invertidas (Griffiths y col., 2000). De todos los elementos transponibles de *Drosophila*, los más útiles para el genetista son los elementos P. Los elementos P varían de tamaño desde 0.5 Kb cuando se trata de fragmentos de elemento P hasta el de tipo silvestre completo de 2.9 Kb de longitud; constan de una repetición invertida de 31 pb en sus extremos, y además llevan un gen con cuatro exones que codifica para la transposasa (Timakov y col., 2002). Los elementos P modificados carecen de la secuencia que codifica para la enzima transposasa. Esto evita que el elemento P se escinda y vuelva a insertarse en otro lugar del genoma causando nuevas mutaciones. El elemento P también tiene un gen marcador usado para identificar la inserción (Craig y col., 2002).

4. Mutagénesis con elementos P en *Drosophila*.

Los biólogos requieren de herramientas genéticas y moleculares para descifrar la información genómica y entender las funciones de los genes. Partiendo de esta premisa, una de las estrategias del proyecto "Berkeley *Drosophila* Genome Project" y otros consorcios de investigación, es la de crear una colección masiva de mutantes en *Drosophila*, utilizando elementos P (un tipo de transposón) genéticamente manipulados. El DNA cercano a las inserciones se secuencia entonces mediante la reacción en cadena de la polimerasa inversa (iPCR, por sus siglas en inglés) con el objeto de mapear las inserciones. Las inserciones de elementos P mayoritariamente ocurren dentro o cerca de los genes de *Drosophila*, reduciendo el tiempo requerido para la

identificación de nuevas mutaciones y el análisis de las funciones de genes. Las inserciones aqz^{P1492} y aqz^{P14691} , caracterizadas en este estudio, fueron aisladas como parte de este esfuerzo (Fig. 3).

Organismos modelo como *D. melanogaster* comparten genes cuya secuencia y función ha sido conservada con otros genomas, como el humano. Además de mostrar similitudes en estructura y función, los humanos y *Drosophila* comparten vías de señalización intracelular, patrones de desarrollo, comportamiento y aprendizaje, así como la formación de tumores y metástasis (Spradling, 1995).

5. Mutantes de *aqz*.

Hay dos líneas mutantes de *aqz* en el cepario de Indiana de *Drosophila*: las líneas aqz^{P1492} y aqz^{P14691} . Ambas presentan inserciones de elementos P en este gen (Figura 3). En la línea aqz^{P1492} el elemento P se encuentra insertado en un intrón, mientras que en la línea aqz^{P14691} este se encuentra interrumpiendo la zona reguladora (Brody, 1996).

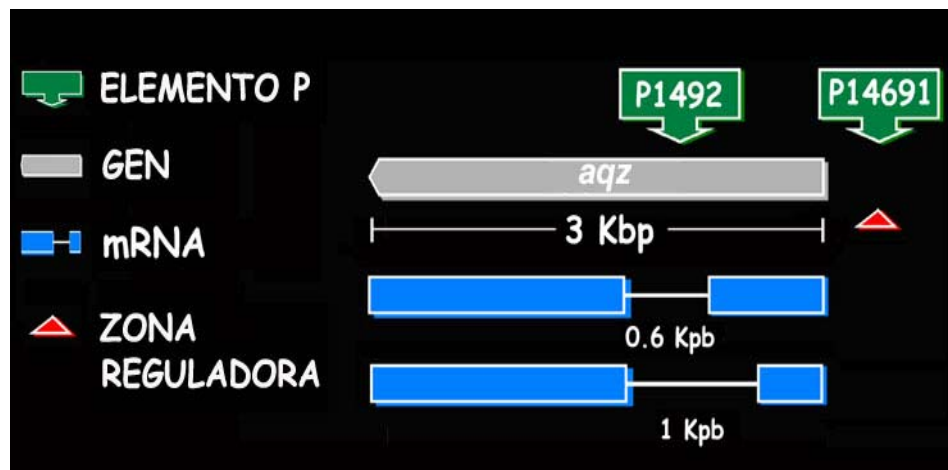


Figura 3. Sitio de inserción del elemento P en el gen *aqz* en cada alelo mutante. El elemento P en la línea aqz^{P1492} se encuentra insertado en un intrón y en la línea aqz^{P14691} en el promotor (Grumblin y col., 2006)

6. Información publicada de la línea mutante aqz^{P1492} .

De acuerdo con datos reportados anteriormente, clones embrionarios de línea germinal de aqz^{P1492} tienen un fenotipo de apertura dorsal y defectos en la involución de la cabeza (Perrimon y col., 1996). En nuestro trabajo hemos demostrado que tanto los alelos aqz^{P1492} , como los alelos aqz^{P14691} presentan los defectos embrionarios publicados. Además, también presentan defectos adicionales durante la segmentación del embrión, defectos como fusión o deleción de algunos segmentos abdominales (Fig. 4).

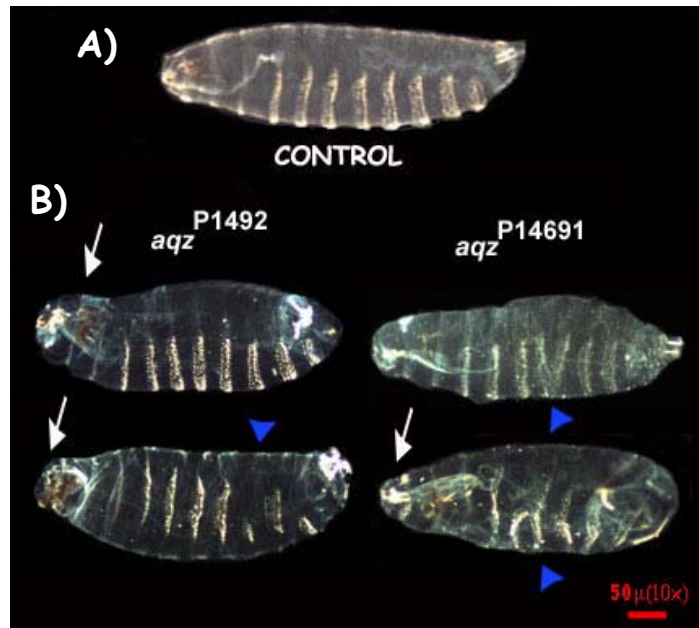


Figura 4. Fenotipos de alelos mutantes de aqz . A) Cutícula de un embrión silvestre. Lado dorsal de los embriones hacia arriba y parte anterior hacia la izquierda. B) Alelos mutantes originales (aqz^{P1492} y aqz^{P14691}). Se observan defectos en la involución de la cabeza (flecha) y fusión de segmentos abdominales (punta de flecha).

7. Embriones mutantes de *aqz* presentan defectos en la formación del sistema nervioso.

En estudios recientes se ha encontrado que *aqz* interviene durante el desarrollo del sistema nervioso (Fig. 5). *aqz* es un gen con función desconocida que codifica para una proteína que exhibe una limitada homología a un coactivador transcripcional. El fenotipo neural observado después de la inyección del RNAi a embriones en etapas tempranas (blastodermo sicial), es una deformación de las comisuras anteriores y posteriores, así como una estrecha distancia entre la comisuras longitudinales de la cadena ganglionar ventral y además un severa hipoplasia del sistema nervioso periférico (Ivanov y col., 2004).

El sistema nervioso esta formado por tres diferentes subtipos:

- El Sistema Nervioso Central (CNS), el cual se origina a partir de los neuroblastos y las células progenitoras de la línea media e incluye al cerebro y la cadena ganglionar ventral.
- El Sistema Nervioso Periférico (SNP), el cual se origina de las células progenitoras de los órganos sensoriales y conforma el sistema sensorial.
- El Sistema Nervioso Estomatogástrico (SNE), el cual se origina a partir de tres invaginaciones en el lado dorsal del stomodeum. (Weigmann y col., 2003).

El desarrollo del sistema nervioso (SN) es un proceso que se ha dividido en tres etapas para su estudio. En la primera etapa se forma el anlagen neurogénico (células que van a dar origen al tejido neuroectodérmico). Las células ventrolaterales del ectodermo adquieren propiedades neurogénicas, diferenciando a la región neural del tejido remanente. El segundo paso consiste en la segregación de las células neurogénicas progenitoras en la región neural recién diferenciada. Varios son los tipos de células progenitoras requeridos para formar el sistema nervioso embrionario: los neuroblastos, las células progenitoras de la línea media y las células progenitoras de los órganos sensoriales. Los neuroblastos son células alargadas localizadas a ambos lados de la línea media ventral (Campos-Ortega y Hartenstein, 1997). Las células progenitoras de la línea media derivan del mesoectodermo, estas células separan el

neuroectodermo del mesodermo. Las células progenitoras de los órganos sensoriales derivan de posiciones más laterales y son las precursoras del sistema nervioso periférico (SNP). El último paso en la formación del SN es la producción y citodiferenciación de neuronas y células gliales. Después de la segregación, los neuroblastos de la cadena ganglionar ventral entran en varias rondas de divisiones asimétricas para formar células madres ganglionares, las cuales producen neuronas o células gliales.

8. Información del gen *aqz* en la base de datos “Fly Base” de *Drosophila melanogaster*.

El gen *aqz* se encuentra en el brazo derecho del tercer cromosoma en la región 85B-C del genoma de *D. melanogaster*. De acuerdo a “Fly Base” la secuencia nucleotídica de *aqz* consta de 3000 pares de bases; a partir de esta secuencia se forman dos transcritos de diferente tamaño (2355 y 1976 nucleótidos). Ambos transcritos codifican para una proteína de 285 aminoácidos de longitud y peso aproximado de 30 KDa (Fig. 3). Esta proteína presenta un alto grado de homología con proteínas codificadas por genes de especies filogenéticamente cercanas a *D. melanogaster* como son: *D. simulans* (*aqz/Dsim*) y *D. pseudoscura* (*GA22058/Dp*). Estos genes, al igual que *aqz*, se reportan como de función desconocida. Además, AQZ comparte una limitada homología con proteínas codificadas por otros genes de *D. melanogaster*, ubicados en el cromosoma X (*CG32797/Dm* y *CG32733/Dm*). La estructura primaria de todas estas proteínas se caracteriza por contar con una secuencia rica en prolina, ver Fig. 6 y Tabla 1 (Altschul y col., 1997).

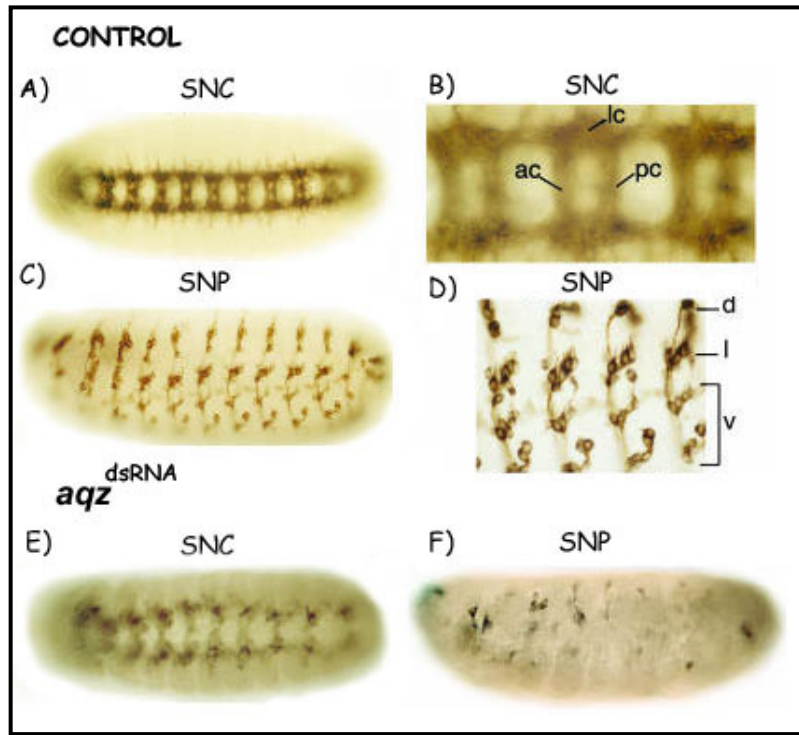


Figura 5. *aqz* se requiere para el desarrollo del sistema nervioso en *D. melanogaster*. A, B, C y D muestran el patrón silvestre del SNC y SNP en embriones teñidos con mAb BP102 (SNC; vista ventral) y 22C10 (SNP; vista lateral). B y D muestran un acercamiento de A y C respectivamente. E y F muestran los fenotipos mutantes de *aqz* obtenidos por iRNA. Los embriones fueron teñidos con mAb BP102 (SNC; vista ventral) y 22C10 (SNP; vista lateral). SNC, sistema nervioso central y SNP, sistema nervioso periférico. Comisura anterior (ac), Comisura posterior (pc) y Conexiones longitudinales (lc). Complejo neuronal dorsal (d), Complejo neuronal ventral (v) y Complejo neuronal lateral (l) (Ivanov y col., 2004).

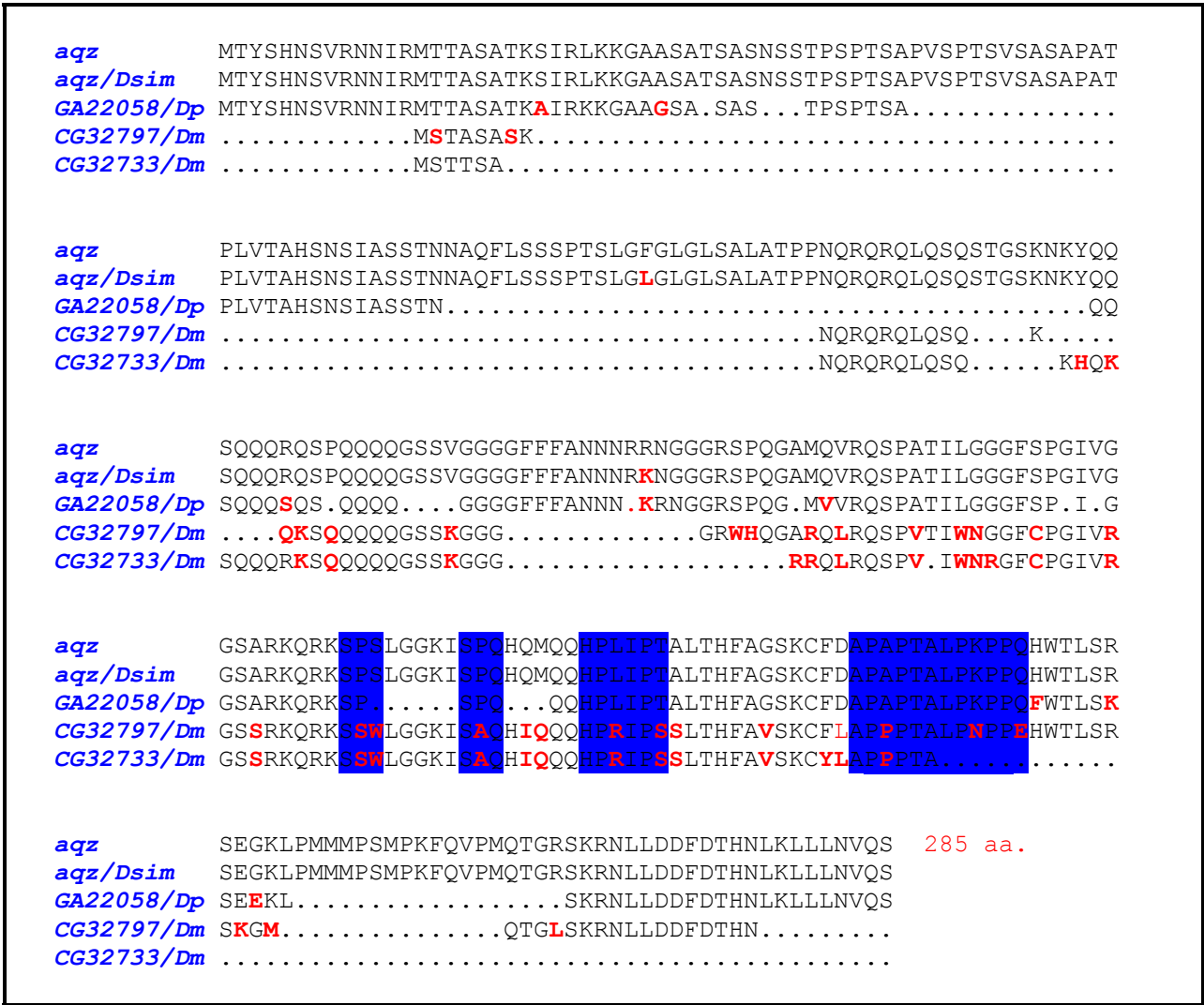


Figura 6. Alineación de las secuencias homólogas a Aqz. El dominio común reconocible entre las proteínas homólogas a Aqz es una secuencia rica en prolina (recuadro azul). Este dominio es característico de dominios de interacciones proteína-proteína (Shawn y Li, 2005). *Dm* (*D. melanogaster*), *Dsim* (*D. simulans*) y *Dp* (*D. pseudoscura*).

GEN	SÍMBOLO	ESPECIE	TAMANO DE SECUENCIA NUCLEOTÍDICA (pb)	TAMANO DE PROTEÍNA (aa)	FUNCIÓN	DOMINIOS
<i>aqz</i>	CG9821	<i>D. melanogaster</i>	3024	285	desconocida	SRP
<i>Dsim\aqz</i>	<i>Dsim\CG9821</i>	<i>D. simulans</i>	855	285	desconocida	SRP
GA22058	<i>Dpse\GA22058</i>	<i>D. pseudoobscura</i>	930	309	desconocida	SRP
CG32797	CG32797	<i>D. melanogaster</i>	610	202	desconocida	SRP
CG32733	CG32733	<i>D. melanogaster</i>	474	157	desconocida	SRP

Tabla 1. Lista de proteínas homólogas a AQZ. Las proteínas codificadas por los genes de especies cercanas a *D. melanogaster* presentan homología con AQZ y se reportan como de función desconocida. Todas las proteínas generadas a partir de estos genes cuentan con una secuencia rica en prolina (SRP); esta secuencia es característica de interacciones proteína-proteína.

9. Alelos mutantes de la línea *aqz*^{P1492} y *aqz*^{P14691}, generados a partir de escisiones de elementos P.

Para generar nuevos alelos mutantes, así como revertientes de estos alelos mutantes de *aqz* (líneas *aqz*^{P1492} y *aqz*^{P14691}), se cruzaron estas líneas mutantes con líneas que expresan transposasa. En el siguiente paso, de la descendencia de estas cruza se eligieron organismos que además de los elementos P tenían ahora una fuente de transposasa para que, a su vez, en su descendencia se pudieran recuperar organismos que portaran escisiones precisas ó imprecisas, revirtiendo al fenotipo silvestre o generando nuevos alelos con mutaciones, respectivamente. Las imágenes de las cutículas embrionarias de cada nuevo alelo letal, obtenidas por microscopia de luz de campo oscuro, muestran que estos embriones presentan fallas en diferentes procesos morfogénéticos debido a que se observan diferentes defectos en la estructura y forma del embrión (Fig. 7). Los resultados indican que el gen *aqz* se activa en la embriogénesis temprana y participa en varios procesos morfogénéticos como el cerrado dorsal, la involución de la cabeza y la segmentación de la banda germinal. Estos procesos llevarán al establecimiento de la estructura y forma característica del embrión silvestre. En general, todos los alelos mutantes presentan fenotipos letales muy

similares a los mutantes de las vías de señalización JNK y JAK/STAT (Fig. 8), que se activan durante la embriogénesis temprana. Además, se obtuvieron revertientes de las dos líneas P iniciales, lo que es evidencia importante de que los fenotipos letales mutantes se deben a las inserciones (Mendoza-Ortiz, 2004).

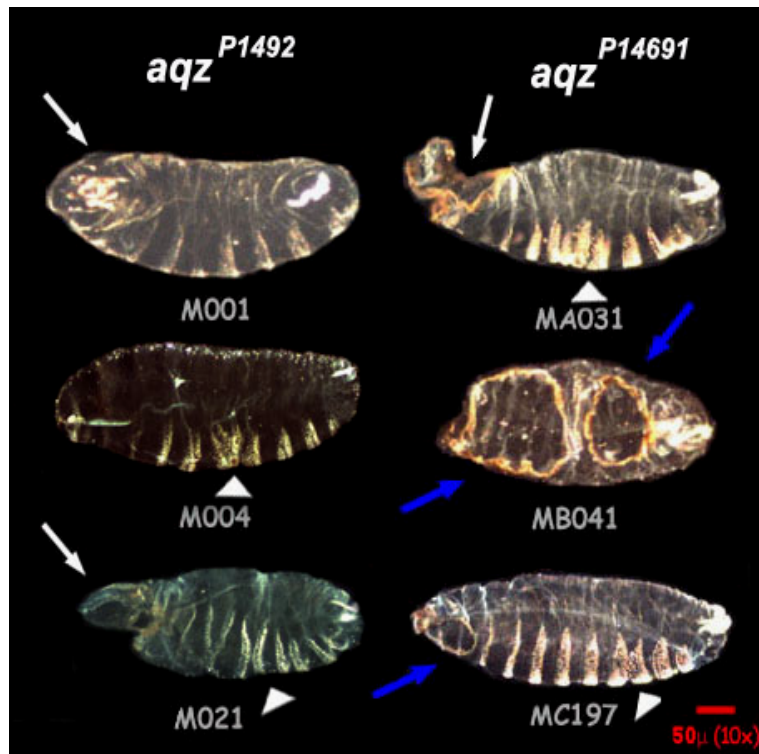


Figura 7. Nuevos alelos mutantes de *aqz*. Estos embriones presentan el fenotipo esperado de apertura dorsal e involución de la cabeza (flecha blanca), pero algunos presentan defectos adicionales, como apertura ventral (flecha azul) y fusión de segmentos (punta de flecha). La cutícula del alelo mutante *aqz*^{MB041} se encuentra orientada en una vista ventral.

10. Vía de señalización JNK

La vía JNK lleva a cabo la fosforilación y activación de Jun, un factor transcripcional tipo zipper de leucina (Fig. 9). La activación de esta vía en las células de la hilera guía o células del “leading edge” (LE) -células más dorsales de epitelio lateral- se da como probable respuesta a señales provenientes de la amnioserosa, junto con la acumulación de actina y miosina. La cascada de JNK activa la transcripción y la secreción de Dpp (*decapentaplegic*, un locus que codifica para un homólogo en *Drosophila* del factor transformador de crecimiento β , TGF- β) por las células de la hilera guía, entre otros genes de respuesta inmediata. Dpp controla la señalización entre las células de la hilera guía y las células epidermales laterales, a través del complejo Tkv/Put que actúa como receptor.

Muchas de las proteínas que participan durante el cerrado dorsal están involucradas en otros procesos de cierre epitelial en *Drosophila*, como en el cerrado torácico. Mutaciones en cada uno de los integrantes de la vía JNK muestran un fenotipo de apertura dorsal, y por lo tanto, los embriones mutantes presentan un hoyo en la región dorsal del embrión, con algunos defectos en la parte cefálica (Harden, 2002).

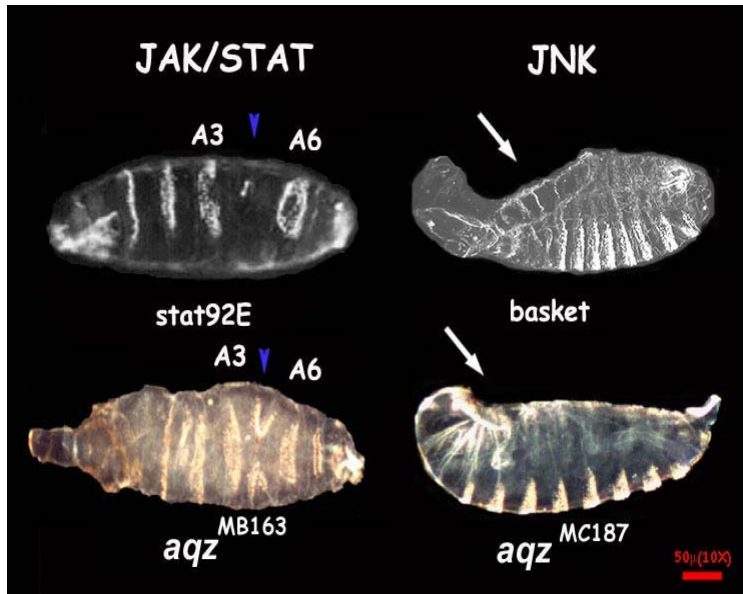


Figura 8. Los embriones mutantes para la vía JAK/STAT y JNK presentan fenotipos similares a los alelos de aqz^{P1492} y aqz^{P14691} . Mutaciones en los integrantes de la vía JAK/STAT (*stat92E*) provocan defectos tempranos en la embriogénesis de *D. melanogaster*, como la fusión o delección parcial de los segmentos abdominales (punta de flecha). En el caso de las mutaciones en los integrantes de la vía JNK (*basket*) provocan un mal cerrado dorsal; por tanto la presencia de un hoyo en la parte dorsal del embrión (flecha).

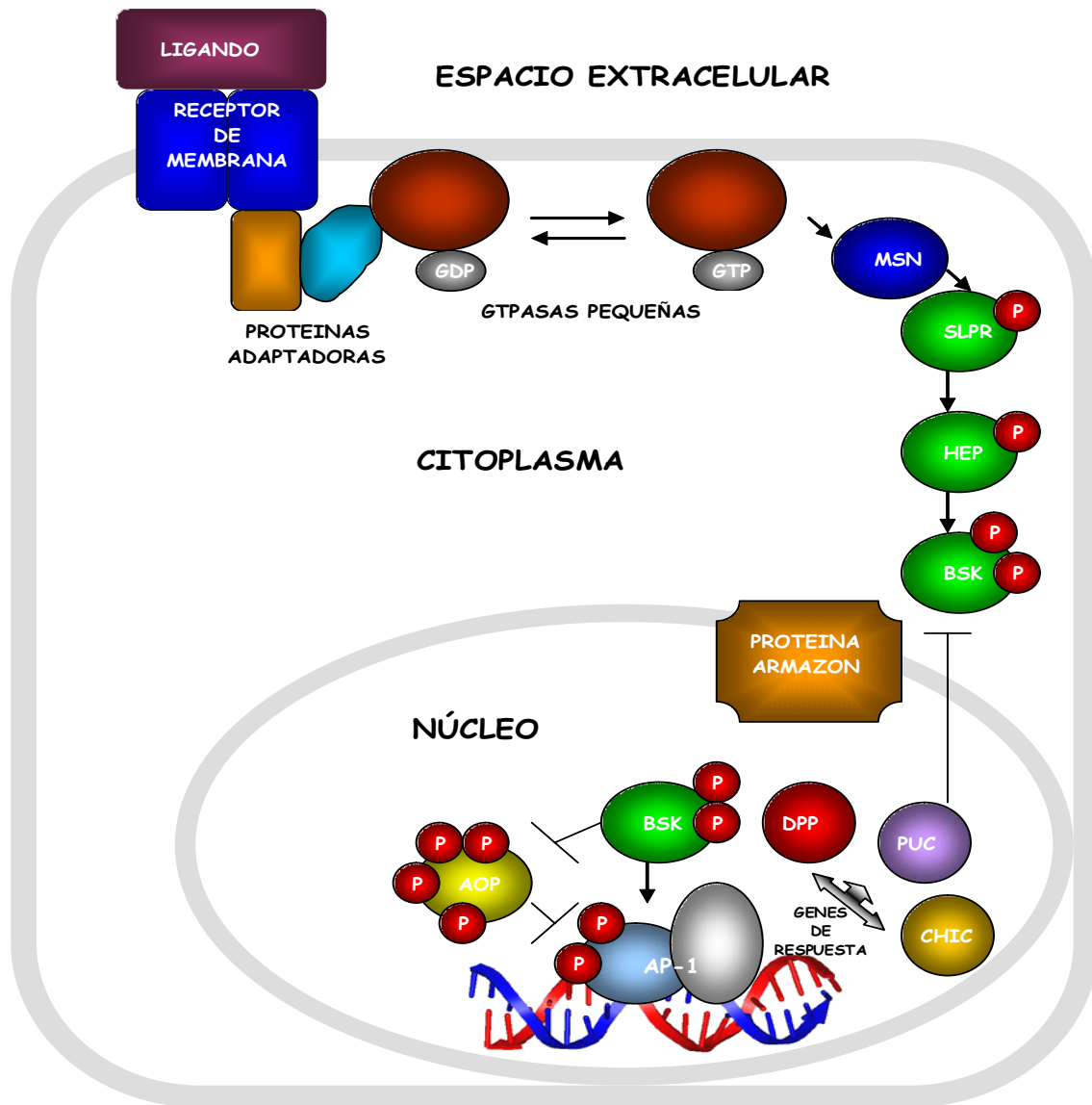


Figura 9. Vía de señalización JNK. Misshapen (MSN)= JNKKKK, Slipper (SLPR)= JNKKK, Hemipterous (HEP)= JNKK, Basket (BSK)= JNK, Complejo DJun/DFos (AP-1), Anterior Open (AOP), Decapentapegic (DPP), Chickadee (CHIC) y Puckered (PUC). . Para detalles ver texto. (Imagen modificada de Xia y Karin, 2004).

11. Vía de señalización JAK/STAT en *Drosophila melanogaster*.

La vía de trasducción de señales JAK/STAT (HOP/STAT92E en *Drosophila*) controla varios procesos durante el desarrollo de *D. melanogaster*. Esta vía se activa en respuesta a citocinas y factores de crecimiento. Una cinasa JAK (Janus kinase) se asocia a un receptor membranal de citocina (Mom), es activado por un ligando (Upd) el cual a su vez induce la dimerización del receptor. JAK activada fosforila al receptor creando sitios de unión SH2. Un activador transcripcional (STAT) se une al receptor fosforilado y es entonces fosforilado por JAK. Ya fosforilado STAT se dimeriza y se transloca hacia el núcleo para la activación de la transcripción de genes (Fig. 10).

Parte de la función de la vía JAK/STAT durante la embriogénesis temprana consiste en activar en varios segmentos abdominales la expresión de genes de la regla de los pares, que están involucrados en la segmentación anteroposterior del embrión (Lou y Dearolf, 2001). La definición de las regiones anteroposterior y dorsoventral del embrión temprano está dada por genes de efecto materno. A lo largo del eje anteroposterior, los genes de efecto materno se expresan en dominios y activan a los genes de tipo gap como *hunchback (hb)* y *knirps (kni)*. Los genes gap regulan a su vez la expresión de genes de la regla de los pares como *even-skipped (eve)*, *runt* y *fushi tarazu (ftz)*, que se expresan en los segmentos del embrión. Los genes de la regla de los pares controlan la expresión de los genes de la polaridad de los segmentos como *wingless (wg)* y *engrailed (en)*. Mutaciones en *hop*, *stat92E*, *upd* y *mom* causan defectos en la segmentación, principalmente delección del cuarto y quinto segmento abdominal, además de defectos en la región cefálica y fusión del sexto y séptimo segmento (Chen y col., 2001). También se requiere de la vía JAK/STAT para la hematopoesis de la mosca y para la totipotencialidad de las células germinales.

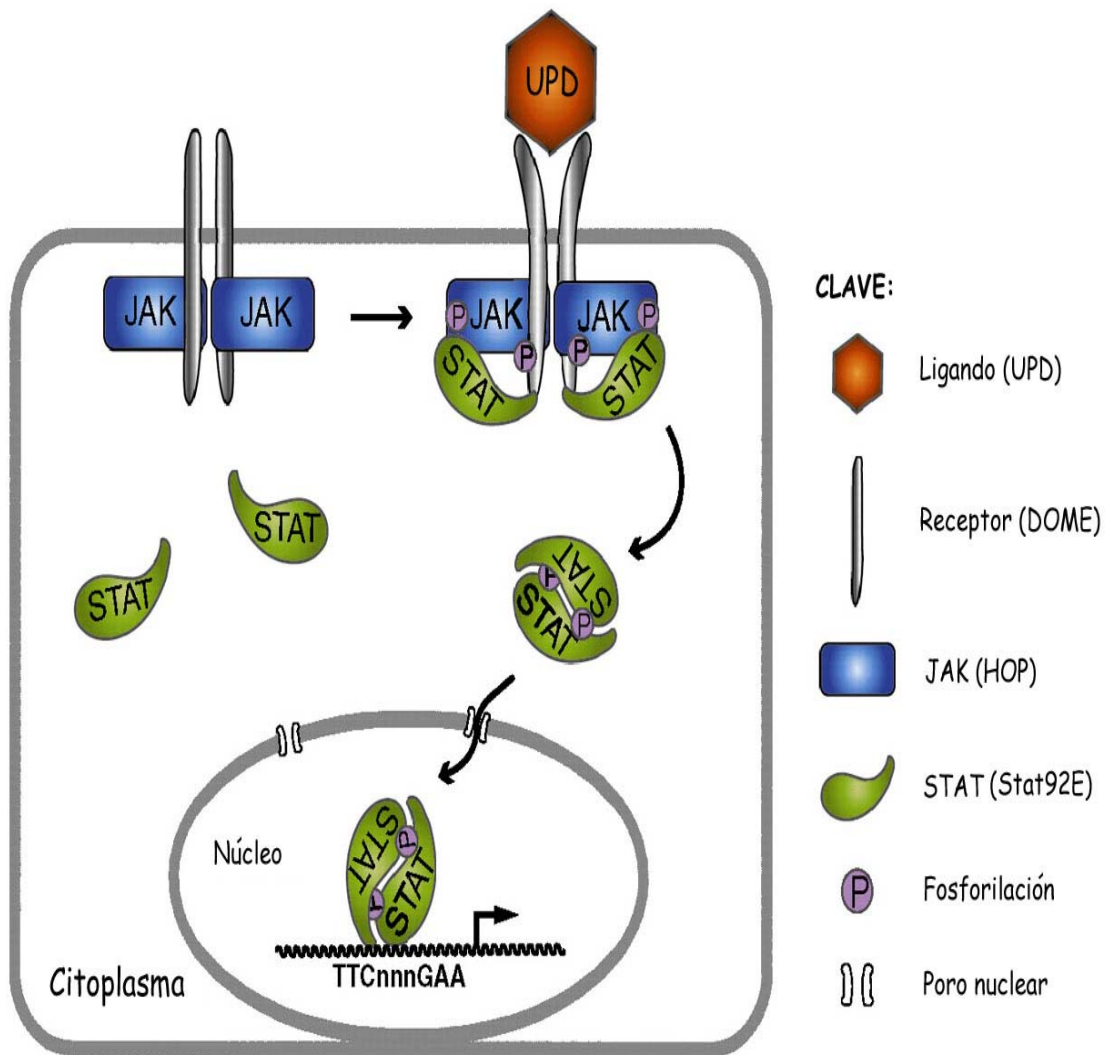


Figura 10. Vía de señalización JAK/STAT. Para detalles, ver texto. (Imagen modificada de Arbouzova y Zeidler, 2006)

HIPOTESIS.

El gen *aqz* es una molécula señalizadora que se activa durante la embriogénesis de *D. melanogaster* y participa en varios procesos morfogénéticos como la segmentación de la banda germinal, formación del sistema nervioso, el cerrado dorsal y la involución de la cabeza.

OBJETIVOS.

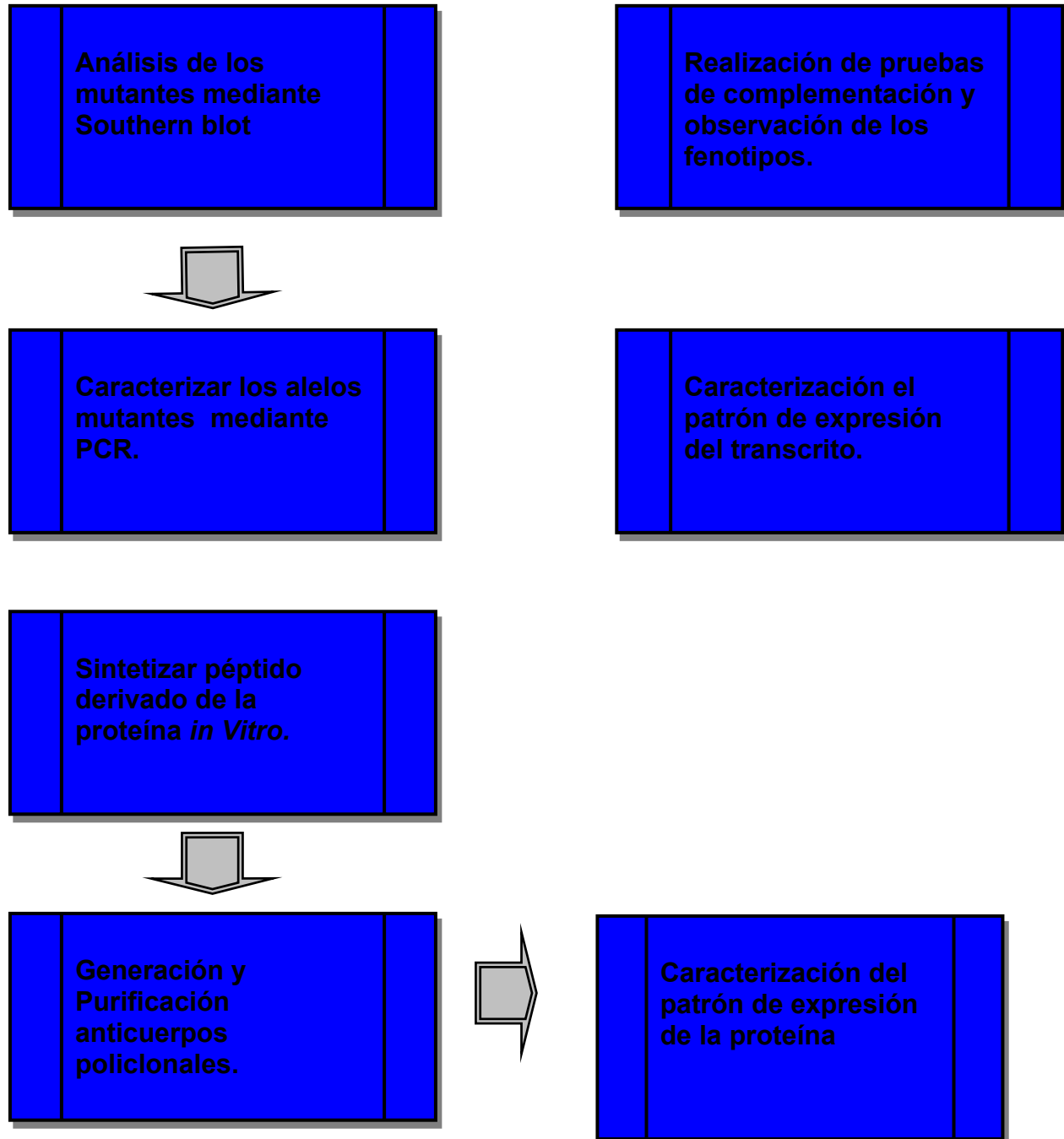
General.

Demostrar que *aqz* es un gen que participa en varios procesos durante la embriogénesis de *D. melanogaster*.

Específicos.

- Realizar pruebas de complementación entre los alelos obtenidos y analizar los fenotipos mutantes mediante el ensayo de cutículas embrionarias.
- Determinar la precisión de las escisiones en alelos mutantes mediante PCR.
- Observar el patrón de expresión del transcrito y de la proteína en el desarrollo embrionario.

DISEÑO EXPERIMENTAL



METODOLOGIA

1. Pruebas de complementación.

Se cruzan moscas heterocigotas de alelos mutantes distintos entre sí, de alelos derivados de la misma línea original y de alelos de diferentes líneas originales y se observa si en la descendencia hay presencia de embriones muertos, y transheterocigotos adultos. Si los alelos complementan, se revierte al fenotipo silvestre y se tienen moscas adultas. En el caso de que los alelos no complementen se observarán fenotipos letales embrionarios similares a los alelos mutantes originales. Para corroborar la similitud entre estos fenotipos letales se colectan embriones mediante puestas y se hace una preparación de cutículas.

1.1 Colecta de embriones

En un vaso de precipitado de plástico, con orificios pequeños en la base, se colocan algunas moscas y se tapan con una caja Petri de tamaño igual al diámetro del vaso. La caja Petri contiene agar solidificado con jugo de uva, y en la superficie un poco de levadura. Después se invierte el vaso y se ponen en un medio ambiente adecuado para el desarrollo de las moscas (25°C, 50% de humedad relativa). Después de 24 horas de incubación, se cambia la caja Petri por una limpia, con un poco de levadura. Las cajas con las puestas de 24 hrs se dejan en las condiciones mencionadas y se espera a que los embriones se terminen de desarrollar hasta que se observen embriones muertos y se colectan entonces éstos (aproximadamente 48 hrs).

1.2 Preparación de cutículas.

Después de 48 horas de la puesta, a la caja libre de larvas se le agrega agua destilada. Con un pincel se despegan los embriones, después se filtran con una malla de poro adecuado para retener los embriones. Los embriones se enjuagan varias veces hasta que la levadura queda disuelta. Los embriones recolectados se pasan a una

solución 1:1 de hipoclorito de sodio con agua destilada, hasta que se decorionan (se observan con ayuda del microscopio estereoscópico). Se saca la malla de la solución y se enjuagan los embriones con agua destilada, se quita el exceso de agua, se transfieren los embriones a un vial de 1.5 ml con 750 μ l de heptano con la ayuda del pincel remojado en heptano (las larvas que contenga el filtrado quedan atrapadas en el pincel).

Una vez recolectados los embriones y puestos en heptano se adicionan 750 μ l de metanol y EGTA 0.5 M (1 μ l por cada 10 μ l de metanol), y se agita vigorosamente por 30 segundos. Se remueve todo el líquido y se lavan 3 veces con metanol, después dos veces con tritón 1% en PBS y se montan en un cubreobjetos con medio de Hoyer para digerir los tejidos blandos. Se observan al microscopio después de 24 horas y se toman las fotografías.

2. Análisis de Southern blot.

2.1 Extracción y purificación del DNA.

Las moscas contenidas en un tubo con medio de cultivo, se depositan en una cámara de CO₂ para que se anestésien, después se toman 30 moscas con un pincel y se depositan en un vial de 1.5 ml, se trituran las moscas con un pistilo de teflón, y se ponen en hielo. A continuación, se prepara el buffer de homogenado (NaCl 80mM, Sacarosa 160mM, EDTA 8mM, y Tris 25mM; pH 8) y el buffer de lisis (EDTA 25mM, pH 9, SDS 1% y Tris 200mM; pH 9), se mezclan (1:1) y se agregan 300 μ l al vial con las moscas previamente machacadas. Se agrega 2 μ l de la enzima proteinasa K, para una concentración de 100 μ g/ml y se incuba a 60°C durante 30 minutos en baño María, se deja enfriar. Se agregan 300 μ l de fenol, se agita 2 minutos y se centrifuga a 14000 rpm por 20 minutos a 4°C, se extrae la fase acuosa con una punta recortada de la parte distal y se pone en un vial nuevo, se repite la operación. Una vez que están en el 3^{er} vial nuevo, se agregan 600 μ l de etanol al 100 % (de preferencia mantenido a -20 °C) y 30 μ l de acetato de potasio 3M. Se observa la aparición de fibras del DNA genómico. Se

centrifuga nuevamente y se decanta el sobrenadante, se adicionan 500 μ l de etanol al 70 % para eliminar el exceso de sales. Se centrifuga y se decanta, se resuspende en 20 μ l de TE (buffer Tris 10mM-EDTA 1mM).

2.2 Digestión y electroforesis de prueba.

Se toman 10 μ l de DNA (equivalentes a 15 moscas) y se colocan en un vial nuevo. Después se añade 1.5 μ l de buffer de digestión 10x (SuRE/Cut buffer A, para *Sau* 3A y SuRE/Cut buffer L, para *Msp* I), 0.5 μ l de RNAsa A (100 μ g/ml), 1 μ l de enzima de restricción (10 unidades de *Sau* 3A ó *Msp* I) y 2 μ l de agua desionizada estéril. Se incuba a 37°C toda la noche. Durante este procedimiento las enzimas de restricción cortan dentro del elemento P y fuera de él (en el caso de las líneas originales), y en muchas secuencias del genoma originando fragmentos de distintos pesos moleculares (en general la abundancia de fragmentos de distinto peso molecular depende de la frecuencia de la secuencia de corte de la enzima), y entre uno de esos fragmentos se espera encontrar uno que tenga una parte del elemento P y secuencias aledañas. Se preparan 50 ml de un gel de agarosa al 0.8 % en TAE 1X (Buffer de electroforesis tris-acetato 0.04M/EDTA 0.001M) y con 2 μ l de bromuro de etidio 10mg/ml, para una concentración final de 4 μ g/ml.

Se coloca el gel en la cámara de electroforesis y se cargan los pozos con una alícuota de la muestra de la digestión y buffer de cargado que contiene azul de bromofenol y azul cianol como colorantes, incluyendo también un marcador de peso molecular y éstos se hacen migrar a 100 volts. Cuando el segundo colorante haya alcanzado 2/3 partes del gel, éste se observa en el transluminador (ya que el bromuro de etidio se intercala en el DNA y flúoresce en presencia de luz UV, es posible visualizar el DNA). De esta manera se comprueba que la digestión del DNA se llevó a cabo exitosamente.

2.3 Purificación del plásmido.

Se sembró la cepa bacteriana “XLBlue” que contiene el plásmido LD47990 en una caja Petri. Este plásmido contiene el cDNA de interés (CG9821-RA) y además confiere resistencia a cloranfenicol. Se cultiva la cepa en un medio de cultivo sólido LB con cloranfenicol, a una concentración entre 98µg/ml de cloranfenicol. Se deja incubando durante 24 horas a 37°C. Después se toma una colonia aislada de la caja Petri y se siembra en un tubo con medio líquido LB con cloranfenicol, se incuba por 13 horas en un agitador para generar mayor cantidad de bacterias portadoras del plásmido. Se vierte el cultivo de cada tubo en un vial de 1.5 ml y se centrifuga hasta concentrar las bacterias en el fondo y se desecha el sobrenadante. El siguiente paso es la purificación del plásmido, según el método de lisis alcalina establecido en el protocolo de “High Pure Plasmid Isolation Kit”, elaborado por Roche.

2.4 Elaboración de la sonda.

El DNA del plásmido purificado se digiere con las enzimas de restricción *Eco* RI y *Xho* I, para liberar el fragmento correspondiente al cDNA de *aqz* (CG9821), en ese plásmido. Se realiza una electroforesis del DNA digerido en un gel de agarosa 0.8 % y se purifica la banda que contiene el cDNA de *aqz* (aproximadamente 2350 pb). Se resuspende el cDNA en 8 µl de agua para PCR. Se utilizan cantidades mayores a 1µg del cDNA en el marcaje, junto con 10 µl de agua para PCR y 5 µl de la solución que contiene los oligonucleótidos de secuencia corta (de 9 nucleótidos, Random 9-mer Primers) algunos de los cuales son complementarios e hibridan con el cDNA para iniciar la polimerización de fragmentos de diferente tamaño. Para ello, el siguiente paso es colocar los tubos a 95°C por 5 minutos y centrifugar a temperatura ambiente para recolectar todo el líquido remanente de las paredes y de la tapa. Después, se agregan 5 µl de buffer 5X para primers (este buffer contiene todos los nucleótidos no marcados), 2.5 µl del nucleótido marcado con ³²P radioactivo [(α-³²P) dCTP a 3000 Ci/mmol] y 0.5 µl de enzima DNA polimerasa (5U/µl). Se incuba a 37°C durante 10 minutos. Se agrega al tubo entonces 2 µl de una solución de EDTA 0.5 N, para detener la reacción. Se

lleva a 100 μ l con agua desionizada estéril. La muestra se purifica pasándola por una columna (Quick Spin columns, Roche) y se centrifuga por 3 minutos a 2500 RPM. Se elimina la columna y el líquido del tubo colector (sonda) se desnaturaliza por 10 minutos a 95°C y se agrega en buffer de hibridación a la membrana previamente pre-hibridada de acuerdo al protocolo de Sambrook, 1989. Se deja hibridar toda la noche a 42°C en un horno de hibridación. Al día siguiente se lava con SSC 0.1X (cloruro de sodio/citrato de sodio; Sambrook, 1989) y SDS 0.1% de acuerdo con lo descrito antes.

2.5 Southern Blot

Esta técnica incluye la purificación y digestión del DNA descritas anteriormente, pero con la diferencia de que se carga toda la muestra de la digestión del DNA (3.6 mg/ml aproximadamente) y el gel se corre entre 18 y 30 volts durante toda la noche.

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

Enseguida se forra una base para colocar el gel con papel filtro Whatman 3MM. Esta base se coloca dentro de un recipiente, y ahí mismo se agrega buffer SSC 20X para humedecer el papel, tratando de evitar la formación de burbujas. En caso de que se formen, se pasa un lapicero redondo para sacar las burbujas. Se coloca el gel boca abajo, y encima una membrana de nitrocelulosa del tamaño del gel previamente humedecido. Después se agrega suficiente buffer de transferencia (SSC 20X) para la transferencia del DNA del gel a la membrana de nitrocelulosa. Para orientar la posición del gel en la membrana de nitrocelulosa, se les hace un pequeño corte en una de las

esquinas del gel y del filtro. Después se coloca una torre de papel absorbente y un poco de peso sobre la torre, para ejercer presión contra el gel. Se deja la transferencia toda la noche. Al día siguiente se toma la membrana, se fija el DNA a la misma con luz UV en un aparato UV Crosslinker por 25 segundos, usando una energía de $7 \times 10^5 \mu\text{J}/\text{cm}^2$. Se utiliza esta membrana para llevar a cabo la hibridación.

Se pone la membrana a prehibridar a 42°C en solución de hibridación (50% Formamida, 6X SSC, 0.5% SDS, 5X reactivo de Denhardtts, esperma de salmón a $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ y 0.05 M buffer de fosfatos; pH 7), y posteriormente se agrega una sonda desnaturalizada y marcada con radioactividad (descrita anteriormente). Se deja hibridar durante 13 horas. Luego se saca del medio de hibridación, se lava 3 veces en 0.1X SSC, 0.1% SDS con agitación y se mide el nivel de radioactividad en la membrana con un contador Geiger. Si la radioactividad remanente es de un nivel adecuado (de 0.5 a 1.5×10^6 cpm), se coloca en un cartucho para exposición de la membrana, si no se continúa lavando. Una vez que se tenga el nivel adecuado de radioactividad en la membrana, se expone la membrana radioactiva a una pantalla sensible a las partículas emitidas por ^{32}P durante 24 horas y posteriormente se revela en el Storm (Phosphoimager) y se obtiene una imagen digital.

3. Amplificación por PCR.

Se sigue el protocolo descrito previamente de la colecta de embriones y de ellos se purifica el DNA.

3.1 Extracción de DNA

Primero se decorionan los embriones muertos a mano con ayuda de unas pinzas de disección, después se ponen 5 embriones en un vial de 0.5 ml, y se maceran con la punta de una pipeta que contiene 20 μl de SB (el SB contiene Tris-HCl 10 mM a pH 8.2, EDTA 1mM, NaCl 25 mM y 200 $\mu\text{g} / \text{ml}$ de proteinasa K), se incuban a 37°C por 30 minutos y se inactiva la proteinasa K calentando a 95°C durante 2 minutos.

3.2 PCR

En un vial para PCR de 0.2 ml se adiciona una cantidad mayor a 1 μ g del DNA obtenido en el paso anterior, con 0.25 μ l de dNTPs 10 mM, 1 μ l del primer #1, 1 μ l del primer #2, 2 μ l del buffer para PCR 10 X, 0.5 μ l enzima Taq 5U/ μ l para 2.5U/ μ l final, 1.2 μ l de MgCl₂ para 1.5 mM final y 10 μ l de H₂O para PCR. Las secuencias de los primers se definieron a partir de la secuencia genómica con ayuda del programa MacVector alrededor de los sitios de inserción de los transposones.

3.3 Primers para P14691:

Primers	Tm (°C)	Secuencia
P14691-1	81.5	5' ccg cgg tcg ccg cat gtc tga ac 3'
P14691-2	69.9	5' ctc act cgt tgt act tcg acg cg 3'

3.4 Primers para P1492:

Primers	Tm (°C)	Secuencia
P1492-1	80.9	5' ctg cga cac aca cac gca cgc aag c 3'
P1492-2	69.0	5' cgt agt gct aac tac gta acg gct gc 3'



Figura 11. Secuencias amplificadas para aqz^{P1492} (1 y 2) y aqz^{P14691} (1 y 2). La zona de amplificación para los primers aqz^{P14691} (1 y 2), abarca parte de la zona de regulación del gen *aqz* y el sitio que ocupaba el elemento P en el stock original, con un tamaño aproximado de 360 bp del producto de amplificación. Para los primers de aqz^{P1492} (1 y 2), la zona de regulación abarca secuencia codificante para un intrón y el sitio que ocupaba el elemento P en el stock original, con un tamaño aproximado de 300 pb del producto de amplificación.

Las condiciones del termociclador dadas las características de los primers son:

Para ambos pares:

- 1 X : 94° C, 1min.
- 30 X : 94° C, 30 seg.
- 30 X : 58° C, 50 seg.
- 30 X : 72° C, 50 seg.
- 1 X : 72° C, 5 min.

Después, los productos de amplificación se analizan por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%. Para comprobar si se han amplificado correctamente los fragmentos deseados, se usa un gel a mayor concentración (al 1.2% de agarosa) una vez que se ha comprobado que los primers amplifican.

3.5 Secuenciación de DNA

Se ligan los fragmentos amplificados a un vector pGEM-T que provee resistencia a ampicilina, según el protocolo del kit pGEM-T Easy Vector System (Promega) y se transforman en bacterias competentes para obtener el plásmido con el inserto (3.6 Transformación de bacterias). Se purifica el plásmido de las bacterias como se indica en la sección anterior (2.3 Purificación del plásmido). El plásmido purificado se secuencia por el método “Big Dye de Applied Biosystems”, en una maquina de PCR y en un secuenciador “ABI PRISM 310 Genetic Analyzer”, esto ultimo se realizó con el apoyo de la unidad de Proteogenómica del Instituto de Neurobiología de la UNAM.

3.6 Transformación de bacterias.

La transformación se hace en bacterias de *E. coli* competentes (por el método de choque térmico). Se toman 2 μ l del producto de ligación, junto con 50 μ l de células competentes y se vierten en un tubo de 1.5 ml. Se agita el tubo suavemente para mezclar y se incuba en hielo por 20 minutos. Se calienta a 42° C durante 90 segundos sin agitar. Se vuelven a poner en hielo por 2 minutos, se adicionan 800 μ l de medio SOC (composición en Sambrook, J. y col., 1989) y se incuban a 37° C durante 1.5 horas, con agitación a 300 rpm. Finalmente se siembran las bacterias en placas con medio LB/ampicilina/IPTG/X-Gal (protocolo descrito más adelante) y se incuban a 37° C por 24 hrs. Se seleccionan colonias que incorporaron el plásmido porque crecieron en el medio selectivo y son blancas, y se crecen en un medio líquido.

3.7 Elaboración de medios de cultivo en placa LB/ampicilina/IPTG/X-Gal.

Se hacen medios de cultivo LB en placa con ampicilina (100µg/ml); se agregan 100 µl de IPTG 100mM y 20 µl de X-Gal a una concentración de 50 mg/ml y se esparcen sobre la superficie de la placa LB-ampicilina. Antes de usar se deja reposar para que se absorban las soluciones IPTG/X-Gal por 30 minutos a 37 °C.

(Sambrook, J., y col. 1989)

4. Análisis de expresión de *aqz*.

4.1 Hibridación *in situ*

Se agregan 600 µl de PBS y 100 µl de formaldehído al 37% y 75 µl de EGTA 0.5 M pH 7 para fijar embriones decorionados en heptano, tal y como está descrito en el protocolo para la obtención de embriones en la preparación de cutículas y se agitan suavemente durante 20 min. Posteriormente se dejan sedimentar y se extrae la fase inferior (orgánica) sin llevarse los embriones que están contenidos en la interfase. Después se adicionan 750 µl de metanol al 100% y se agita vigorosamente por 2 minutos para eliminar las membranas vitelinas. Se dejan sedimentar y se extrae la mezcla líquida (una forma de ver si ha sido removida la membrana adecuadamente es observando que los embriones se sedimentan en el fondo del tubo). Cuando los embriones ya se encuentran en metanol, se pueden guardar a -20° C.

Para aclararlos, se dejan a temperatura ambiente y se lavan tres veces con etanol. Después se ponen en una mezcla etanol/xileno 1:1, y finalmente se cambian a xileno, con agitación suave por rotación durante 2 horas y media. Después se pasan nuevamente por una mezcla etanol/xileno 1:1, y se lavan tres veces con etanol. Se lavan una o dos veces con metanol (se pueden guardar a - 20° C si no se usan de inmediato). Se pasan los embriones a un vial de 0.5 ml con la punta recortada de una pipeta automática para no romperlos. Se incuban con agitación por 5 minutos en una mezcla de metanol y solución de fijación, que consiste en PBT (PBS y 0.3% de Tween)

y 5% de formaldehído al 37%. Después se incuban en solución de fijación durante 25 minutos, con agitación, y luego se lavan tres veces con PBT. Se incuban entre dos o tres minutos con proteinasa K (100µg/ml), para permitir que penetre más fácilmente la sonda. Se detiene la reacción lavando dos o tres veces con PBT. Se vuelven a fijar con solución de fijación por 25 minutos con agitación. Se lavan entonces tres veces por 2 minutos con PBT fresco. Se agitan 10 minutos en solución de hibridación y PBT 1:1 (la solución de hibridación contiene: formamida al 50%, SSC 5X, esperma de salmón sonificado, y 0.1% de Tween 20). Se pre-hibridan por una hora en solución de hibridación a 55° C. Se desnaturaliza la sonda (RNA antisentido que contiene nucleótidos con digoxigenina) en solución de hibridación por 5 a 10 minutos a 80° C y se pone la sonda inmediatamente en hielo. Se remueve la solución de prehibridación y se adiciona la sonda desnaturalizada en solución de hibridación. Se hibrida toda la noche a 55°C. Al día siguiente se diluye el anticuerpo anti-digoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina 1:200 en PBT y se incuba el anticuerpo con rotación a temperatura ambiente con embriones fijados para preabsorber el anticuerpo.

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

Se incuban entonces los embriones por una hora con 45 minutos con el anticuerpo pre-absorbido en dilución 1:2000 en PBT (esta parte y lo siguiente a temperatura ambiente). Se lavan tres o cuatro veces por 15 minutos cada uno en PBT fresco. Se lavan dos veces por 5 minutos cada una en solución de revelado recién hecha (NaCl 100mM, MgCl₂ 50 mM, Tris-HCl 100 mM pH 9.5). Se remueve la solución de los lavados y adiciona solución de revelado con el sustrato NBT-BCIP (Roche) y se incuba en la oscuridad. Se monitorea la reacción, se detiene lavando con PBT y se montan los embriones. Se observan al microscopio y se toman las fotografías.

4.2 Elaboración de la sonda con digoxigenina.

De la cepa bacteriana LD47990, se purifica el plásmido como se mencionó anteriormente. El DNA del plásmido recién purificado se digiere con enzimas de restricción *Eco* RI (antisentido) o con *Xho* I (sentido), para linearizar el plásmido y posteriormente sintetizar sondas “antisense” y “sense” respectivamente. Se realiza una electroforesis del DNA digerido en un gel de agarosa 0.8 % y se purifica el fragmento que corresponde al tamaño del plasmido linearizado. Se resuspende el DNA en 15 μ l de agua DEPC. Se agregan los siguientes reactivos a un vial estéril libre de RNAsas: 6 μ l de DNA del plásmido linearizado (cantidad mayor a 1 μ g), 2 μ l de buffer de transcripción 10X, 2 μ l de una mezcla de nucleótidos marcados 10X, 1 μ l de inhibidor de RNAsas y 2 μ l (2 U/ μ l) de RNA polimerasa (SP6 ó T7), todo esto en un volumen final de 20 μ l con agua tratada con DEPC. Se mezcla suavemente y se incuba por dos horas a 37°C. A continuación se agregan 2.5 μ l de LiCl 4M y 75 μ l de etanol frío y se deja reposar por 30 minutos a -70°C o por 2 horas a -20°C. Se centrifuga por 15 minutos a 14 000 RPM a 4 °C. Se enjuaga el pellet con etanol al 70% y se centrifuga por 5 minutos. Se seca y se resuspende en 50 μ l de solución de hibridación.

4.3 Generación de anticuerpos

Se sintetizó un péptido derivado de la secuencia de *aqz* (sintetizado *in vitro* por Sigma). Las inmunizaciones se hicieron en ratas, siguiendo el protocolo estándar (PRF&L Standard Protocols for Custom Polyclonal Production in Rats and Mice). La primera inmunización se hizo con el antígeno mezclado con el adyuvante de Freund completo, y posteriormente, cada quince días, se dieron refuerzos con el antígeno mezclado con el adyuvante de Freund incompleto. Todas las inyecciones se hicieron de manera subcutánea. En la primera ocasión también se sangra las ratas o ratones para obtener suero pre-inmune. Para esto, y para ulteriores sangrados, excepto el final, se obtiene sangre por medio de un capilar roto insertado detrás del ojo de las ratas o ratones. El sangrado final se hace por decapitación de la rata y por punción cardiaca en los ratones. A partir de la cuarta inmunización se hicieron sangrados cada mes, y se

monitoreó la especificidad de los anticuerpos por medio de Western blots. El suero se purificó por centrifugación de la sangre completa obtenida.

4.4 Purificación de anticuerpos. Cromatografía de afinidad con proteína G.

Se utilizan columnas de sefarosa-proteína G. En general estas columnas se pueden conseguir de proveedores (Sigma, Pharmacia, etc.) ya activadas. El gel se hidrata y se monta en una columna de plástico o vidrio (se puede usar incluso una jeringa) y se mantiene equilibrada a 4°C, en presencia de azida de sodio 0.02% p/v. Cuando se va a utilizar se lava con 5 volúmenes de PBS o la solución en que se tiene la mezcla a purificar. El suero se incorpora a la columna mediante goteo sobre la columna dejándola fluir; cuando se utilizan sobrenadantes de cultivo e hibridomas, el pH se ajusta a 8.5 con 1/10 volumen de Tris-base 2M. Cuando se termina de incorporar a la columna la muestra, se suspende el flujo de la columna y se incuba durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se eluye con PBS (pH 7.2 para sueros o pH 8.5 para sobrenadantes de cultivo) y se colecta el líquido en tubos numerados, aproximadamente un mililitro en cada uno. Se lee la absorbancia a 280 nm del líquido recuperado en cada tubo en un espectrofotómetro y cuando se obtiene una lectura menor a 0.05 se empieza a lavar la columna con solución de glicina 0.1 M, pH. 2.5. Se colectan todas las fracciones cuya absorbancia resulte entonces mayor de 0.5. El volumen total colectado se dializa contra PBS con tres cambios a temperatura ambiente en períodos de 20 minutos o durante toda la noche a 4°C.

4.5 Western blots

Se prepara primero un gel de poliacrilamida al 10%. Esto se hace polimerizando 24 ml. de una mezcla de gel resolutivo que contiene 5.4 ml. de acrilamida/ bisacrilamida (29:1) al 40% con 12 µl de TEMED, 15.6 ml. de agua desionizada, 60 µl de 20% de persulfato de amonio y 3 ml. de buffer de gel resolutivo 8x entre dos placas de vidrio montadas para minigel de acrilamida. El buffer 8x resolutivo se hace disolviendo 36.3 grs. de Trizma base con 0.8 grs. de SDS en 100 ml. de agua desionizada y ajustando el pH a 8.8 con ácido clorhídrico concentrado. Al gel resolutivo se agrega 1 ml. de butanol

y se espera a que polimerice. Una vez polimerizado, se retira el butanol y se vierten 8 ml. de gel preparativo. El gel preparativo se hace mezclando 1 ml de la misma mezcla de acrilamida/ bisacrilamida descrita arriba con 8 μ l de TEMED, 5 ml de agua desionizada, 2 ml de buffer de gel preparativo 4x y 21.6 μ l de persulfato de amonio al 20%. El buffer de gel preparativo 4x se prepara disolviendo 6.05 grs. de Trizma base con 0.4 grs. de SDS en 100 ml de agua desionizada, y ajustando el pH a 6.8. Una vez que se ha terminado de verter este gel entre las placas, se inserta el peine y se deja polimerizar. Una vez polimerizado el gel, se coloca en el aparato de electroforesis y se agrega buffer de corrida. El buffer de corrida se prepara disolviendo 3.03 grs. de Trizma base con 14.4 grs. de glicina y 1 grs. de SDS en un litro de agua desionizada. Se preparan entonces las muestras. Se maceran de 20 a 30 embriones en 20 a 30 μ l de buffer de Laemmli 2x, y se hierven por cinco minutos a 95°C. El buffer de Laemmli 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 el homogenado en el gel. En un carril aledaño se cargan proteínas estándares preteñidas de pesos moleculares conocidos, se lleva a cabo la electroforesis y se separan las proteínas por tamaño. El gel se separa entonces del aparato de electroforesis, y se transfieren las proteínas en un aparato para transferencias semi-secas de BioRad por media hora a 10-15 volts a un filtro de PVDF. Este filtro se tiñe después con solución de Ponceau por uno a dos minutos, para corroborar la transferencia, y se decolora en el chorro de agua. Si la transferencia es correcta, el filtro se bloquea de 30 a 60 minutos en una solución de PBS-Tritón al 0.1% (PBT) adicionada de 5% de leche sin grasa. El filtro se incuba después en una solución de PBT con el anticuerpo primario diluido de 1:500 a 1:1000 toda la noche a 4°C. Se lava al día siguiente tres veces con PBT, y se incuba entonces por una hora, a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-rata acoplado a fosfatasa alcalina, a una concentración de 1:1000 a 1:2000. Se lava el filtro tres veces con PBT, después con la solución reveladora (NaCl 100mM, MgCl₂ 50 mM, Tris-HCl 100 mM pH 9.5), y se incuba en la oscuridad con el sustrato NBT-BCIP (Roche) en solución reveladora, y al igual que el protocolo de la hibridación *in situ*, se monitorea el desarrollo de la reacción. La reacción se para lavando con PBS, y se seca el filtro. Se toman fotografías.

4.6 Tinción con anticuerpos (Inmunohistoquímica).

Una vez que se han obtenido sueros anti-aqz de buen título y especificidad, se preparan y fijan los embriones. Los embriones se recolectan y se decorionan como se indica en la preparación de cutículas. Se agregan 675 ml de formaldehído al 37% y 75 ml de EGTA 0.5 M pH 7 para fijar los embriones y se agitan suavemente durante 5 min. Posteriormente se dejan sedimentar y se extrae la fase inferior (orgánica) sin llevarse los embriones que están contenidos en la interfase. Después se agregan 750 ml de metanol al 100% y se agita vigorosamente durante 2 min. para eliminar las membranas vitelinas. Los embriones fijados en metanol se rehidratan pasando de metanol 100% a metanol 70%, metanol 50% y finalmente a PBS adicionado de 0.3% de triton X-100 (PBS-T). Se hacen dos lavados con PBS-T, y se bloquean entre media hora y una hora a temperatura ambiente con PBS-T/ 25% de suero fetal bovino. Después se incuban con el anticuerpo primario en PBS-T/ 5% de suero fetal bovino durante toda la noche a 4°C con rotación. Para este y los pasos subsecuentes se usa esta solución de PBS-T/ 5% de suero fetal bovino. Al día siguiente se lavan los embriones tres veces por cinco minutos cada vez con agitación suave a temperatura ambiente (este y los subsecuentes pasos se llevan a cabo a temperatura ambiente, 20-25° C), y se incuban con el anticuerpo secundario, 1:1000 generalmente, acoplado a fosfatasa alcalina, o bien a fluoróforos. La solución con el anticuerpo primario se puede reutilizar, si se guarda a 4° C, y se le adiciona 0.1% de azida de sodio. Previamente, el anticuerpo secundario ha sido preincubado con embriones fijados y rehidratados durante una hora para reducir señal no específica. Después, los embriones se lavan tres veces, y se montan en Vectashield, para observaciones en el microscopio de fluorescencia o confocal, o bien, se incuban y revelan en solución de revelado para fosfatasa alcalina, tal y como está descrito en la técnica de hibridación *in situ*, y se montan con Polymount para observaciones en el microscopio de luz.

RESULTADOS.

Con base en la información publicada de la línea mutante aqz^{P1492} (Perrimon y col., 1996), lo reportado en la base de datos y los resultados obtenidos previamente en el laboratorio (Mendoza-Ortiz, 2004), en este proyecto continuamos con la descripción funcional de aqz . Realizamos la caracterización de nuevos alelos mutantes generados en el laboratorio, que evaluamos genética y molecularmente para conformar una serie alélica de aqz . Utilizamos el cDNA LD47990, que incluye la secuencia publicada de aqz , para evaluar la expresión de aqz en diferentes etapas del ciclo de vida de *D. melanogaster*. Además, diseñamos y mandamos sintetizar un péptido a partir de la secuencia hipotética predicha de Aqz y lo inoculamos en ratas y ratones para obtener anticuerpos anti-Aqz. Una vez purificados los anticuerpos, evaluamos la expresión de Aqz en la embriogenesis y en la etapa adulta.

1. CARACTERIZACIÓN DE LOS NUEVOS ALELOS MUTANTES DE aqz .

A partir de la escisión del elemento P de las líneas mutantes aqz^{P1492} y aqz^{P14691} , se generaron alelos revertientes y 27 nuevos alelos mutantes de aqz , que son letales embrionarios. Se obtuvieron 3 nuevos alelos de la línea aqz^{P1492} y 24 de la línea aqz^{P14691} . Los principales defectos observados en los alelos mutantes fueron: la presencia de un hoyo a nivel dorsal y en menor proporción en la región cefálica, además de defectos en la segmentación del embrión y algunos hoyos ventrales (Ver Tabla 2). El porcentaje de defectos, referido al 100% de los embriones con defectos, fue muy bajo para el caso de alelos mutantes derivados de aqz^{P1492} . Los alelos mutantes derivados de aqz^{P14691} presentaron un porcentaje de defectos alto, pero ninguno presentó el 100% teórico esperado (Fig. 12).

1.1 Nuevos alelos mutantes de *aqz*.



LINEA P1492				% DEFECTOS				
Alelo	TOTAL	%NORMALES	%DEFECTOS	%CERRADO DORSAL	%APERTURA VENTRAL	%FUSION DE SEGMENTOS	%INVOLUCION DE LA CABEZA	%DEFECTOS MULTIPLES
M 001	781	94.75	5.25	0.00	0.00	56.10	43.90	0.00
M 004	519	90.56	9.44	0.00	0.00	91.84	10.20	0.00
M 021	408	91.42	8.58	0.00	0.00	54.29	40.00	0.00
LINEA P14691				% DEFECTOS				
Alelo	TOTAL	%NORMALES	%DEFECTOS	%CERRADO DORSAL	%APERTURA VENTRAL	%FUSION DE SEGMENTOS	%INVOLUCION DE LA CABEZA	%DEFECTOS MULTIPLES
MC018	444	89.86	10.14	11.11	2.22	75.56	6.67	4.44
MA031	165	84.85	15.15	24.00	12.00	40.00	16.00	8.00
MB034	240	92.08	7.92	5.26	0.00	68.42	10.53	15.79
MB039	174	81.03	18.97	3.03	3.03	42.42	33.33	18.18
MB041	429	77.16	22.84	3.06	3.06	53.06	20.41	20.41
MB044	483	90.06	9.94	0.00	4.17	56.25	29.17	10.42
MB049	274	80.29	19.71	5.56	0.00	42.59	27.78	24.07
MB055	504	85.32	14.68	5.41	0.00	17.57	37.84	39.19
MB057	545	90.64	9.36	0.00	0.00	47.06	7.84	45.10
MA075	769	87.39	12.61	4.12	0.00	41.24	18.56	36.08
MA090	805	83.35	16.65	5.97	0.00	31.34	37.31	25.37
MB096	438	88.13	11.87	3.85	0.00	34.62	42.31	19.23
MC097	684	85.09	14.91	0.00	1.96	30.39	41.18	26.47
MB113	356	86.52	13.48	2.08	6.25	33.33	33.33	25.00
MB114	133	89.47	10.53	0.00	0.00	57.14	14.29	28.57
MB116	465	91.61	8.39	0.00	0.00	48.72	23.08	28.21
MB148	578	89.10	10.90	1.59	0.00	41.27	19.05	38.10
MB153	498	88.35	11.65	5.17	0.00	29.31	34.48	31.03
MB163	629	84.42	15.58	5.10	1.02	23.47	53.06	17.35
MB122	544	84.38	15.63	4.71	0.00	47.06	15.29	32.94
MC129	548	90.51	9.49	3.85	0.00	34.62	36.54	25.00
MC184	162	87.65	12.35	0.00	0.00	10.00	50.00	40.00
MB186	145	86.90	13.10	0.00	0.00	42.11	26.32	31.58
MB197	235	87.23	12.77	0.00	0.00	26.67	40.00	33.33
MC214	431	84.92	15.08	12.31	0.00	6.00	9.23	27.69

Tabla 2. Porcentaje de defectos encontrados en cada alelo mutante. Los porcentajes de los diferentes fenotipos mutantes están referidos al 100% de los embriones con defectos, no al total de embriones analizados. La fusión de segmentos, así como la involución de la cabeza son de los defectos que se presentaron con mayor frecuencia.

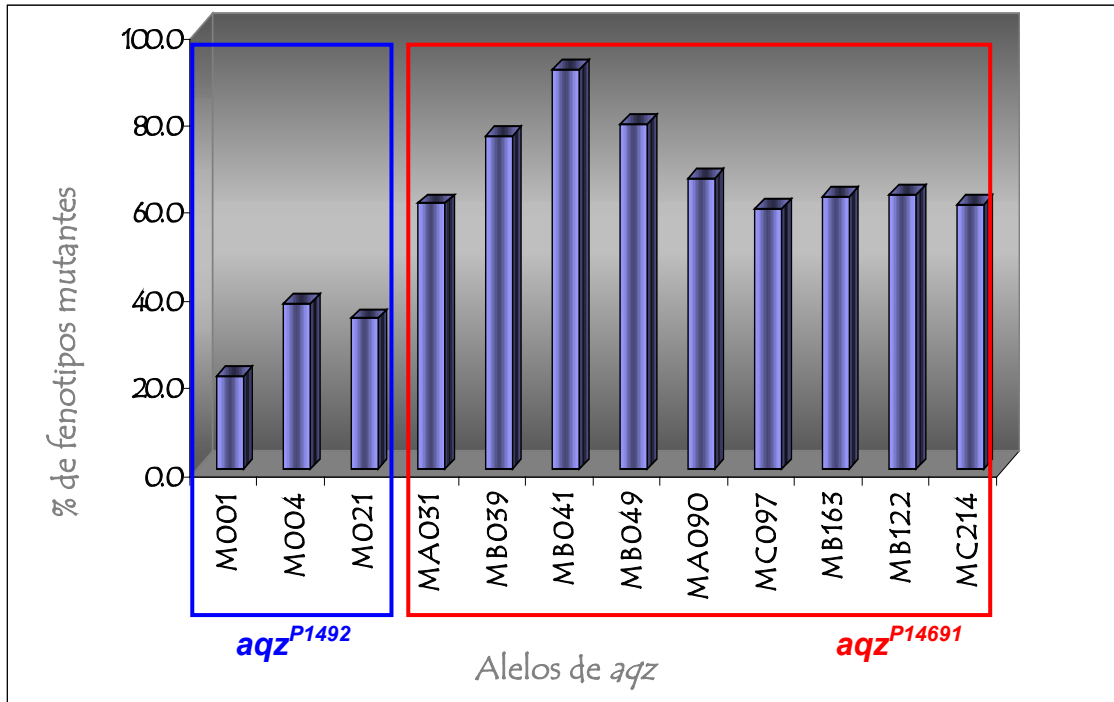


Figura 12. Porcentaje de defectos. Los alelos de aqz^{P1492} presentaron un porcentaje de defectos muy bajo (recuadro rojo). En el caso de los alelos de aqz^{P14691} solo en algunos se observaron porcentajes mayores al 50%, pero ninguno presentó el 100% teórico esperado (recuadro azul). El 100% teórico se refiere al 25% de los embriones.

1.2 Caracterización de la lesión molecular.

1.2.1 Southern blot.

Esta técnica nos permite evaluar diferencias en las lesiones moleculares del gen *aqz* en los alelos mutantes causadas por la escisión del elemento P. Para la realización de este experimento se utilizó DNA genómico de moscas silvestres (*yw*) como control y moscas heterocigotas mutantes para *aqz*. Se repitió el experimento tres veces; cada vez las muestras fueron digeridas con las enzimas de restricción *Msp* I (Fig. 14), *Sau* 3AI (Fig. 15) y *Hin* P1 (Fig. 16). Se utilizó como sonda radiactiva el cDNA LD47990 del gen *aqz*.

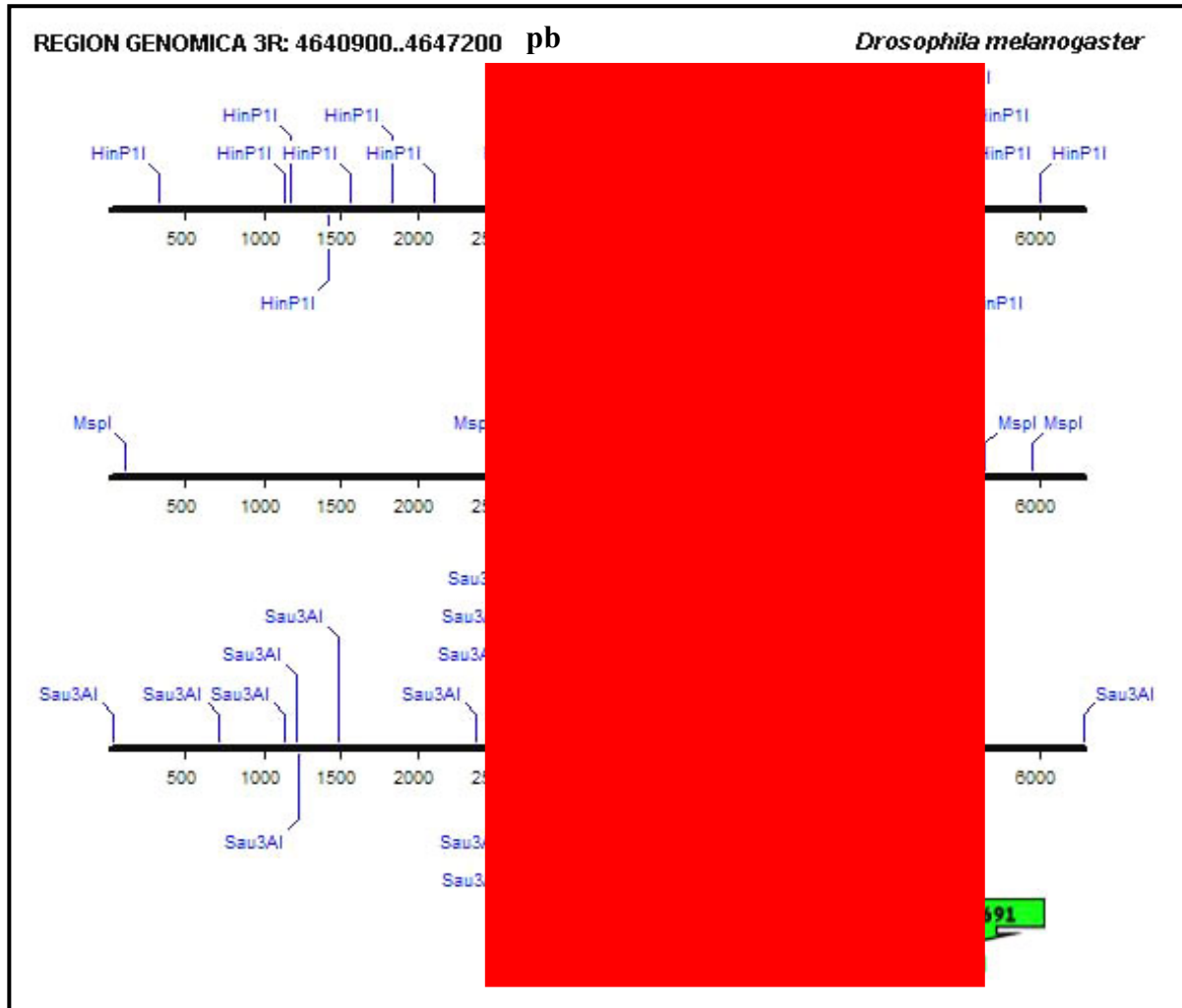


Figura 13. Análisis de restricción de la región genómica 3R:4640900..4647200 de *D. melanogaster*, que incluye la secuencia de *aqz*. En la digestión se utilizó DNA genómico de moscas adultas silvestres y heterocigotos para la mutación. El DNA genómico se digirió con las enzimas *Msp I*, *Sau 3AI* y *Hin P1*, cuyos sitios de restricción están indicados (recuadro rojo). Se indican también los sitios de inserción del elemento P en los alelos *aqz*^{P1492} y *aqz*^{P14691} (verde).

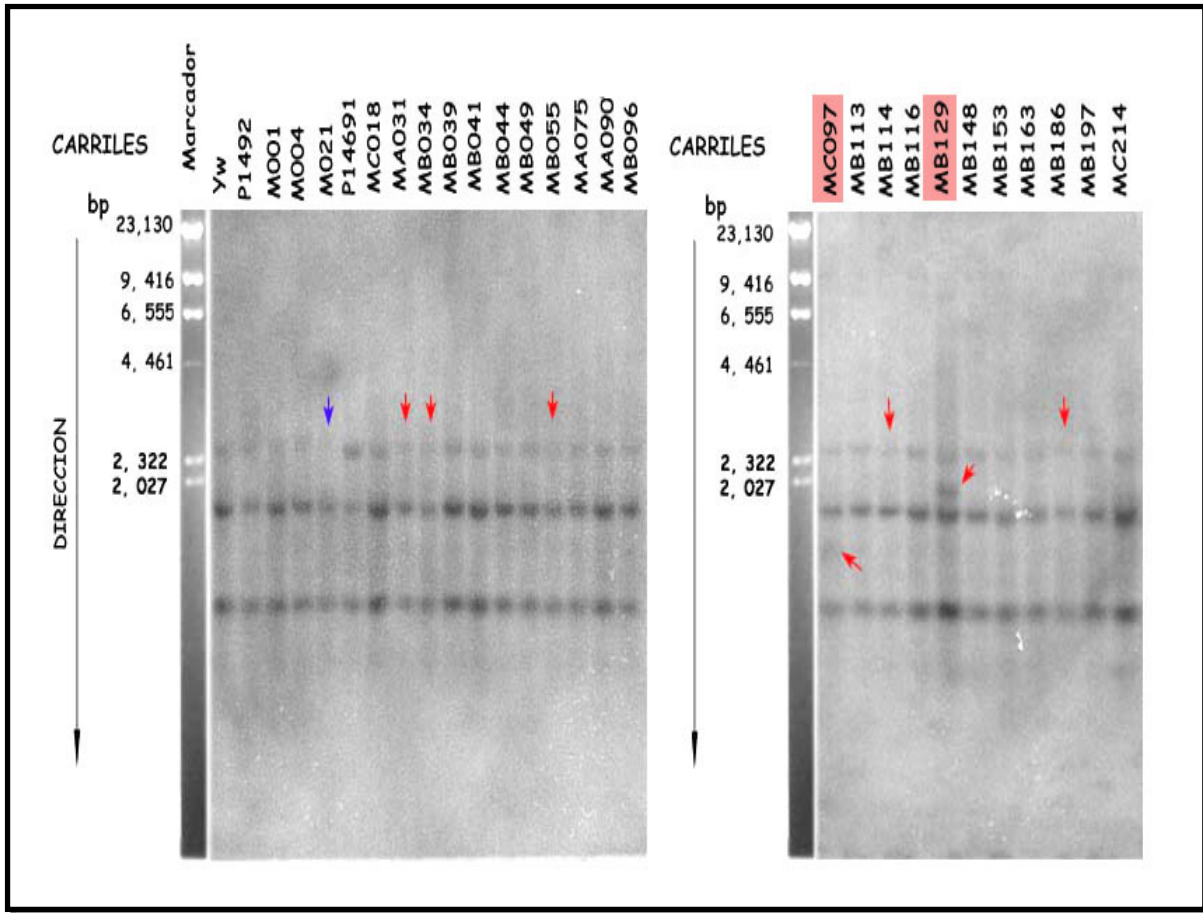


Figura 14. Southern Blot I. El DNA genómico fue digerido con *Msp* I. La mayoría de los fragmentos de DNA de los alelos mutantes migran de manera semejante a los fragmentos de DNA de la línea control y de la línea mutante original con el elemento P (aqz^{P1492} y aqz^{P14691}). Algunos alelos mutantes (flechas azules para alelos de aqz^{P1492} y flechas rojas para alelos de aqz^{P14691}) presentan menor intensidad en el fragmento ubicado entre 4, 461 y 2, 322 pb. En el caso de aqz^{MC097} y aqz^{MB129} se observan fragmentos de diferente tamaño a las líneas parentales (recuadros y flechas rojas).

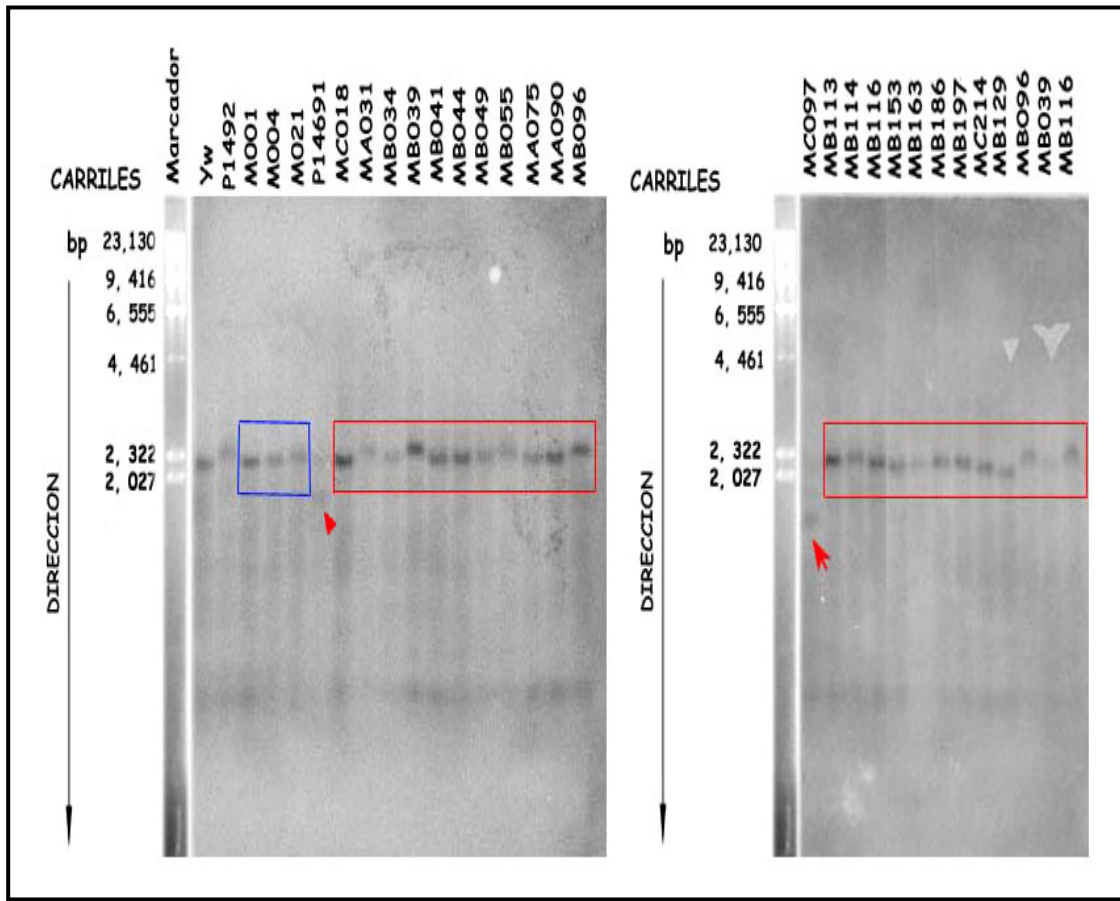


Figura 15. Southern Blot II. El DNA genómico fue digerido con *Sau* 3A. La imagen nos muestra que hay diferencia en la migración de los fragmentos en el DNA de los alelos mutantes (recuadro azul para alelos de la línea aqz^{P1492} y recuadro rojo para alelos de la línea aqz^{P14691}), en comparación con los fragmentos del DNA control (*yw*) y los fragmentos de las líneas mutantes originales (con elemento P). Los alelos mutantes aqz^{P14691} y aqz^{MC097} presentaron un fragmento del mismo tamaño pero de menor intensidad, además de observarse la presencia de otro fragmento mas pequeño (flecha roja).

Como no se observaron diferencias significativas en el análisis de Southern blot II (Fig. 15) para los alelos derivados de aqz^{P1492} en comparación con la línea original y la línea silvestre, decidimos repetir el mismo análisis para corroborar que no hay alteraciones en la secuencia del gen aqz en estos alelos mutantes. Así mismo, incluimos dos de los alelos derivados de aqz^{P14691} , los cuales son: aqz^{MB041} y aqz^{MA090} (Fig. 16). Estos dos últimos alelos mutantes cuentan con un alto porcentaje de defectos, y al igual que los derivados de aqz^{P1492} no presentaron diferencias en el análisis anterior (Ver Tabla 2 y Fig. 12).

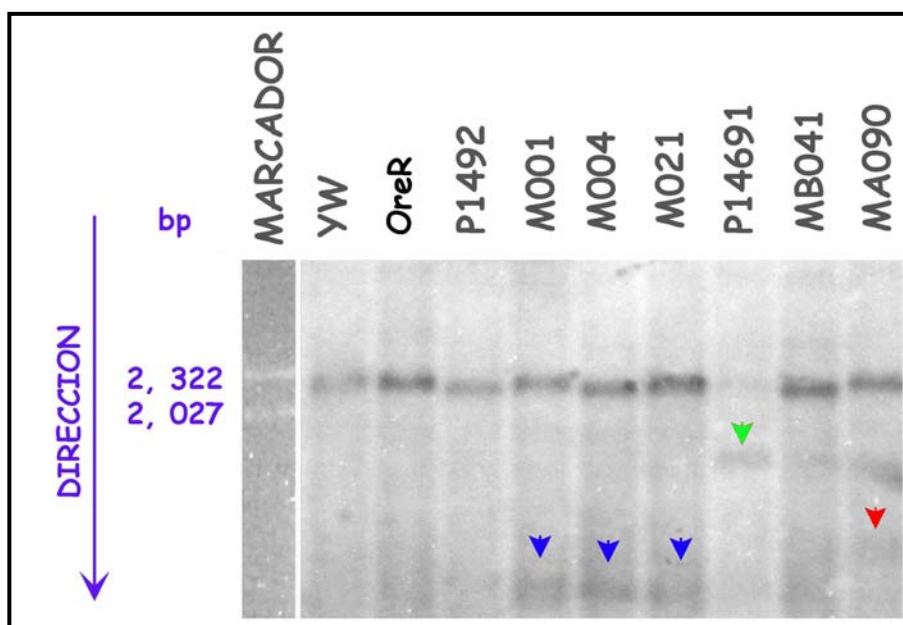


Figura 16. Southern blot III. El DNA genómico fue digerido con *Sau* 3A. Todos los alelos derivados de aqz^{P1492} presentan una banda de mayor intensidad (flecha azul) en comparación con la inserción original y una banda adicional en comparación con los alelos silvestres (*yw* y *OreR*). La inserción original aqz^{P14691} presenta una banda de peso molecular menor a 2, 027 pbases, más intensa en comparación con los alelos aqz^{MB041} y aqz^{MA090} (flecha verde); en el caso de los alelos silvestres (*yw* y *OreR*) no se observa dicha banda. aqz^{MA090} presenta una banda adicional (flecha roja).

Se incluyó un cuarto análisis, Southern blot IV (Fig. 17). En este caso el DNA se digirió con *Hin* P1. La frecuencia con la que esta última enzima reconoce la secuencia de corte en la región del DNA genómico que incluye *aqz*, es alta (Fig. 13). El número de bandas reconocidas por la zonda radiomarcada, fue mayor a los análisis anteriores y se observaron varias diferencias en cuanto a la migración e intensidad de las bandas de los alelos mutantes en comparación con los silvestres (Fig. 17).

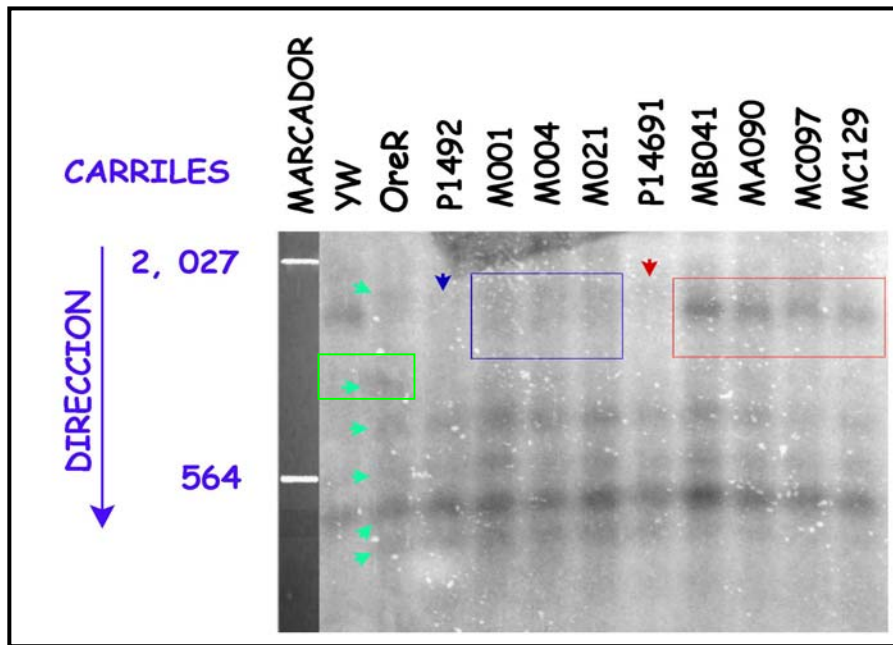


Figura 17. Southern blot IV. EL DNA genómico fue digerido con *Hin* P1. En el caso de los alelos silvestres Oregon R (OreR) y *yw* (yellow white) se reconocen de manera clara 6 bandas (flecha verde). En comparación con las bandas silvestres, las inserciones originales (aqz^{P1492} y aqz^{P14691}) y los alelos derivados de ellas (recuadro azul y rojo), difieren en una banda de tamaño aproximado a las 1400 pb (flecha y recuadro verde). Las inserciones originales difieren de los nuevos alelos y de los alelos silvestres (*yw* y OreR) en una banda por debajo de los 2,027 pb (flecha azul para aqz^{P1492} y flecha roja para aqz^{P14691}).

Al evaluar la precisión de la escisión mediante Southern blot, se obtuvieron resultados que muestran claramente una diferencia en la secuencia nucleotídica entre el DNA silvestre y el DNA genómico mutante de algunos alelos mutantes (aqz^{M001} , aqz^{M004} , aqz^{M021} , aqz^{MB041} y aqz^{MA090}). La escisión del elemento P generó la formación de revertientes (donde el elemento P se escindió completa y precisamente, alelos no mostrados) y alelos mutantes, donde la secuencia nucleotídica de este gen adquirió una lesión molecular, con diferente grado de severidad en cada alelo. Las escisiones imprecisas provocan que la sonda radiomarcada no hibride igual (o simplemente no hibride) con los fragmentos mutantes, en comparación con los fragmentos silvestres. Por esta razón observamos patrones de intensidad y migración diferentes de los fragmentos.

1.2.2 Secuenciación de alelos por PCR.

En el siguiente paso recurrimos a una técnica más discriminativa para determinar la magnitud de las lesiones. Esta técnica consiste en amplificar por PCR la secuencia alrededor de las inserciones y posteriormente la secuenciación de los productos de PCR obtenidos.

Como primer paso se establecieron las condiciones ideales para lograr el amplificado esperado (Fig. 18). En este experimento solo se evaluaron dos de los alelos mutantes (aqz^{MB041} y aqz^{MA090}) que presentaban el fenotipo más penetrante, según la lista de porcentajes de defectos descrita anteriormente (Fig. 11). Como estos alelos provienen de la línea original aqz^{P14691} que tiene la inserción cerca de la zona reguladora del gen aqz , se utilizaron los “primers” correspondientes para amplificar la zona aledaña a esa inserción. Posteriormente estos fragmentos se secuenciaron y se evaluó el daño molecular provocado por la escisión del elemento P en cada alelo. Además, se utilizaron los “primers” diseñados para la inserción del elemento P en la zona del intrón (“primers” para alelos de aqz^{P1492}), con el mismo DNA de estos alelos mutantes originados de aqz^{P14691} . Esto último se hizo con el propósito de establecer un control de amplificación positivo (Fig. 19).

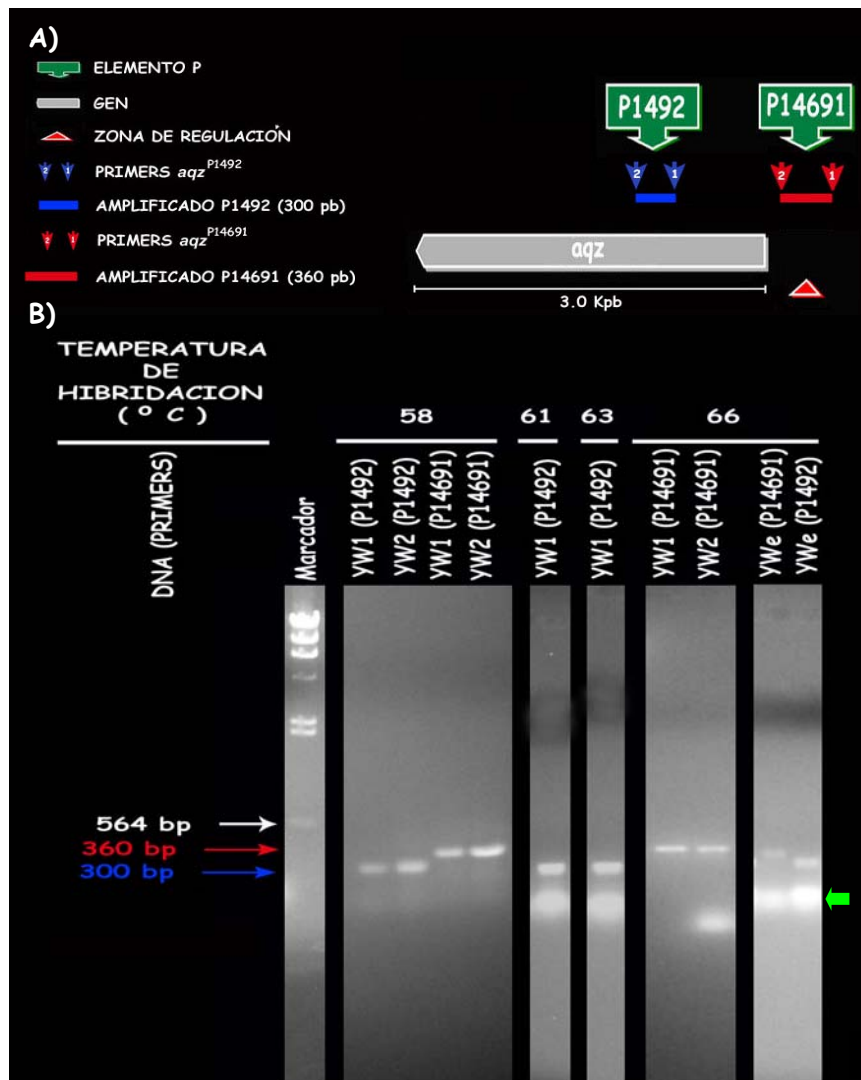


Figura 18. Análisis del gradiente de temperatura de hibridación para los primers.

A) Regiones de amplificación para aqz^{P1492} (1 y 2, color azul) y aqz^{P14691} (1 y 2, color rojo). B) Muestra los resultados del amplificado por PCR del DNA de adultos silvestres (YW1 y YW2) y DNA de embriones silvestres (YWe), utilizando los pares de “primers” aqz^{P1492} (1 y 2, color azul) y aqz^{P14691} (1 y 2, color rojo). Todas las temperaturas evaluadas aquí parecen ser ideales para aqz^{P1492} (1 y 2), y para aqz^{P14691} (1 y 2) sólo 58 y 66°C. La banda de 564 pb es correspondiente al marcador de peso molecular. La flecha verde señala los nucleótidos remanentes.

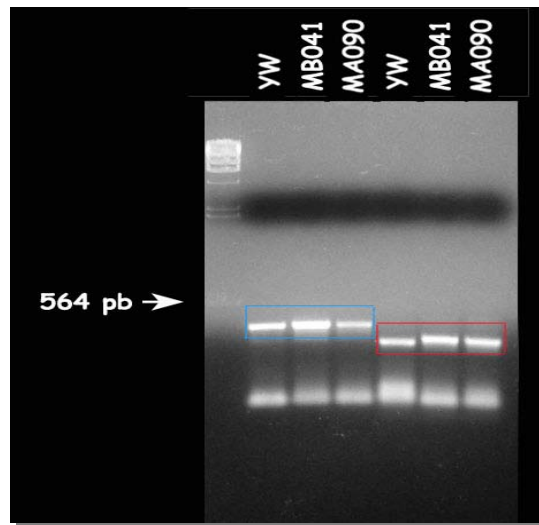


Figura 19. Amplificados de la región genómica aleña a la inserción del elemento P. Recuadro azul, amplificados de 360 pb con primers para aqz^{P14691} (inserción del elemento P en la zona reguladora de aqz). Recuadro rojo, amplificado de 300 pb con primers para aqz^{P1492} (inserción del elemento P en la zona que codifica para el intrón de aqz).

Además de los alelos mutantes aqz^{MB041} y aqz^{MA090} , obtuvimos el amplicón del alelo aqz^{MC097} . Al igual que los anteriores, aqz^{MC097} es un alelo mutante derivado de la inserción original aqz^{P14691} . También incluimos el amplicón del alelo aqz^{M021} , que proviene de la inserción original aqz^{P1492} . Los cuatro alelos (aqz^{M021} , aqz^{MB041} , aqz^{MA090} y aqz^{MA097}) se eligieron por presentar diferencias significativas (diferencias en la intensidad de las bandas o ausencia de las mismas en algunos alelos) en el análisis de Southern blot, y además por presentar un alto porcentaje de defectos mutantes. Todos los fragmentos amplificados por PCR se secuenciaron. La secuencia obtenida del amplicón del alelo aqz^{M021} (300 pb), al igual que la secuencia de los amplicones de los alelos aqz^{MB041} , aqz^{MA090} y aqz^{MC097} (360 pb), no presentaron alteración alguna en comparación con la secuencia genómica silvestre correspondiente. Estos últimos alelos solo presentan un polimorfismo (G a A), debido al fondo genético del cual provienen (Fig. 20).

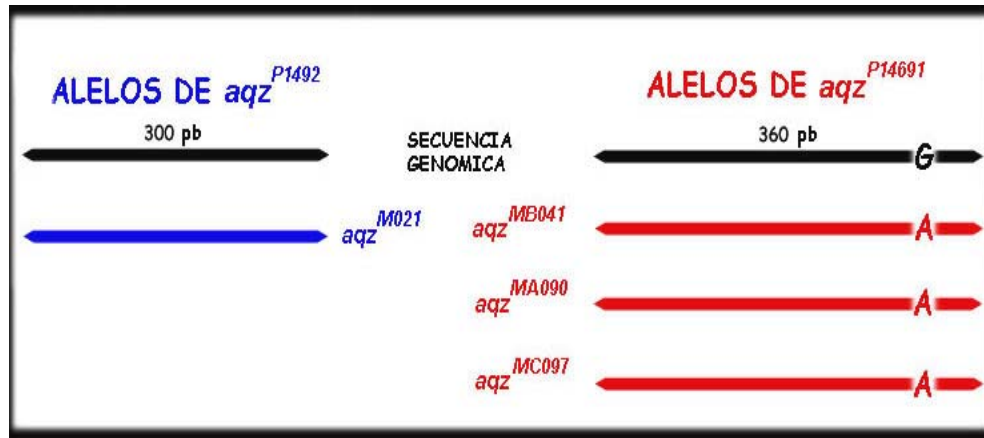


Figura 20. Secuenciación de los amplicones obtenidos. No se observan diferencias de las secuencias mutantes en comparación con la secuencia genómica correspondiente a la zona amplificada. Solo los mutantes derivados de aqz^{P14691} presentaron un polimorfismo (G a A).

1.3 Pruebas de complementación.

Para corroborar genéticamente si todos los nuevos alelos mutantes generados por escisiones de los elementos P1492 y P14691 son alelos de *aqz*, realizamos un análisis de complementación. Además con este análisis podemos evaluar la letalidad en individuos heteroalélicos. Es decir, si en una cruce de individuos heterocigotos $a/+ \times a'/+$, toda la descendencia presenta el alelo silvestre (+) significa que la combinación heteroalélica mutante (a/a') no es viable y es 100% letal. Por tanto, las diferentes mutaciones (a/a') no se complementan entre sí, y esto quiere decir que a y a' son alelos del mismo gen.

1.3.1 Combinaciones interalélicas.

Alelos	Cruzas	Resultados
M001	M001 X M004	No complementaron
M004	M001 X M021	Complementaron
M021	M004 x M021	Complementaron

Los alelos aqz^{M001} y aqz^{M004} complementan con el alelo aqz^{M021} , los tres son derivados de aqz^{P14691} . En el resultado de ambas cruzas (aqz^{M001} o aqz^{M004} X aqz^{M021}), se observó 40% de moscas adultas con el balanceador ausente. Sin embargo, aqz^{M001} y aqz^{M004} , no complementan ya que se encontró que en la cruce de prueba el 100% de la progenie eran heterocigotas adultas (mutante/+). Además, en estas las cruzas, se observaron embriones con defectos similares y defectos mas severos a los presentados por las líneas mutantes originales (Fig. 21).

Las mutaciones derivadas de la escisión del elemento P en la línea aqz^{P14691} , fueron todas alélicas a aqz^{P14691} , es decir, en ningún caso se obtuvo complementación. Esto quiere decir que en todas las cruzas prueba se obtuvieron como descendencia moscas adultas con el genotipo de mutación (1/+ ó 2/+). En cuanto al fenotipo mutante, la progenie resultante de estas cruzas presentó defectos similares a los defectos mutantes de la línea original (Fig. 22).

Las cruzas entre los alelos derivados de ambas líneas (aqz^{P1492} y aqz^{P14691}), no complementaron. Sin embargo el análisis de cutículas de la progenie con combinaciones interalélicas derivadas de aqz^{P1492} y aqz^{P14691} , mostró una disminución en la severidad de algunos fenotipos mutantes (aperturas dorsales, ventrales y anteriores) (Fig. 23).

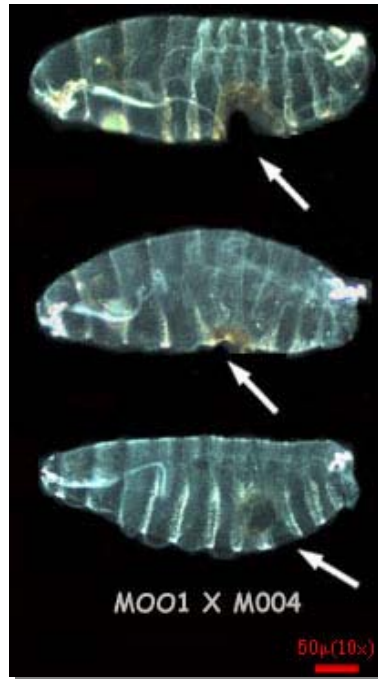


Figura 21. Cutículas de embriones heteroalélicos derivados de escisiones del elemento P de la línea *aqz*^{P1492}. Se puede observar la presencia de defectos de involución de la cabeza (punta de flecha) que presentan los alelos mutantes originales (con el elemento P). Además, se observa la aparición de un nuevo defecto de apertura ventral, con diferencias en la severidad del fenotipo (flechas).

Grupo 1.

Alelos	Cruzas	Resultados
MC018	MC018 X MB039	No complementaron
	MC018 X MB034	No complementaron
MB039	MC018 X MA031	No complementaron
	MC018 X MB049	No complementaron
MB034	MB039 X MB034	No complementaron
	MB039 X MA031	No complementaron
MA031	MB039 X MB049	No complementaron
	MB034 X MA031	No complementaron
MB049	MB034 X MB049	No complementaron
	MA031 X MB049	No complementaron

Grupo 2.

Alelos	Cruzas	Resultados
MB041	MB041 X MB044	No complementaron
	MB041 X MA090	No complementaron
MB044	MB041 X MC129	No complementaron
	MB041 X MB163	No complementaron
MA090	MB044 X MA090	No complementaron
	MB044 X MC129	No complementaron
MC129	MB044 X MB163	No complementaron
	MA090 X MC129	No complementaron
MB163	MA090 X MB163	No complementaron
	MC129 X MB163	No complementaron

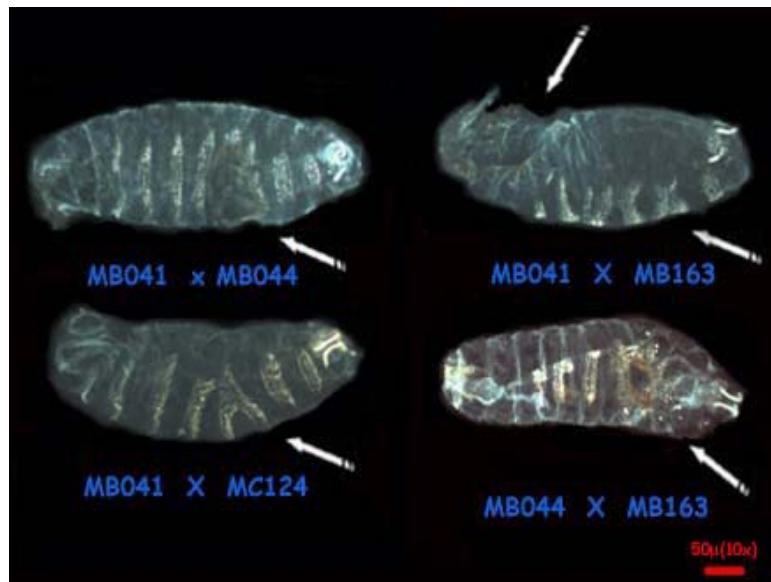


Figura 22. Cutículas de embriones heteroalélicos derivados de la escisión del elemento P de la línea aqz^{P14691} ; las cruzas se hicieron con los alelos más penetrantes. La imagen nos muestra que persisten los mismos defectos de apertura dorsal, apertura ventral, involución de la cabeza y fusión de segmentos que presentan individuos con uno sólo de los alelos (flechas).

1.3.2 Combinaciones entre los dos grupos de alelos.

Alelos P1492	Alelos P14691	Cruzas	Resultados
M001	MB034	MB034 X M001	No complementaron
		MB034 X M004	No complementaron
		MB034 X M021	No complementaron
M004	MB041	MB041 X M001	No complementaron
		MB041 X M004	No complementaron
	MA090	MA090 X M001	No complementaron
MA090 X M004		No complementaron	
M021	MC129	MC129 X M001	No complementaron
		MC129 X M004	No complementaron
		MC129 X M021	No complementaron

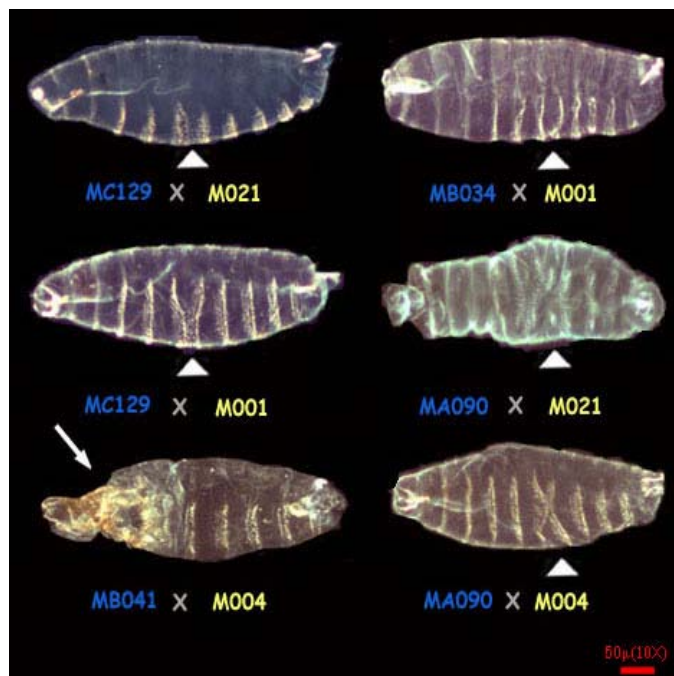


Figura 23. Cutículas de embriones heteroalélicos derivados de la escisión del elemento P de las líneas aqz^{P1492} y aqz^{P14691} . Desaparecen algunos defectos como apertura dorsal y apertura ventral. Persisten los defectos de fusión de segmentos, que sólo se presentaban entre alelos para aqz^{P14691} (punta de flecha). Además se observan, con menos frecuencia, defectos de involución de la cabeza.

2. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL mRNA DE *aqz*.

2.1 Northern blot.

Se utilizó el cDNA del gen *aqz* para sintetizar sondas de RNA radiomarcadas con ^{32}P y evaluar la expresión de *aqz* en moscas adultas.

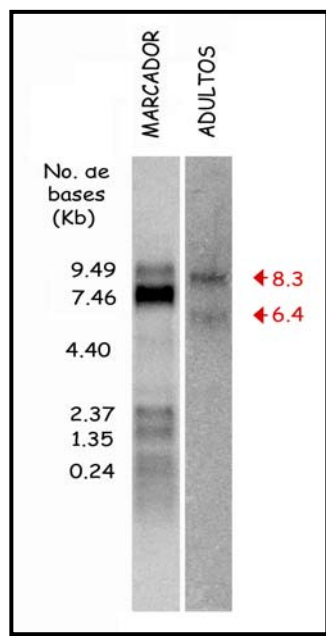


Figura 24. Northern blot. Se observa la presencia de dos transcritos, de 8.3 y 6.4 Kbases (puntas de flecha). El RNA total se purificó de moscas adultas silvestres (*yw*).

Además de la expresión de *aqz* en la etapa adulta (Fig. 24), también se ha observado su expresión en la etapa embrionaria, pero está ausente durante la etapa larvaria y en la etapa de pupa ensayado mediante Northern blot (datos no mostrados).

2.2 Hibridación *in situ*.

Para evaluar la expresión del mensajero (mRNA) de *aqz* durante el desarrollo embrionario de *D. melanogaster*, se utilizaron templados del cDNA del gen *aqz* para sintetizar sondas de RNA con digoxigenina (Fig. 25) y se realizaron los experimentos de hibridación en embriones silvestres (*yw*), de diferentes etapas del estadio embrionario.

El gen *aqz* se expresa en la mayoría de las etapas embrionarias. En embriones tempranos (blastodermo sincicial) *aqz* se expresa de manera uniforme. La expresión es muy baja en todo el embrión pero se observa con mayor intensidad en la región más ventral y más dorsal. La expresión de *aqz* durante esta etapa temprana se atribuye a la contribución materna, ya que no hay expresión aún de los genes cigóticos en esta etapa (Fig. 26A).

Durante la gastrulación, que es la etapa donde se forman los tejidos germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo), *aqz* se expresa en un patrón más restringido a la banda germinal. La banda germinal consiste en una capa interior mesodérmica y una capa exterior ectodérmica (Fig. 26B y C).

Al igual que en la etapa anterior, en la extensión de la banda germinal (la extensión gradual de la banda germinal sobre el lado dorsal del embrión) *aqz* continúa expresándose en la banda germinal (Fig. 26B). Cuando la banda germinal llega a su máxima extensión y se inicia la segmentación de la misma, la expresión de *aqz* se mantiene en la parte más ventral donde se encuentra el tejido ectodérmico (neuroectodermo, tejido del cual se deriva el sistema nervioso), con un poco más de acentuación en la parte anterior; región del cerebro, y en la parte más posterior; región del telson (Fig. 26D y E).

En los inicios de la siguiente etapa, la retracción de la banda germinal, *aqz* se expresa en todo el tejido epitelial (Fig. 26F). Este patrón continúa durante el cerrado dorsal, acentuándose en las células de la hilera guía de la región anterior dorsal y el epitelio

posterior dorsal (Fig. 26G). La expresión al final de este proceso disminuye en gran parte del epitelio, conservándose en las células más laterales y en el epitelio posterior dorsal (Fig. 26H).

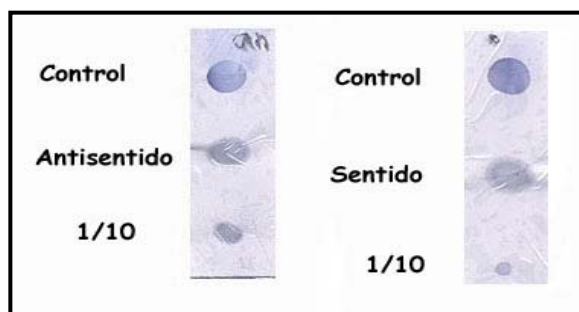


Figura 25. El análisis de dot blot. Esta imagen nos muestra el marcaje con digoxigenina de la sonda antisentido (*Eco* RI) y sentido (*Xho* I) sintetizada a partir de la secuencia del gen *aqz*.

3. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA AQZ.

3.1 Obtención de anticuerpos.

Se sintetizó un péptido a partir de la secuencia nucleotídica predicha del gen *aqz* (ver abajo) y se iniciaron las inmunizaciones en ratas. De acuerdo con la secuencia aminoacídica reportada en FlyBase de la proteína AQZ, se escogió el péptido más estable e inmunogénico, según el análisis del programa MacVector 8.0.1 Accelrys. El programa utiliza algoritmos para predecir ciertas características de las proteínas, tales como hidrofobicidad y estructuras secundarias (α -hélice, hoja β -plegada) y secuencia interna inmunogénica para la generación de anticuerpos. Esta secuencia es la siguiente (destaca en color rojo y subrayado dentro de la secuencia predicha de la proteína):

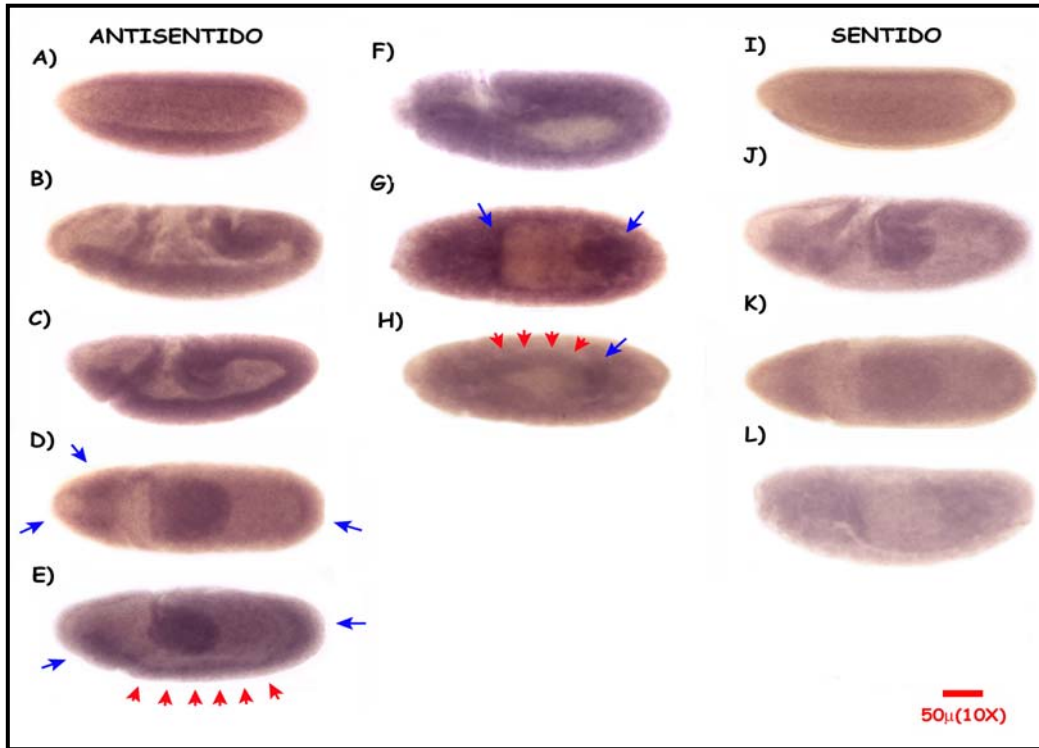


Figura 26. Análisis de la expresión del transcrito *aqz* en embriones silvestres. El patrón de expresión de *aqz* es muy dinámico durante el desarrollo embrionario. En etapas tempranas (blastodermosicicial) *aqz* se expresa en la parte más ventral y más dorsal del embrión (A). Durante la extensión de la banda germinal se encuentra en un patrón más restringido a la banda germinal (B, C y E, flechas rojas), al final de este proceso se intensifica en la parte anterior y posterior del embrión y amnioserosa (D y E, flechas azules). (D, vista dorsal). Durante la retracción de la banda germinal se observa una expresión uniforme en todo el tejido epitelial (F). A inicios del cerrado dorsal se intensifica en las células de la hilera guía (G, flechas azules, vista dorsal). Al final del cerrado dorsal, se observa en las células más laterales (H, flechas rojas) y en el epitelio posterior dorsal (H, flechas azules). Los embriones están orientados con vista lateral, la parte anterior hacia la izquierda y parte dorsal hacia arriba, los embriones D, G, K y L están orientados dorsalmente. La sonda de mRNA antisentido se elaboró a partir del cDNA de *aqz*. Los embriones de las figuras I, J, K y L son embriones silvestres hibridados con la sonda de mRNA sentido.

3.2 Secuencia de la proteína.

“MTYSHNSVRNNIRMTTASATKSIRLKKGAASATSASNSSTPSPTSAPVSPTSVSASAP
ATPLVTAHSNSIASSTNNAQFLSSSPTSLGFGGLGLSALATPPNQRQRQLQSQSTGSKN
KYQQSQQRQSPQQQQGSSVGGGGFFFANNNRRNGGGRSPQGAMQVRQSPATILG
GGFSPGIV GGARKQRKSPSLGGKISPQHMQMHPLIPTALHFAGSKCFDAPAPTAL
PKPPQHWTLRSEGKLPMMMPMPKFQVPMQTGRSKRNLLDDFDTHNLKLLLVQS”

3.3 Péptido antigénico.

El péptido deriva de una porción cercana al carboxilo terminal de la secuencia de la proteína hipotética.

“GGARKQRK”

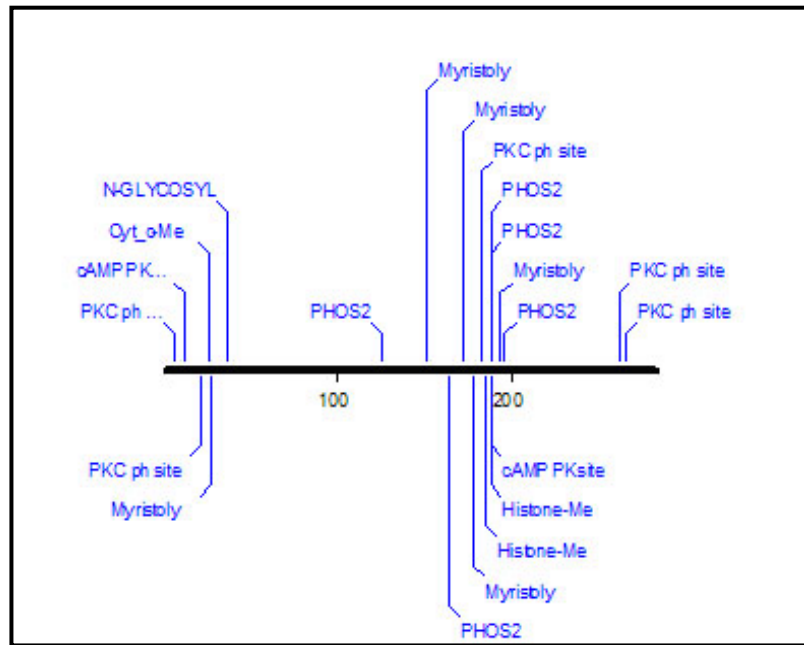


Figura 27. Posibles sitios de fosforilación y modificación de la proteína predicha para AQZ en la secuencia de la misma. El análisis fue realizado en el programa MacVector 8.0.1 Accelrys.

Se uso este péptido para inmunizar ratas y ratones. De inicio se tomó una muestra de sangre de los animales antes de inocular el péptido y se obtuvo el suero inicial (suero preinmune). Después de inocular el péptido, se extrajo la sangre y se evaluó el suero posterior a la inoculación por dos meses y medio cada 15 días, registrando las diferencias entre el suero preinmune y el suero de animales inmunizados. Mediante la técnica de Western blot, evaluamos este suero (suero final) contra un homogenado de moscas silvestres (*yw*). Observamos que los anticuerpos que contienen este suero reconocen dos proteínas, una de tamaño mayor a los 50 kDa y la segunda proteína de peso mayor a los 60 kDa. Al parecer la cantidad de esta última proteína es más baja que la anterior, debido a la diferencia de intensidad de las bandas (Fig. 28). Para obtener el suero final purificado (SFP), realizamos una cromatografía de afinidad donde utilizamos columnas de sefarosa-proteína G. Una vez obtenido el SFP, lo evaluamos contra un homogenado de moscas silvestres al igual que el anterior ensayo de Western blot y observamos que los anticuerpos del SFP reconocen dos proteínas del mismo peso molecular que el ensayo anterior (Fig. 29).

Al evaluar la expresión de *aqz* en diferentes etapas del ciclo de vida de *D. melanogaster*, observamos que el tamaño del transcrito, al igual que el tamaño de la proteína, difiere a lo reportado en el FlyBase (Fig. 24, 28 y 29). Estos nuevos datos indican que *aqz* y *AQZ* son de mayor tamaño que lo reportado.

3.4 Anticuerpos Policlonales.

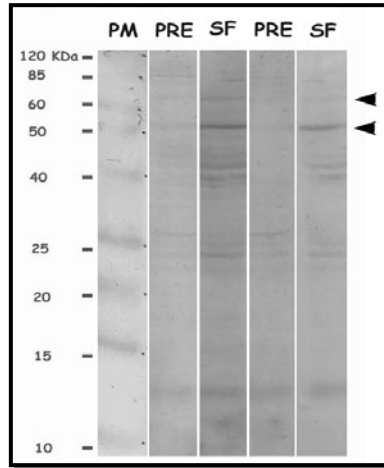


Figura 28. Western blot utilizando el suero final (sin purificar). La imagen nos muestra el resultado de la evaluación del suero de los dos últimos sangrados de ratas contra un homogenado de moscas silvestres. Se observa de manera clara que los anticuerpos contenidos en el suero final reconocen proteínas con pesos alrededor de 50 y 60 KDa (punta de flecha), en comparación con el suero preinmune. Peso molecular (PM), Suero preinmune (PRE), Suero final (SF).

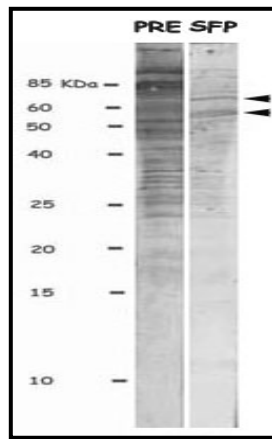


Figura 29. Western blot utilizando el suero final purificado (SFP). La imagen nos muestra el resultado de la evaluación del suero final purificado contra un homogenado de moscas silvestres, como control se utilizó el suero preinmune (PRE). Se observa que el suero reconoce a dos proteínas, una de tamaño entre los 60 y 70 KDa, y la otra entre 50 y 60 KDa (puntas de flecha).

Una vez evaluado el SFP, este se utilizó para realizar los análisis de inmunohistoquímica correspondientes. Para evaluar el patrón de expresión de la proteína AQZ durante el desarrollo embrionario se emplearon embriones silvestres (yw).

Al igual que el transcrito *aqz*, la proteína AQZ se expresa de manera dinámica durante todo el desarrollo embrionario. Al inicio de la embriogénesis, durante el blastodermo sincicial, AQZ presenta un patrón restringido a la región ventral del embrión con una baja expresión en la parte posterior, donde se forman las primeras células, las células germinales (Fig. 30A).

En la siguiente etapa, la extensión de la banda germinal, AQZ se encuentra en la banda germinal. Su expresión se acentúa en la parte anterior (región que dará origen a la cabeza) y posterior (células germinales). Al final de esta etapa al inicio de la segmentación, AQZ se observa en la misma banda germinal pero con mayor intensidad en el tejido ectodérmico más ventral (neuroectodermo). La expresión en la parte anterior se mantiene (Fig. 30B, C, D y Fig. 31).

Cuando la banda germinal comienza a retraerse, AQZ está uniformemente sobre todo el epitelio externo, y se observa con mayor intensidad en la región más cercana a la amnioserosa. En este último tejido extraembrionario no se observa la proteína. Al final de este proceso y a inicio del cerrado dorsal la proteína disminuye en todo el epitelio y hay mayor cantidad en las células de la región anterior lateral y posterior lateral (Fig. 30E, F y G).

Durante el cerrado dorsal AQZ se observa en todo el epitelio lateral, pero con mayor intensidad en la región anterior y en el epitelio más lateral. También se observa ausencia de la proteína en la amnioserosa y en las células intersegmentales (Fig. 30H, I, y J). Después del cerrado dorsal al inicio del 1er estadio larvario, AQZ se sigue detectando en la parte anterior y posterior. Además se observa en las constricciones del intestino medio (datos no mostrados).

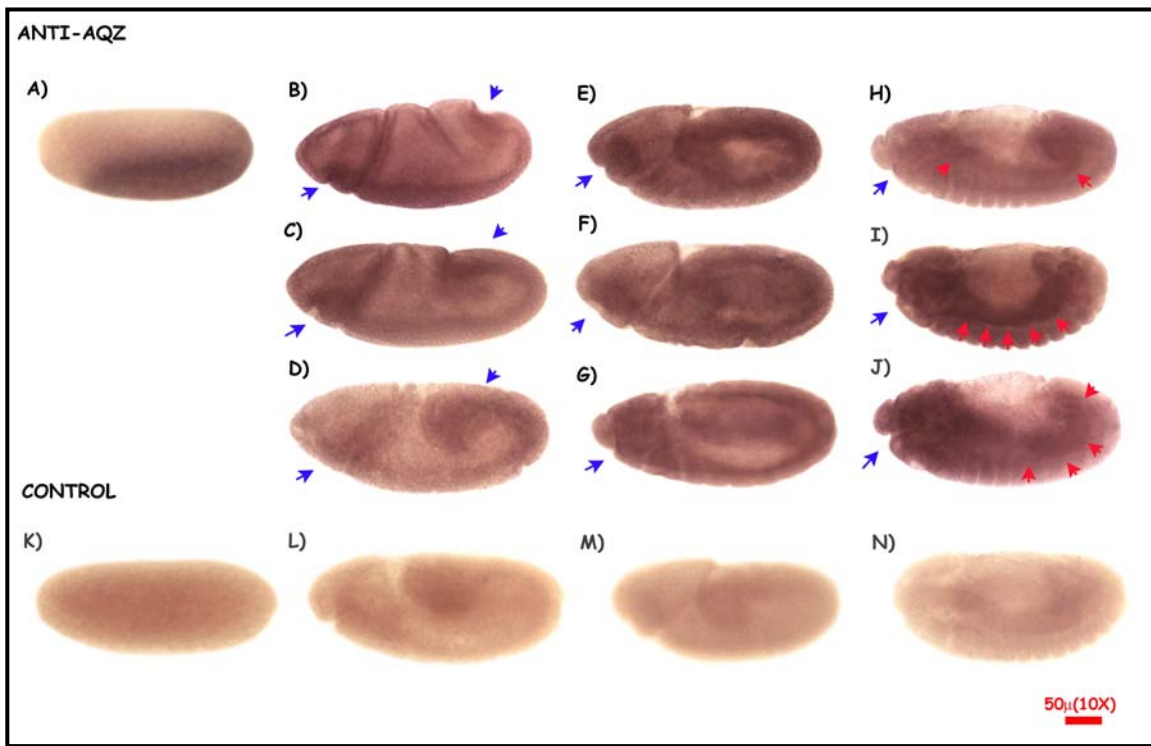


Figura 30. Análisis de la presencia de la proteína AQZ en embriones silvestres. En el blastodermo sincicial, AQZ se observa de manera clara en la región ventral y posterior (A). En la extensión de la banda germinal, se observa expresión en la banda germinal, región anterior y posterior (B, C y D, flecha azul). En el inicio de la segmentación y retracción de la banda germinal, AQZ se observa en la banda germinal en la región más interna (neuroectodermo) y parte anterior (E, F y G, flecha azul). En el cerrado dorsal e involución de la cabeza, AQZ está en el epitelio lateral y la zona anterior del embrión. Los embriones están orientados con vista lateral, la parte anterior hacia la izquierda y parte dorsal hacia arriba. Los embriones fueron incubados con SFP anti-AQZ como anticuerpo primario y se utilizó un anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina como anticuerpo secundario. K, L, M y N embriones control incubados sólo con el anticuerpo secundario.

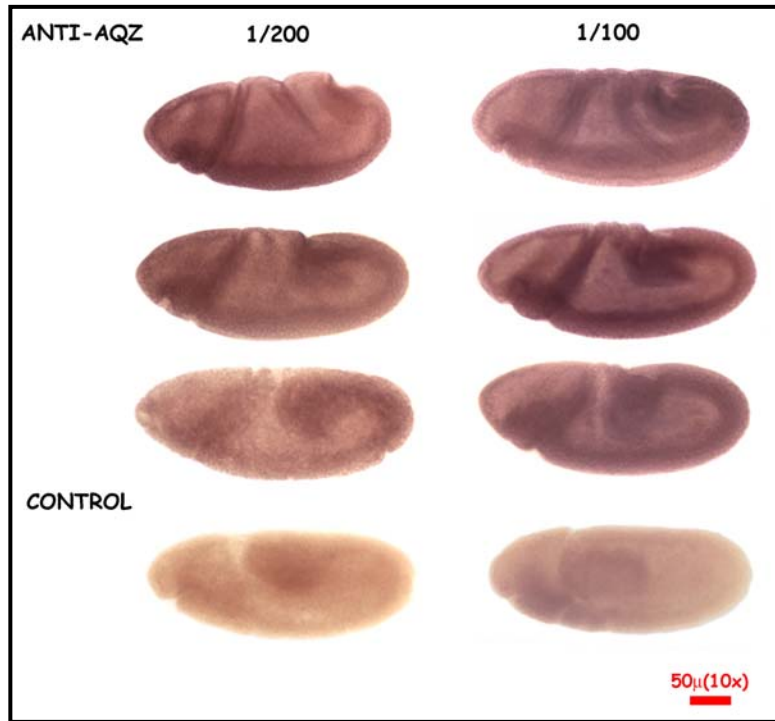


Figura 31. Análisis de la presencia de AQZ en embriones silvestres a diferente concentración del anticuerpo. Comparación de la detección de AQZ a diferente concentración del anticuerpo anti-AQZ durante la extensión de la banda germinal.

Además de contar con los anticuerpos policlonales de rata, los cuales se utilizaron para todos los análisis de Western blot e inmunohistoquímica, también elaboramos anticuerpos policlonales en ratones. Estos últimos se evaluaron por Western blot y al igual que los anticuerpos de rata las proteínas que reconocen son de mayor peso que las proteínas reportadas (datos no mostrados).

DISCUSIÓN

Utilizando las ventajas genéticas que posee *D. melanogaster* como modelo experimental, se realizó un tamizado genético del cerrado dorsal mediante la inserción de elementos P y se obtuvieron dos mutaciones en el gen *aqz*, aqz^{P1492} y aqz^{P14691} . Con el propósito de ampliar la serie alélica de este gen, se realizaron escisiones del elemento P en ambos alelos mutantes y se obtuvieron escisiones precisas (alelos revertientes) y escisiones imprecisas (alelos mutantes). La producción de una mayor cantidad de alelos mutantes de *aqz* nos permite, una vez caracterizados genética y molecularmente, ampliar el rango de información acerca de la funcionalidad del gen e identificar regiones de la proteína que son esenciales para su función.

1. CARACTERIZACION DE LOS NUEVOS ALELOS DE *aqz*.

1.1 Nuevos alelos mutantes de *aqz*.

La preparación de cutículas (exoesqueleto externo del embrión) nos permite apreciar los fenotipos mutantes de los nuevos alelos de *aqz*. Los principales defectos observados en los nuevos alelos mutantes de *aqz* son: la presencia de un hoyo a nivel dorsal y en menor grado en la región cefálica, defectos en la segmentación del embrión y defectos adicionales de hoyos en la región ventral.

Los alelos derivados de aqz^{P1492} solamente presentan defectos en la involución de la cabeza y fusión de segmentos. En estos alelos no se observan defectos claros de apertura dorsal pues al parecer son alelos hipomorfos. Además, posiblemente la contribución materna de este gen es suficiente para que el cerrado dorsal se lleve a cabo y se cierre completamente el dorso del embrión, pero no evita la formación del defecto en la involución de la cabeza. Se requeriría hacer clones de línea germinal, como en los datos reportados en la literatura (Perrimon y col., 1996), para observar si efectivamente estos nuevos alelos afectan otros procesos, como la segmentación, la formación del sistema nervioso y el cerrado dorsal. Los clones de línea germinal

producen embriones sin contribución materna, lo que posibilita la evaluación de los efectos de la mutación en procesos tempranos del desarrollo, enmascarados normalmente por la presencia de mRNA o proteína de origen materno (Johnston, 2002). Otra explicación para la condición hipomorfa de estos alelos sería que el elemento P está insertado en la secuencia que corresponde a un intrón en el gen *aqz*, y sin que se afectara completamente la expresión de éste, y se podrían generar proteínas, parcialmente funcionales. Sería necesario hacer Northern blot ó PCR cuantitativo para poder establecer si hay alteraciones en la abundancia del transcrito. Como el proceso de segmentación es anterior al cerrado dorsal e involución de la cabeza, pensamos que *aqz* tiene una función más temprana. La interrupción funcional de este gen durante la segmentación provoca los defectos observados de fusión o deleción de los segmentos abdominales.

Encontramos 24 nuevos alelos derivados de *aqz*^{P14691}. Cada alelo presenta diferente grado de severidad en la apertura dorsal y la involución de la cabeza (variabilidad fenotípica). Además, también presentan problemas durante la segmentación observándose defectos de fusión o deleción de los segmentos abdominales y defectos adicionales de apertura ventral con diferente grado de severidad. Algunos embriones presentan fenotipos con un único defecto (por ej., apertura anterior o fusión de segmentos, Figura 8 y Tabla 2) y otros presentan la combinación de todos los defectos (defectos múltiples, Figura 32). La mayor variabilidad en los fenotipos de estos alelos mutantes en comparación a los de la línea *aqz*^{P1492} puede deberse a que se generaron un mayor número de líneas mutantes, y se obtuvieron alelos más fuertes. A esto puede sumarse que las alteraciones en la zona reguladora puedan tener efectos drásticos.

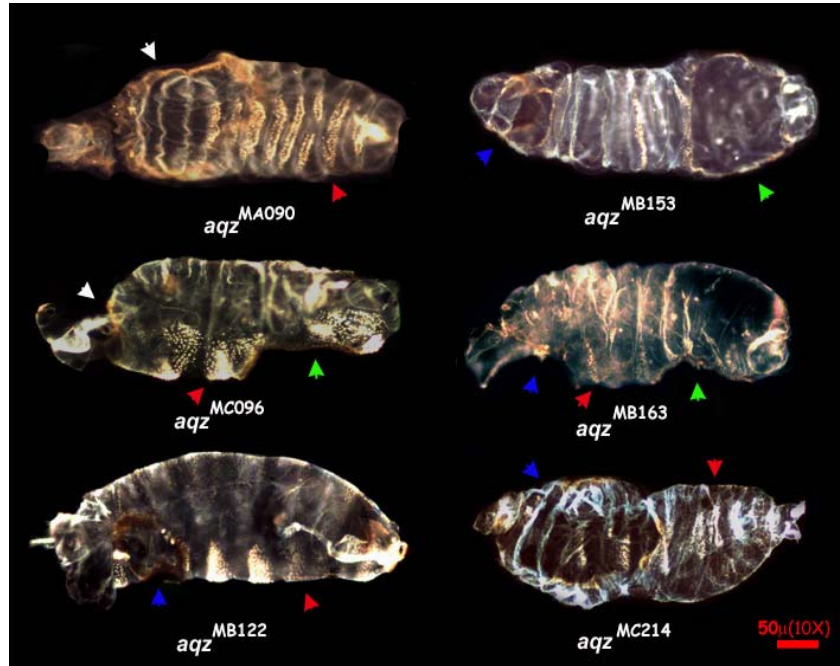


Figura 32. Alelos mutantes de *aqz* con múltiples defectos. Algunos alelos presentaron varios defectos en el epitelio. La imagen nos muestra los defectos más característicos, los cuales son: aperturas anteriores; tanto dorsales (flechas blancas) como ventrales (flechas azules), aperturas posteriores ventrales (flechas verdes) y fusión o deleción de segmentos (flechas rojas).

1.2 Caracterización de la lesión molecular.

La movilización imprecisa de un elemento P crea pequeñas deleciones alrededor del sitio de inserción en la secuencia genómica original. El uso de este método nos permite crear deleciones en genes cercanos al sitio de inserción del elemento P (Venken y Bellen, 2005). El rango en tamaño de las lesiones moleculares causadas por estas escisiones imprecisas va desde unas pocas pares de bases (dos o más) hasta segmentos completos de 1Kpb (Greenspan, 2004).

En el análisis por Southern blot, se observaron diferencias en el patrón de restricción para el DNA silvestre en comparación con el DNA mutante de algunos alelos. En

algunos casos se observaron variaciones en las intensidades de las bandas, y en otros casos bandas de diferentes tamaños (aqz^{MA090} y aqz^{MC129}). Esto podría deberse a que la secuencia del gen en la copia mutante está alterada por la escisión imprecisa y por tanto no hibrida igual (o no hibrida) con la sonda. Al parecer alelos mutantes como aqz^{M001} , aqz^{M004} y aqz^{M021} (Fig. 17), y también los alelos aqz^{MA090} , aqz^{MC097} y aqz^{MC129} (Fig. 15 y 16) parecen tener una lesión más clara. Puesto que el patrón de restricción del DNA de estas líneas es diferente con respecto al patrón de restricción de la línea silvestre. Los alelos en que no se observan diferencias significativas podría deberse a que el daño molecular fue de sólo algunos pares de bases, o bien que sean deleciones grandes que ya no contengan las secuencias usadas para hibridación.

Los alelos aqz^{M021} , aqz^{MB041} , aqz^{MA090} y aqz^{MC097} fueron elegidos en conjunto porque además de presentar un porcentaje alto de fenotipos mutantes (Fig. 13), la magnitud de la lesión (pares de bases o segmentos completos) al parecer es grande, en comparación con los demás alelos mutantes, de acuerdo al análisis por Southern blot. Para evaluar de manera más precisa lesión molecular en derivados de la inserción del elemento P en un intrón de aqz (aqz^{M0021}) se hizo una comparación de las secuencias mutantes y silvestre amplificadas por PCR, con los primers que flanqueaban la inserción. El DNA de aqz^{M021} no presentó ninguna alteración. Lo mismo ocurre para los alelos aqz^{MB041} , aqz^{MA090} y aqz^{MC097} , que derivan de la inserción en la zona reguladora. Estos últimos presentan un polimorfismo A-G. Este resultado podría deberse al fondo genético del cual provienen. Al no observar ninguna alteración en las secuencias correspondientes a las inserciones pensamos que las lesiones moleculares en cada alelo, no se generaron en ese sitio debido a la escisión imprecisa, sino que el daño podría estar más alejado de la inserción debido a los procesos moleculares que se generan al llevarse a cabo las escisiones. También es posible que en algunos haya mas amplificado a partir de un embrión control, y por tanto, amplificamos la secuencia silvestre por error. El siguiente paso que tenemos que hacer es diseñar otro par de primers que abarquen una secuencia más amplia hacia ambos lados de la inserción y repetir los experimentos.

1.3 Cruzas de complementación.

Las cruzas de complementación sirven para demostrar que los nuevos alelos obtenidos de cada una de las líneas mutantes originales, presentan la alteración del mismo gen que las líneas originales. La presencia de fenotipos más severos en el caso de las cruzas interalélicas con los alelos de aqz^{P1492} , podría deberse a que la lesión para cada alelo es diferente y al momento de complementarse estos fracasan de manera más dramática. En el caso de las cruzas de aqz^{M001} y aqz^{M004} con aqz^{M021} , que presentan complementación, puede indicar que se trata de alelos hipomórficos y de complementación intragénica, o bien que afectan a dos genes distintos. Tal vez la lesión generada no fue drástica y por lo tanto permitió un rescate del fenotipo por transvección. Para las cruzas de complementación entre alelos derivados de la línea aqz^{P14691} , solo se observaron fenotipos de no complementación similares a los observados en embriones homocigotos mutantes.

1.4 Cruzas de complementación entre los dos grupos de alelos.

En la descendencia de las cruzas interalélicas generados a partir de líneas derivadas de aqz^{P1492} y aqz^{P14691} (Fig. 14) los embriones mutantes presentaron un bajo porcentaje de defectos en la involución de la cabeza, apertura dorsal y apertura ventral, y un alto porcentaje en fusión de segmentos. Al parecer la condición hipomorfa de los alelos mutantes de aqz^{P1492} podría rescatar lesiones severas que presentan los alelos mutantes de aqz^{P14691} . Dada la localización de los elementos P originales, los defectos de ambos grupos de alelos mutantes pueden ser de diferentes tipos: unos en la zona regulatoria (derivados de aqz^{P14691}) y otros en el intrón (derivados de aqz^{P1492}). Sin embargo, no hubo complementación en ningún caso (incluido aqz^{M021}), lo que apoya la idea que la complementación observada con aqz^{M021} es probablemente complementación intragénica. Según la base de datos, los genes cercanos a aqz tienen funciones muy distintas. Para asegurarnos que todos los defectos observados se deben a aqz , el siguiente paso será realizar un rescate con el gen aqz en los mutantes. Finalmente, y en conclusión, todos los alelos probados a excepción de las cruzas

($aqz^{M001} \times aqz^{M021}$ y $aqz^{M004} \times aqz^{M021}$) mencionadas arriba no complementan, lo que quiere decir que todos son alelos del mismo gen. Estas dos cruza parecen ser evidencia de complementación intralélica, dado que no complementan (aqz^{M001} , aqz^{M004} y aqz^{M021}) con otros alelos mutantes del *locus*.

2. EXPRESIÓN DE *aqz* EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO.

El gen *aqz* se activa de manera temprana y dinámica durante el desarrollo embrionario. Observamos la presencia tanto del mRNA como de la proteína durante el blastodermo sincicial, etapa donde ocurren una serie de divisiones nucleares y en donde aún no se ha celularizado el embrión. En las etapas iniciales el desarrollo es guiado por mRNA y proteínas que son sintetizadas y depositadas en el huevo por la madre. Esta contribución es conocida como contribución materna; estos genes son expresados los ovarios durante la oogénesis. En contraste, la expresión cigótica no se ha iniciado aún en esta etapa inicial. Hay que generar embriones derivados de las clonas mutantes en la línea germinal (eliminar la contribución materna) con el propósito de desenmascarar las posibles funciones de *aqz* durante etapas tempranas.

Una vez celularizado el embrión (blastodermo celular) se inicia la formación de la banda germinal (ectodermo y mesodermo) en la parte ventral del embrión y su posterior extensión sobre la parte dorsal. En este proceso la expresión del gen *aqz* se observa en la parte ventral del embrión, específicamente en la banda germinal. Al final de la extensión de la banda germinal e inicios de la segmentación y la retracción de la banda germinal, se observa una clara expresión en el tejido más ventral ectodérmico.

En la segmentación del embrión, la expresión de los genes cigóticos de la regla de los pares (por ej., *even-skipped*, *runt* y *fushi tarazu*) origina el patrón metamérico característico. Este patrón de expresión segmentado de los genes de la regla de los pares está presente antes de la celularización, cuando el embrión sigue siendo un sincicio (Wolpert, 1998). La expresión de estos genes, al igual que los genes de polaridad de segmentos (*wingless* y *engrailed*), está regulada en parte por la vía

JAK/STAT, ya que los embriones mutantes para componentes de esta vía presentan alteraciones en la expresión de ambos (genes de la regla de los pares y genes de polaridad de segmentos). La vía de transducción de señales JAK/STAT controla varios procesos durante el desarrollo de *D. melanogaster*. Una de las funciones mejor caracterizadas de esta vía es su papel durante la segmentación del embrión. Los mutantes para los componentes de esta vía presentan fenotipos de fusión y delección de segmentos abdominales (Luo y Dearolf, 2001). Estos defectos son muy similares a los fenotipos mutantes de *aqz* (Fig. 8), por lo que *aqz* podría interactuar con la vía JAK/STAT o con genes de la regla de los pares o polaridad.

En la neurogénesis, a partir del primordio ectodérmico se forma el sistema nervioso del embrión y posteriormente de la larva. Algunas de estas estructuras se mantienen en la etapa adulta. La expresión de *aqz* en esta región concuerda con los resultados de las alteraciones observadas en el sistema nervioso de embriones con RNAi de *aqz* (Ivanov y col., 2004). Esto significa una segunda función para *aqz*.

A la par de estos procesos de segmentación y neurogénesis, se lleva a cabo la retracción de la banda germinal. La expresión de *aqz* es muy clara en todo el epitelio, que deriva del tejido ectodérmico. Después de la retracción de la banda germinal, la superficie dorsal del embrión está formada por la amnioserosa. Este tejido extraembrionario no presenta expresión, en comparación con el epitelio. La expresión de *aqz* y la presencia de la proteína AQZ, son más marcadas en la región del epitelio más cercano a la amnioserosa. Esta capa epidermal empieza a extenderse sobre la amnioserosa hacia la línea media dorsal, dando paso al cerrado dorsal. El proceso de cerrado dorsal consiste en el movimiento o migración de las células laterales del epitelio de ambos lados del embrión hasta encontrarse en la línea media del embrión, cubriendo completamente la amnioserosa y sellando el embrión. La expresión de *aqz* es intensa en la parte anterior y un poco más tenue en el epitelio lateral desde el inicio del cerrado dorsal, hasta la culminación de la involución de la cabeza. La vía de la cinasa de Jun (JNK) regula el cerrado dorsal y secundariamente, la involución de la cabeza. Esta vía se activa en las células de la hilera guía, células que orquestan el movimiento epitelial

durante este proceso y consecuentemente en las células más laterales para completar el proceso. Las mutaciones en los componentes de esta vía presentan fenotipos letales de apertura dorsal (Harden, 2002). Estos fenotipos mutantes presentan cierta similitud con los fenotipos mutantes de *aqz* aunque hay una diferencia en el porcentaje y severidad de apertura dorsal (más reducido en los mutantes de *aqz*), pero no en el defecto de involución de la cabeza (Fig. 8). Por tanto, *aqz* parece tener una función más, además de las descritas arriba, durante y después del cerrado dorsal, en el proceso consecuente de involución de la cabeza.

De acuerdo con los resultados obtenidos, pensamos que *aqz* interviene en varios procesos durante la etapa embrionaria. Los fenotipos mutantes tempranos durante la segmentación y formación del sistema nervioso junto con la expresión, nos hacen pensar que *aqz* se requiere en estas funciones tempranas. Posteriormente, cuando su expresión se ubica en el epitelio durante el cerrado dorsal e involución de la cabeza, además de los fenotipos de apertura dorsal e involución de la cabeza, *aqz* se requiere para estos procesos. Para corroborar esto tendremos que realizar experimentos de rescate e interacciones genéticas con genes que regulan esos procesos, como los componentes de las vías JAK/STAT y JNK, así como los componentes del citoesqueleto que también intervienen en estos procesos. En el caso del sistema nervioso, las interacciones se llevarán a cabo con genes de axogénesis (por ej., *roundabout*, *Fasciclin 2*, *commissureless*) y factores nucleares del desarrollo temprano (por ej., *Single-minded*, *sim*). El gen *sim* codifica para una proteína que contiene varios dominios funcionales, entre ellos un dominio rico en prolina. Experimentos genéticos sugieren que SIM funciona como un activador transcripcional a través de una interacción directa con elementos promotores de los genes que intervienen en la formación del sistema nervioso (Grumblin, 2006). La proteína AQZ, al igual que SIM, presenta un dominio rico en prolina. Este dominio es característico de proteínas cuya función es nuclear e intervienen en interacciones proteína- proteína. Esto parece sugerir que AQZ tiene una función nuclear. Para probar esto es importante llevar a cabo experimentos de inmunohistoquímica acoplada a fluoróforos y hacer tinciones con marcadores nucleares (como DAPI que tiñe DNA) y observar si colocaliza SIM con AQZ.

Para detallar la información obtenida en este trabajo de la nueva serie alélica y ayudar a caracterizar las posibles funciones de *aqz*, hay que evaluar si existen cambios en el nivel y patrón de expresión del mRNA y caracterizar la presencia de la proteína en alelos homocigotos mutantes, además de analizar por inmunohistoquímica si los mutantes tienen alteraciones en la formación del sistema nervioso.

3. EXPRESION DEL GEN *aqz* EN MOSCAS ADULTAS.

Además de analizar la expresión de *aqz* durante la etapa inicial del ciclo de vida *D. melanogaster*, evaluamos su expresión en la etapa adulta para determinar si este gen tiene una función en etapas posteriores a la embriogénesis. Los resultados muestran que se expresa *aqz* en adultos, dado que se observa la presencia de dos transcritos de diferente peso molecular (8.3 y 6.4 Kb) y dos proteínas, también de diferente peso molecular (aproximadamente 65 y 55 KDa). Estos resultados difieren de la información establecida en la base de datos, en cuanto al tamaño de los transcritos y proteínas que se generan a partir de la secuencia del gen *aqz*. La secuencia del cDNA de *aqz* que hemos utilizado en este trabajo no incluye la secuencia completa del gen. El análisis de la región del cromosoma 3R de *D. melanogaster*, centrado alrededor de la secuencia de *aqz*, muestra que en esta región se encuentra un gran número de cDNAs. Al alinearlos obtenemos una secuencia de mayor tamaño de cDNA que nos podría dar transcritos más grandes, y marcos abiertos de lectura diferentes y que podrían calificar para proteínas de mayor peso molecular (Fig. 33). Para corroborar esto, podríamos obtener los transcritos expresados a partir de la secuencia de gen *aqz* por medio de RT-PCR y secuenciación.

Evidencia de esto son cDNA “híbridos” -parte de la secuencia coincidente con el cDNA “oficial” de *aqz* en la base de datos, y parte no- Como el cDNA CK01765 (*aqz* 3') que incluye parte de la secuencia genómica de *aqz* (*aqz* 5') y secuencia más 3' de *aqz* que la reportada. Los resultados de la hibridación *in situ*, utilizando una sonda a partir del cDNA *aqz* 3' muestran un patrón de expresión similar al de *aqz* 5' (Fig.34).

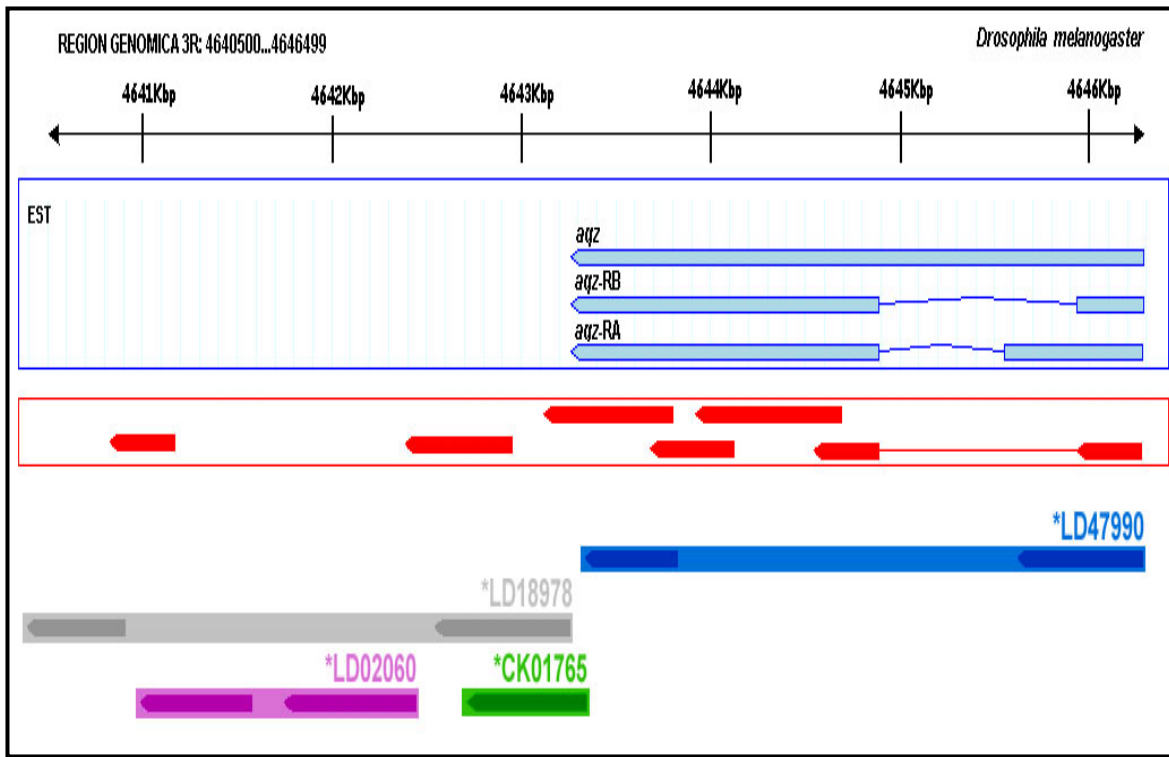


Figura 33. Región genómica del cromosoma 3R de *D. melanogaster* que incluye la secuencia predicha de *aqz*, y los cDNAs registrados en la base de datos que abarcan la región completa. *aqz* (*aaquetzalli*), *aqz-RA* (*aqz* transcrito A), *aqz-RB* (*aqz* transcrito B). LD47990 (*aqz* 5'), cDNA utilizado durante este trabajo. CK01765 (*aqz* 5'), cDNA que incluye parte de *aqz* 5' y la parte más 3' de *aqz*. LD18978 y LD02060 son cDNAs que abarcan la secuencia mas 3' de *aqz*. En rojo se observan todos los cDNAs que no se han secuenciado completamente (Grumbling, 2006).

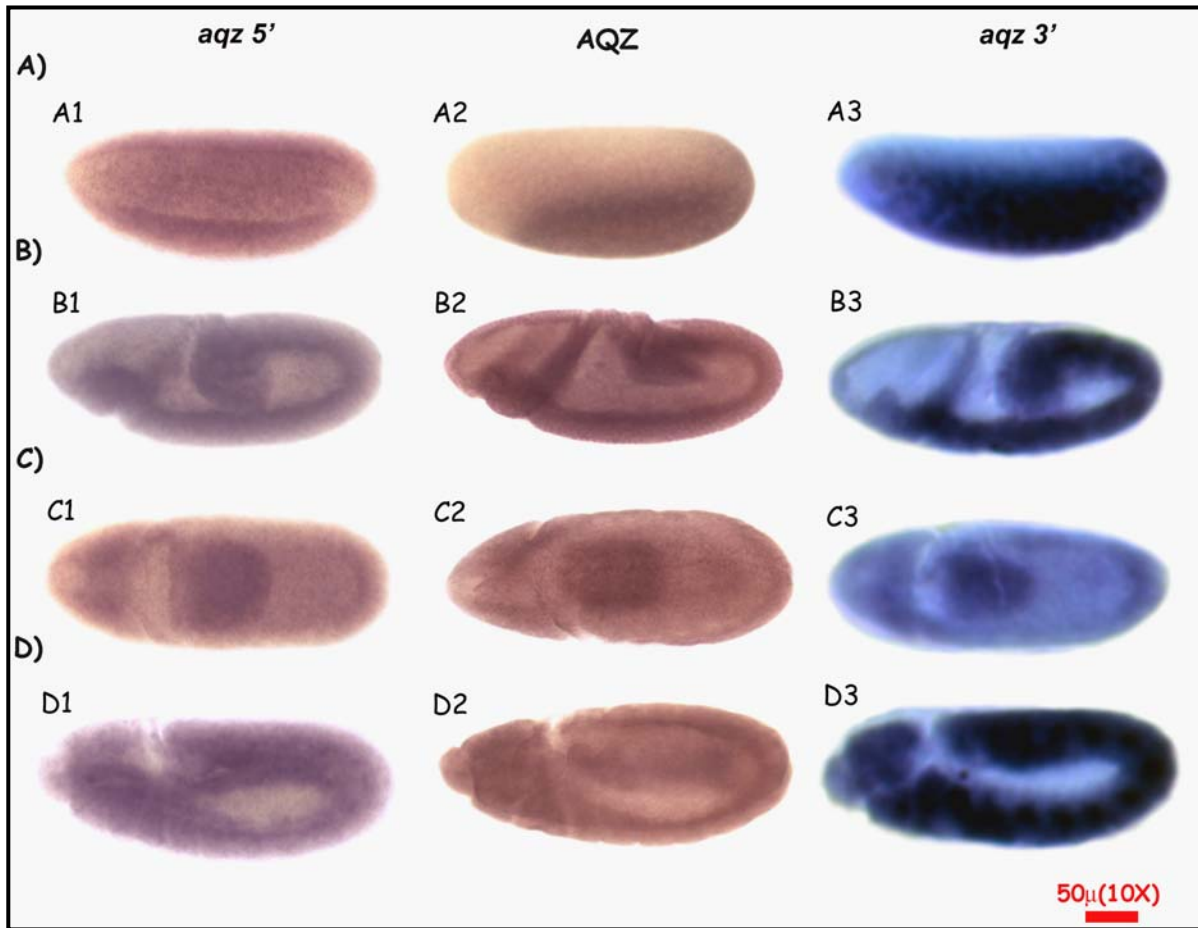


Figura 34. Expresión del transcrito *aqz* y la proteína AQZ en embriones. A) Blastodermo sinsicial . B) Extensión de la banda germinal. C) Extensión de la banda germinal, vista dorsal. D) Inicios de la retracción de la banda germinal. La expresión es dinámica y tanto el mRNA de *aqz* 5' y *aqz* 3', como la proteína son coincidentes. A1, B1, C1, D1 hibridación *in situ* utilizando el cDNA LD47990 (*aqz* 5'). A2, B2, C2, D2 inmunohistoquímica utilizando anticuerpos anti-AQZ. A3, B3, C3 y D3 hibridación *in situ* utilizando el cDNA CK01765 (*aqz* 3').

CONCLUSIÓN.

Los trabajos sobre el desarrollo de *D. melanogaster* son muy abundantes. El interés en el desarrollo embrionario del tipo silvestre se enriqueció con el aislamiento y estudio de mutantes. Hoy en día la embriogénesis de *Drosophila* es uno de los eventos del desarrollo mejor entendidos.

Las herramientas genéticas y moleculares que se emplean en *Drosophila* hacen a este organismo un modelo experimental muy importante. El empleo de dichas herramientas en este trabajo, nos permitió aislar y caracterizar nuevos alelos mutantes del gen *aqz*. La variabilidad fenotípica es evidente para cada alelo, dentro del mismo y también entre los diferentes grupos de alelos derivados de las inserciones en *aqz*. Demostramos que estos alelos son alelos mutantes del mismo gen. La mayoría de los homocigotos son letales embrionarios ya que no se observa ningún adulto homocigoto sobreviviente, aunque un porcentaje mutante logra culminar la etapa embrionaria y muere como larva de primer estadio.

La lesión molecular debido a la escisión del elemento P en la secuencia nucleotídica de los nuevos alelos mutantes de *aqz* examinados debe de encontrarse alejada del sitio de inserción. No encontramos diferencias de las secuencias mutantes aledañas a la inserción en comparación con la secuencia genómica. Esto, aunque no muy común, está documentado.

El gen *aqz* tiene un papel importante durante la embriogénesis de *Drosophila melanogaster*. El patrón de expresión tanto del transcrito como de la proteína coincide con tejidos y etapas del desarrollo en los que se observan fenotipos mutantes: el sistema nervioso, la segmentación, el cerrado dorsal y la involución de la cabeza. Todo lo anterior indica que *aqz* se requiere en múltiples ocasiones y para múltiples procesos durante el desarrollo embrionario, lo que subraya la importancia del mismo.

Varios de los fenotipos que encontramos son muy similares a los fenotipos de mutantes de JNK y JAK/STAT. Además, el patrón de expresión del transcrito del gen concuerda razonablemente con la activación de estas vías en estos procesos morfogenéticos, por lo que estas vías deberán volverse blanco de estudios de interacción con *aqz*.

BIBLIOGRAFÍA.

Altschul, S. Madden, T. Schaffer, A. Zhang, J. Zhang, Z. Miller, W. y Lipman, J. **1997**. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25:3389-3402.

Arbouzova I. y Zeidler P. **2006**. JAK/STAT signalling in *Drosophila*: insights into conserved regulatory and cellular functions. *Development*, 133: 2605-2616

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

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

Chen, H.W. Chen, X. Oh, SW. Marinissen, M.J. Gutkind, J.S. y Hou SX. **2001**. *mom* identifies a receptor for *Drosophila* JAK/STAT signal transduction pathway and encodes a protein distantly related to the mammalian cytokine receptor family. *Genes and Development*, 16:388-398.

Craig, N.L. Craigie, R. Gellert, M. y Lambowitz, A.M. **2002**. Mobile DNA. ASM Press, Washington, DC: pp. 485-512.

Greenspan, J. **2004**. Fly Pushing: the theory and practice of *Drosophila* genetics. 2a. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York: pp. 25-74.

Griffiths, J.F. Miller, J.H. Suzuki, D.T. Lewontin, R.C. y Gelbart, W.M. **2000**. An Introduction to Genetic Analysis. 7^a. ed., W.H. Freeman and Company, New York: pp. 601-620.

Grumbling, G. Strelets, V. y The FlyBase Consortium. **2006.** FlyBase: anatomical data, images and queries. *Nucleic Acids Research* **34**: D484-D488; doi:10.1093/nar/gkj068. <http://flybase.org/>

Harden, H. **2002.** Signaling pathways directing the movement and fusion of epithelial sheets: lessons from dorsal closure in *Drosophila*. *Blackwell Publishing*, 70(4-5):181-203

Ivanov, I. Rovescalli, C. Pozzi, P. Yoo, S. Mozer, B. Li, H. Yu, S. Higashida, H. Guo, V. Spencer, M. y Nirenberg, M. **2004.** Genes required for *Drosophila* nervous system development identified by RNA interference. *PNAS*, 101(46)16216-16221.

Johnston, D. **2002.** The art and desing of genetic screens: *Drosophila melanogaster*. *Macmillan Magazines Ltd*, 3: 176-188. Review.

Lou, H. y Dearolf, C. **2001.** The JAK/STAT pathway and *Drosophila* development. *BioEssays*, 23. 1138-1147. Review.

Mendoza-Ortiz, M. Generación y caracterización de alelos Mutantes de la línea P1492 en *Drosophila melanogaster*. Tesis de Licenciatura. Director: Juan Rafael Riesgo Escovar. Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química, **2004.**

Perrimon, N. Lanjuin, A. Arnold, C. y Noll, E. **1996.** Zygotic letal mutation with maternal effect phenotypes in *Drosophila melanogaster*. II. *Loci* on the second and third chromosome identified by P- element-induced mutations. *Genetics*, 144. 1681-1692 .

Sambrook, J. Fitsch, E. y Maniatis, T. **1989.** Molecular Cloning. 2da ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. Vol 2-3: 9.52-9.55, A1, A2, A6, B11 y B14.

Shawn, S. y Li, C. **2005.** Specificity and versatility of SH3 and other proline-recognition domains: structural basis and implications for cellular signal transduction. *Biochemical Journal*, 390:641-653

Spradling, A.C. 1995. Gene disruptions using P transposable elements: An integral component of the *Drosophila* genome project. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92:10824-10830.

Timakov, B., Liu, X., Turgut, I. y Zhang P. 2002. Timing and targeting of P-element local transposition in the male germline cells of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 160:1011-1022.

Venken, J. y Bellen, J. 2005. Emerging technologies for gene manipulation in *Drosophila melanogaster*. *Nature Reviews Genetics*, 6: 167-178. Review.

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

Wolpert, L. 1998. Principles of development. Current Biology Ltd. London-New York: pp. 127-135.

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