



Universidad Nacional Autónoma de México.  
Instituto de Neurobiología.

Caracterización de los fenotipos del gen *sar1p* en *Drosophila melanogaster*.

Tesis que para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias (Neurobiología)  
presenta

Lic. Sergio Benjamín Velarde Rangel.

Director de tesis.  
Dr. Juan Rafael Riesgo Escovar.

Campus Juriquilla, Querétaro. Julio 2010



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.

## Resumen.

Un acontecimiento de crucial importancia para las células eucariotas es el transporte celular que se encarga de movilizar proteínas y lípidos a diversas partes dentro o fuera de las células. Este mecanismo celular inicia después de que son sintetizadas dichas moléculas en el retículo endoplásmico y son enviadas al aparato de Golgi por un complejo de proteínas transportadoras denominadas COP II (Sec23, Sec24, Sec31, Sec13 y Sar1). Trabajos realizados en levaduras implican que la ausencia de dicho complejo ocasiona letalidad celular ya que el transporte se detiene. Estudios de Sec13 en nuestro laboratorio ponen en duda el papel obligatorio y fundamental del Complejo COP II en el transporte celular en la mosca. Con el fin de revisar este paradigma nuestro proyecto se enfoca en el estudio de Sar1. Utilizamos como modelo genético a la mosca *Drosophila melanogaster* para analizar mutantes de dicha proteína. Por medio de la generación de clonas por recombinación mitótica inferimos que las células mutantes de Sar1 que formarán parte del ojo de la mosca son aún capaces de realizar el transporte celular. Aunque existen alteraciones en el desarrollo del ojo y en el sistema nervioso periférico de la cabeza de moscas con clonas sus omatidios son capaces de responder a estímulos luminosos. Durante la embriogénesis los individuos mutantes de este gen terminan por morir. Si también alteramos la contribución materna de esta proteína durante la ovogénesis los ovocitos no se desarrollan. La participación de Sar1 en fenómenos del desarrollo como el crecimiento de quetas, la formación de omatidios y la embriogénesis es importante, sin embargo cada uno de estos procesos requiere de un nivel de transporte distinto. Este requerimiento parece estar en función del tiempo necesario para formar dichas estructuras. Concluimos que Sar1 no es indispensable para la formación del ojo de *D. melanogaster* y que éste es capaz de responder ante un estímulo luminoso.

## **Abstract.**

An event of crucial importance for eukaryotic cells is intracellular transport, responsible for mobilizing proteins and lipids to different parts within or outside the cells. This cellular mechanism starts after these molecules are synthesized in the endoplasmic reticulum and are sent to the Golgi complex by a complex of transporter proteins called COP II (Sec23, Sec24, Sec31, Sec13 y Sar1). Work in yeast implies that the absence of this complex causes cell lethality because transport stops. Sec13 studies in our laboratory question this fundamental mandatory role of the COP II complex in cellular transport in flies. To test this paradigm even further, our project focuses on the study of Sar1. We use *Drosophila melanogaster* as a genetic model to analyze the mutations in Sar1. Through the generation of clones by mitotic recombination, we infer that mutant cells Sar1 involve in the eye ommatidia are still capable of cellular transport. Although there are alterations in the development of the eye and in the peripheral nervous system of the head with clones their ommatidia are capable of responding to light stimuli. During embryogenesis mutant individuals of Sar1 eventually die. When sar1 maternal contribution is altered during oogenesis, oocytes do not develop. Sar1 participation in developmental phenomena as bristle's growth, ommatidia formation and embryogenesis is important, but each of these processes requires a different level of transport. This requirement seems to be based on the time needed to form these structures. We conclude that Sar1 is not essential for the formation of the *D. melanogaster* eye and that this eye's able to respond to a light stimulus.

## **Agradecimientos.**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Becario. 232290.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM. Número de Cuenta. 508001666.

Al personal de la Unidad de Enseñanza, de manera muy especial a la M. en C. Leonor Casanova Rico, jefa de la Unidad de Enseñanza.

Al personal de la biblioteca del campus UNAM Juriquilla, encabezado en un principio por la Lic. María del Pilar Galarza Barrios y posteriormente por el Dr. Francisco Javier Valles Valenzuela.

Al Dr. Juan Riesgo, gran baquiano de caminos caóticos y casi inaccesibles. Agradezco todos los momentos que fungió como mi tutor. Tiempos que envuelven a todos sus consejos, a todos sus regaños, a todas las experiencias buenas y malas, a todas sus reflexiones, a las deliciosas comidas con vino tinto, quesos y música clásica, a todas las peleas y quejas por el fútbol (dentro y fuera de la cancha), a todas las horas de literatura latinoamericana, a esas cheves en Aguascalientes en aquellos días de mi examen de licenciatura, a su confianza, a su persistencia conmigo, a su tolerancia y sobre todo a su apoyo incondicional.

A la Dra. Martha Vázquez por su irrestricto sentido de la responsabilidad. Le agradezco íntegramente cada uno de sus valiosos consejos.

A mi familia que fue el motor de esta experiencia en la Maestría. Agradezco su apoyo incondicional (Don Ramón, Doña Ana, mis hermanos Chori y Paty).

A mis amigos. Vecinos de este mundo por un rato, geniales coincidencias que se gestaron entre afinidades sorprendidas, soledades exiguas, pastes microbuseros, máquinas 501 inagotables, las escaleras de Kafka, prolijas y hermosas constelaciones de lunares, tormentas perfectas, sonrisas infinitas, viajes fundadores de países, raquetas de frontón, llamadas somnolientas, locuras ferrocarrileras, vinos tintos con nieve de limón, oportunistísimas epidemias de influenza, terapias gratuitas, pláticas nocturnas de los viernes, infracciones mayas con JB, goyas glorificantes, sillones callejeros cargados cientos de metros, goyas acallados por lastimosos vecinos, atrevimientos oportunos, cumpleaños de ojos tuertos o salas sobrepobladas, marquesitas y decepciones, coqueteos extemporáneos, cuentos de cronopios, maestrías compartidas, casas compartidas, cuartos compartidos.

## **Dedicatoria.**

... ¿Cómo no someterse a Tlön, a la minuciosa y vasta evidencia de un planeta ordenado? Inútil responder que la realidad también está ordenada. Quizá lo esté, pero de acuerdo a leyes divinas -traduzco: a leyes inhumanas- que no acabamos nunca de percibir. Tlön será un laberinto, pero es un laberinto urdido por hombres, un laberinto destinado a que lo descifren los hombres.

**Tlön, Uqbar, Orbis Tertius.** Ficciones (1944). *J. L. Borges.*

En el reflejo de tus ojos se descifra que no todo lo pensable existe.

## ÍNDICE GENERAL.

	<b>Página</b>
Resumen	I
Abstract	II
Agradecimientos	III
Dedicatoria	IV
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>II. ANTECEDENTES</b>	<b>4</b>
<b>2.1</b> El aparato de Golgi y el RE	4
<b>2.2</b> Vía de secreción	6
<b>2.3</b> El transporte entre membranas celulares	7
<b>2.4</b> Proteínas de unión a GTP	7
<b>2.5</b> Reclutamiento de proteínas COP II	7
<b>2.6</b> <i>Drosophila melanogaster</i>	11
<b>2.7</b> Generación de mosaicos genéticos en <i>D. melanogaster</i>	13
<b>2.7.1</b> Sistema <i>FRT/FLP</i>	13
<b>2.8</b> Elementos genéticos móviles en <i>Drosophila</i> : elementos <i>P</i>	15
<b>2.9</b> Contribución materna	16
<b>2.10</b> Alelos del gen <i>sec13</i> en <i>D. melanogaster</i>	17
<b>2.11</b> Alelos del gen <i>sar1</i> en <i>D. melanogaster</i>	18

2.12 Ojo compuesto de <i>D. melanogaster</i> y la Rodopsina	19
III. JUSTIFICACIÓN	22
IV. HIPÓTESIS	23
V. OBJETIVO	24
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	25
6.1 Características de la mutante para Sar1 (alelo mutante <i>sar1</i> <sup>05712</sup> )	25
6.2 Preparación de cutículas	25
6.2.1 Obtención de embriones	26
6.2.2 Colección de embriones	26
6.2.3 Fijado y montaje	26
6.3 Recombinación de <i>FRT82-sar1</i> en un mismo cromosoma	27
6.4 Generación de clones homocigotos mutantes de Sar1	27
6.5 Electrorretinogramas	29
6.6 Caracterización fenotípica del tejido ocular homocigoto <i>sar1</i> <sup>05712</sup> / <i>sar1</i> <sup>05712</sup>	32
6.7 Generación de clones homocigotos <i>sar1</i> <sup>05712</sup> / <i>sar1</i> <sup>05712</sup> en la línea germinal	32
6.8 Interacciones genéticas	33
VII. RESULTADOS	34
7.1 Caracterización de fenotipos en individuos mutantes para <i>sar1</i>	35
7.1.1 Fenotipo cigótico de <i>sar1</i> <sup>05712</sup>	33
7.1.2 Sar1 es necesario durante la ovogénesis	39
7.2 Generación de clones somáticos homocigotos <i>sar1</i> <sup>05712</sup> / <i>sar1</i> <sup>05712</sup> por medio de <i>ey-flp</i>	40



7.2.1 Clones homocigotos $sar1^{05712}/sar1^{05712}$ y $arm-lacZ$ $/arm-lacZ$ usando $ey-flp$	41
7.2.2 Generación de clones homocigotos $sar1^{05712}/sar1^{05712}$ y CD2/CD2 usando $hs-flp$ y $ey-flp$	43
7.3 Generación de clones homocigotos $sar1^{05712}/sar1^{05712}$ y rpS3/rpS3	45
7.4 Fenotipo “pelona” al generar clones $sar1^{05712}/sar1^{05712}$ en el tórax ( $hs-flp$ ) y el ojo ( $ey-flp$ )	53
7.5 Cortes de ojos homocigotos $sar1^{05712}/sar1^{05712}$	55
7.6 Electrorretinogramas	56
<b>VIII. DISCUSIÓN</b>	58
<b>IX. CONCLUSIÓN</b>	63
<b>X. REFERENCIAS</b>	64
<b>XI. LISTA DE FIGURAS</b>	68

## I. INTRODUCCIÓN.

Un acontecimiento de crucial importancia para todas las células eucariotas es el transporte intracelular que se encarga de movilizar proteínas y lípidos a diversas partes en el interior de las células o al exterior de las mismas. Este mecanismo celular comienza después de la síntesis de dichas moléculas en el retículo endoplásmico (RE) donde un grupo de proteínas denominadas COP II moviliza a las moléculas recién formadas hacia el aparato de Golgi. En este organelo las proteínas o lípidos pueden sufrir cambios en su estructura para finalmente ser dirigidos hacia su destino final que puede ser el exterior de la célula o algún otro organelo dentro de la misma. Los estudios clásicos sobre este fenómeno, realizados en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en los 80s, establecen que el complejo COP II (formado por Sec23, Sec24, Sec31, Sec13 y Sar1) es indispensable para formar vesículas que acarreen las proteínas o lípidos hacia el aparato de Golgi. También se determinó que si se interrumpe la formación de dichas vesículas las células mueren por apoptosis debido a la obstrucción del transporte de sustancias imprescindibles para la célula (Fromme *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2004; Alberts *et al.*, 2002; Pelham & Rothman, 2000; Scales *et al.*, 1997; Presley *et al.*, 1997; Kaiser & Schekman, 1990).

La versatilidad de herramientas genéticas que existen en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* nos pueden brindar una perspectiva distinta sobre este fenómeno de transporte. En nuestro laboratorio se estudiaron mutantes de una de las proteínas del complejo COP II (Sec13). Estos estudios ponen en duda el papel obligatorio y fundamental del complejo COP II en el transporte celular.

Con el fin de revisar este paradigma nuestro proyecto se enfoca en el análisis de Sar1, una proteína indispensable para la formación del complejo COP II. Utilizamos como modelo genético a *D. melanogaster* para analizar mutantes de dichas proteínas. Algunas de las ventajas que nos ofrece este modelo son que podemos obtener mutaciones en genes específicos, marcar genes que evidencien patrones de expresión (genes reporteros) o generar mosaicos genéticos, que son grupos de células que se desarrollan con dos copias iguales de un gen en particular (homocigoto) en un organismo heterocigoto (Lee *et al.*, 2004). Valiéndonos de esta última técnica encontramos que las células que formarán el ojo de la mosca y que carecen de algunas de las proteínas COP II

son capaces de realizar el transporte intracelular. Nuestros resultados indican que la deficiencia en la expresión de la proteína Sar1 no causa letalidad en este tipo de células, aunque sí provoca alteraciones en el desarrollo de la estructura del ojo y en el sistema nervioso periférico de la cabeza.

La generación de mosaicos genéticos nos ha permitido analizar dos condiciones diferentes. La primera nos ofrece una situación en donde la estructura del ojo está formada por dos tipos de células genéticamente distintas; el primer tipo celular posee dos copias del gen *sar1* y el otro presenta dos copias mutadas de este mismo gen. En general la anatomía del ojo bajo esta condición es anormal, dado que los omatidios (unidades estructurales del órgano de la visión) y las quetas en el ojo (estructuras mecanorreceptoras) tienen un arreglo atípico. Este fenotipo se debe a que las células sin alteración genética proliferan más que las homocigotas mutantes para *sar1*. Cuando esto ocurre las células alteradas no alcanzan un desarrollo óptimo, lo que provoca malformaciones en el ojo. Se sabe que cuando existen este tipo de interacciones entre células dañadas y normales se manifiesta un fenómeno de competencia en donde las células que crecen bajo condiciones óptimas envían señales apoptóticas a las mutantes contribuyendo a la eliminación de las células en desventaja genética (Johnston, 2009). La segunda condición nos permite analizar las mismas estructuras bajo una circunstancia diferente en donde todas las células que forman el ojo presentan una insuficiencia del gen *sar1*. Bajo esta circunstancia se caracterizaron tres fenotipos: a) Displasias en omatidios y malformación de quetas en la cabeza; b) “Pelonas”, individuos que presentan falta de crecimiento de quetas en la cabeza y c) “Jíbaros”, individuos que presentan deformación e involución de la porción cefálica.

Las moscas que no presentaban malformaciones cefálicas (pelonas) se utilizaron para un análisis de electroretinograma. Mediante esta técnica podemos reconocer la actividad de las células fotorreceptoras y las neuronas monopolares con las que hacen sinapsis. Encontramos que el registro para las moscas que son deficientes en la expresión de la proteína Sar1 es similar a las silvestres. Si los ojos deficientes de esta proteína son capaces de responder a la luz implicaría que la rodopsina sigue transportándose a la rabadómera de las células fotorreceptoras a pesar de la ausencia del complejo COP II. También se encontró que el arreglo de los omatidios mutantes para *sar1* es anormal pero sigue conservando la formación de algunas rabadómeras.

Mediante el análisis de cutículas se encontró que los embriones mutantes para cada una de las proteínas que forman el complejo COP II mueren en etapas finales de la embriogénesis. Cuando los embriones tienen mutados dos genes COP II el fenotipo no se hace más acusado. Esto nos permite concluir que cada una de las proteínas COP II es igual de importante en el transporte durante la embriogénesis de *D. melanogaster*. Se eliminó la contribución materna de este gen y se observó que los embriones mueren de manera más prematura que los individuos carentes de la expresión cigótica normal del gen *sar1*. En el futuro, el análisis a detalle de la dinámica del transporte de proteínas fluorescentes en embriones permitirá inferir si el acarreo mediado por estas proteínas es prescindible o no para la supervivencia de las células.

## II. ANTECEDENTES.

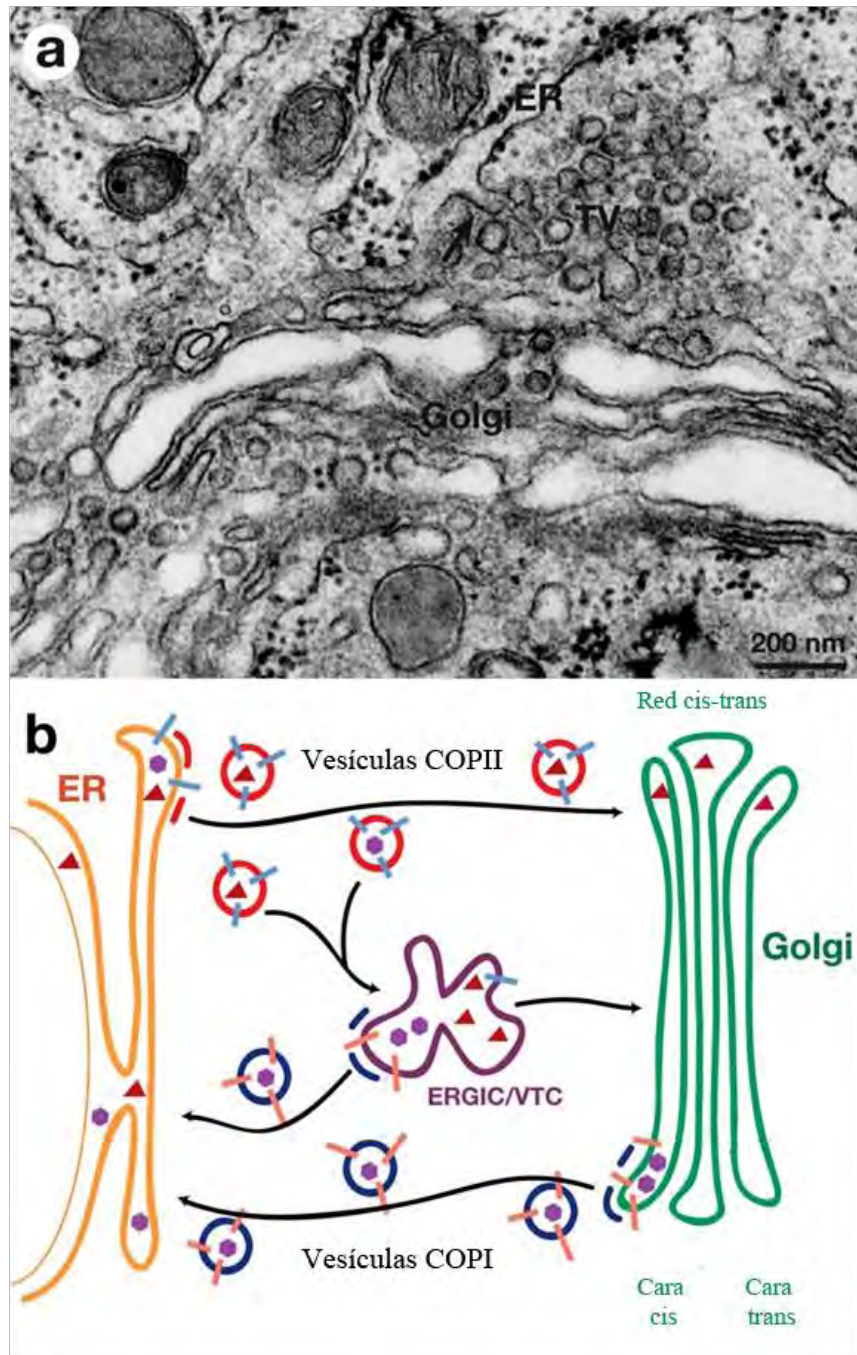
### 2.1 El aparato de Golgi y el RE.

El aparato de Golgi es el lugar donde se lleva a cabo la mayoría de la síntesis de carbohidratos, así como el sitio de clasificación y recepción de productos procedentes del RE. Gran parte de los glúcidos que fabrica el Golgi se unen como cadenas de oligosacáridos a las proteínas y lípidos que envía el RE. El aparato de Golgi está formado por una serie de cisternas limitadas por una membrana con forma aplanada. Cada uno de estos apilamientos del Golgi (dictiosomas) está formado por entre cuatro y seis cisternas. En células animales muchos dictiosomas permanecen unidos entre sí mediante conexiones tubulares entre las cisternas correspondientes, formando un solo complejo que se localiza habitualmente en las proximidades del núcleo. Durante su paso a través del aparato de Golgi, las moléculas transportadas sufren una serie ordenada de modificaciones covalentes. Los dictiosomas del Golgi tienen dos caras distintas: una cara *cis* (o de entrada) y una cara *trans* (o de salida). Ambas caras están estrechamente asociadas a unos compartimientos especiales formados por una red de estructuras tubulares y de cisternas: la red del *cis* Golgi (RCG) y la red del *trans* Golgi (RTG) respectivamente. Las proteínas y los lípidos entran a través de la RCG, procedentes del RE, y salen por la RTG en vesículas de transporte con un destino específico. Las proteínas que entran en la RCG pueden o bien seguir a través del Golgi o volver al RE (Figura 1). De manera similar, las proteínas que salen de la RTG pueden seguir hacia delante y ser enviadas a cualquier sitio al que sean destinadas, como a lisosomas, vesículas de secreción o la superficie celular, o bien ser devueltas a un compartimiento anterior (Lee *et al.*, 2004; Pelham & Rothman, 2000; Scales *et al.*, 1997).



**Figura 1. Modelo clásico de la vía de secreción entre el RE y el aparato de Golgi.** (a) Microfotografía electrónica de una célula secretora de insulina. Es visible el RE (ER) y los sitios donde se forma una vesícula de transporte (Flecha). Cada sitio del área de transición del RE produce numerosas vesículas transportadoras (TV) que van a dar a la zona *cis* del aparato de Golgi (Lee *et al.*, 2004). (b) Esquemática del transporte RE-Golgi. Las proteínas del complejo COP II median el transporte de vesículas del RE al aparato de Golgi. Las proteínas SNARE

(rectángulos color azul y rosa) ayudan a la fusión de las membranas. En ocasiones las vesículas se agrupan entre sí generando estructuras más grandes que se localizan entre el RE y el aparato de Golgi (ERGIC). Existen proteínas residentes del RE (hexágonos color violeta) que pueden salir en las vesículas de transporte COP II pero que retornan a través de la vía retrógrada mediada por el complejo COP I. Las proteínas que necesitan ser transportadas salen del RE a través de vesículas recubiertas por proteínas COP II (tomado de Alberts *et al.*, 2002).



## 2.2 Vía de secreción.

La vía de secreción es un sistema de transporte intracelular que se encarga de movilizar proteínas y lípidos a diversas partes en el interior de las células o al exterior de las mismas. Este mecanismo celular comienza con el transporte de proteínas y lípidos sintetizados en el RE hacia el aparato de Golgi gracias a un complejo de proteínas denominadas COP II. Este fenómeno de movilización de sustancias a través de membranas está conservado en los organismos eucariontes de manera que modelos genéticos como *D. melanogaster* sirven como referencia para su estudio.

Una vez que las proteínas y lípidos se sintetizaron en el lumen del RE se transportan y en su camino pasan a través de una serie de compartimientos, donde son sucesivamente modificados. La vía desde el RE hasta la membrana destino comprende numerosas etapas de clasificación que continuamente seleccionan proteínas luminales solubles que son empaquetadas y transportadas (Figura 1). Esta vía también contribuye en la renovación de membranas celulares (Lee *et al.*, 2004).

Para iniciar su ruta a lo largo de este sistema de transporte, las proteínas que han entrado en el RE y están destinadas al aparato de Golgi o más allá son empaquetadas en primer lugar en pequeñas vesículas de transporte revestidas de COP II (Figura 1). Estas vesículas de transporte se forman en regiones especializadas del RE, en donde la membrana carece de ribosomas unidos. En muchas células animales, los lugares de salida del RE parecen estar dispersos aleatoriamente a través de la red de este organelo. Originalmente, se pensó que todas las proteínas que no estaban retenidas en el RE entraban, por defecto, en las vesículas de transporte. Sin embargo ahora se sabe que el transporte por vesículas que sale del retículo es un proceso selectivo. Algunas moléculas a transportar son reclutadas activamente en estas vesículas, donde se concentran. Estas proteínas presentan en su superficie señales de salida y son reconocidas mediante proteínas receptoras complementarias que permanecen atrapadas en el interior de las vesículas de transporte mediante interacciones con componentes de la cubierta COP II (Alberts *et al.*, 2002).

### **2.3 El transporte entre membranas celulares.**

El tráfico a través de membranas se realiza de manera ordenada y específica gracias a proteínas de transporte que se encargan de reconocer de manera selectiva a las sustancias que serán transportadas. Estos grandes ensamblajes de proteínas interactúan con las membranas y dependen de una serie de proteínas de unión a GTP que controlan tanto los aspectos espaciales como temporales del intercambio de membranas. Existen tres complejos proteicos encargados del tráfico de sustancias a través del RE y el aparato de Golgi; la proteína clatrina que se encarga del transporte de la región *trans* del Golgi hacia el exterior, COP I que realiza el transporte retrógrado del aparato de Golgi en su lado *cis* al RE y COP II que realiza el transporte del RE a la región *cis* del Golgi (Alberts *et al.*, 2002 & Presley *et al.*, 1997).

### **2.4 Proteínas de unión a GTP.**

Las proteínas de unión a GTP (de tipo Rab) que inducen la unión de varios de los complejos proteicos antes mencionados actúan como interruptores moleculares que oscilan entre un estado inactivo unido a GDP y un estado activo unido a GTP. Existen dos clases de proteínas que regulan el paso de un estado a otro; los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEF), que activan las proteínas al catalizar el intercambio de GDP por GTP, y las proteínas activadoras de GTPasa (GAP) que ayudan a inactivar a las proteínas que enlazan GDP o GTP al provocar la hidrólisis de GTP. La proteína de unión a GTP responsable del reclutamiento y ensamblaje de las cubiertas COP II en la membrana del RE es Sar1 (Lee *et al.*, 2004; Lodish *et al.*, 2004; Alberts *et al.*, 2002; Presley *et al.*, 1997; Kaiser & Schekman, 1990).

### **2.5 Reclutamiento de proteínas COP II.**

El modelo clásico sobre el tráfico vesicular describe que una GTPasa, Sar1, está involucrada en el empaquetamiento y concentración de moléculas que necesitan ser transportadas (proteínas de membrana o de secreción y lípidos) dentro de las vesículas del complejo COP II



(Aridor *et al.*, 2001). Esta molécula es la encargada de reclutar a todo el complejo formado por otras cuatro subunidades. Todas estas proteínas se encuentran conservadas en plantas, animales y hongos y se nombran de la misma forma. En humanos Sar1 guarda una identidad del 70% y una similitud del 90% con respecto a la secuencia de aminoácidos de la proteína de la mosca.

El transporte inicia cuando Sec12, una proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina (GEF) ubicada en la membrana del RE reconoce a Sar1 y la induce a cambiar su GDP por GTP (Arakawa *et al.*, 2006; Weissman *et al.*, 2001). La unión de GTP a Sar1 altera la conformación de esta GTPasa, exponiendo una región helicoidal, la cual ancla la proteína a la membrana. Este fenómeno provoca el reclutamiento de dos complejos proteicos, un heterodímero Sec23-Sec24 y un heterotetrámero Sec13-Sec31. Se ha comprobado en liposomas sintéticos que estos cinco componentes son suficientes para deformar la membrana y generar vesículas (Matsuoka *et al.*, 1998).

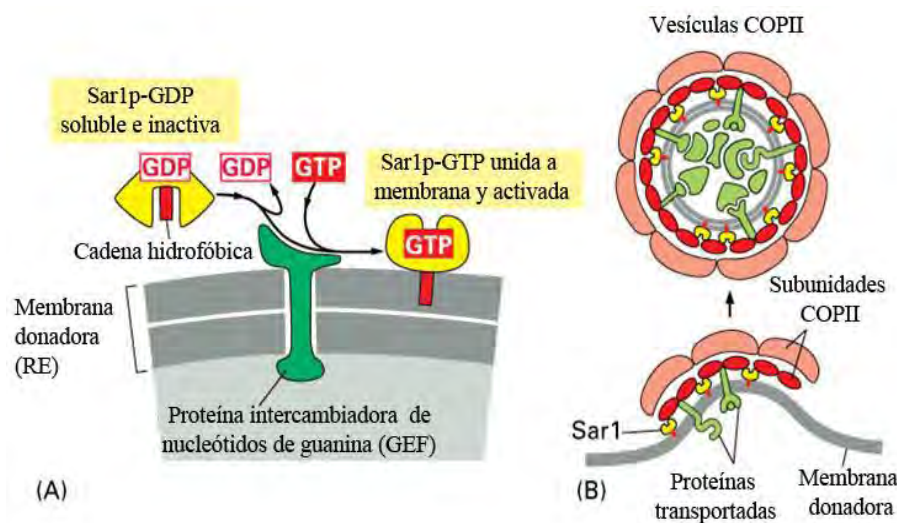
Sec23 (80 kDa) es una proteína activadora de GTPasas (GAP) para Sar1, Sec23 se une a Sar1-GTP y forma uniones con la membrana de la futura vesícula. La estructura del complejo Sar1-Sec23 sugiere que Sec23 puede modular intrínsecamente una actividad lenta de la GTPasa Sar1 (Yoshihisa *et al.*, 1993).

Sec24 (120 kDa) tiene la capacidad de reconocer a las proteínas que serán transportadas (carga) (Nishimura & Balch, 1997; Yoshihisa *et al.*, 1993). Los dímeros Sec23 y Sec24 son estructuralmente similares y forman uniones entrecruzadas de 15 nm de largo formando una cara interior cóncava que ayuda a asociarse y a facilitar la curvatura de la membrana.

La subunidad Sec13-31 constituye la capa exterior del complejo y no posee sitios de unión a los lípidos de las membranas. No se conoce la naturaleza exacta de la interacción entre Sec13-31 y Sec23-24. Los estudios de Fromme *et al.*, (2008) presentan a Sec23 como una unidad fundamental para mantener acopladas a las proteínas del complejo al presentar interacciones con tres de ellas: Sec24, Sar1 y Sec31. También exponen que esta proteína es la que interacciona con la dineína para movilizar a las vesículas. Se cree que el reclutamiento de Sec13-31 después del acoplamiento de Sec23-24 ayuda a acelerar la captura de proteínas carga por Sec24 y a controlar

la actividad de Sec23. También parece ser que el tiempo de liberación de Sar1 causado por la hidrólisis de GTP está controlado por el ensamblaje en etapas de las proteínas que forman el complejo COP II (Figura 2 y 3) (Lapointe & Balch, 2005; Lee *et al.*, 2004).

Después de que las vesículas de transporte COP II se han formado en un lugar de salida del RE y se han desprendido de la cubierta, empiezan a fusionarse entre sí, para que posteriormente ocurra la asociación con la red *cis* Golgi. Un grupo de proteínas denominadas SNARE desempeñan un papel importante en la fusión de estas membranas.



**Figura 2. Transporte vesicular mediado por COP II.** (A) La proteína Sar1 es una GTPasa. De manera inactiva se encuentra unida a GDP pero solamente en la membrana del RE se libera de la molécula de GDP gracias a una proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina (GEF), lo que provoca un cambio en la estructura de Sar1 y su unión a la membrana. (B) En el sitio donde Sar1 se une se activa el reclutamiento de las demás proteínas que forman parte del complejo COP II (tomado y modificado de Alberts *et al.*, 2002).

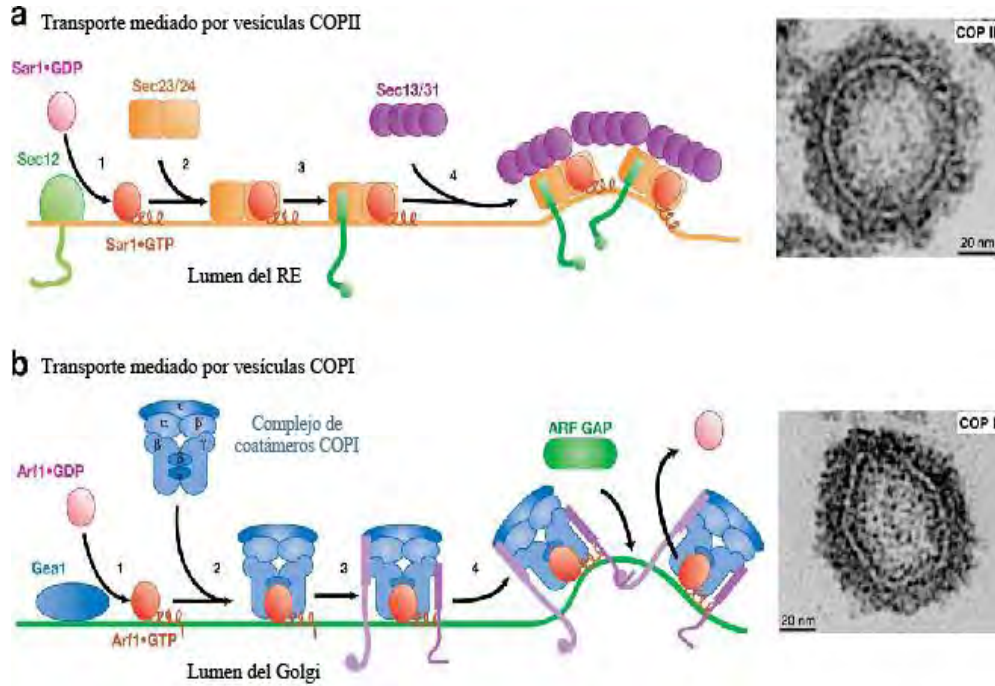
El modelo de formación de complejos SNARE propone que pueden actuar como un torno que acerca a las membranas gracias a la interacción y enrollamiento entre hélices de v-SNARE y t-SNARE (Barlowe, 2003).

Con mucha menor frecuencia, las proteínas que no tienen esas secuencias de salida también pueden ser empaquetadas en vesículas de forma que incluso proteínas que habitualmente funcionan en el RE (proteínas residentes) lo dejan lentamente. Asimismo, las proteínas secretoras que se sintetizan en altas concentraciones pueden dejar el RE sin la ayuda de los receptores de clasificación. Un complejo de subunidades proteicas (COP I) ayuda al recobro de proteínas mediante señales de recuperación. Por ejemplo, las proteínas de membrana residentes del RE contienen señales que las unen directamente a las cubiertas COP I, para ser empaquetadas por vesículas de transporte mediadas por COP I en el Golgi y luego ser enviadas de manera retrógrada (Figura 3).

Para salir del RE las proteínas han de estar bien plegadas y, si son subunidades de complejos proteicos multiméricos, puede ser necesario que además estén bien ensambladas. Las que se encuentren mal plegadas o mal ensambladas se retienen y permanecen unidas a proteínas chaperonas para luego ser degradadas por proteosomas en el citosol. Esta etapa de corrección es muy importante. Sin embargo este mecanismo de control de calidad puede llegar a ser pernicioso, como en el caso de la fibrosis quística en donde una proteína de la membrana que es importante para el transporte de  $Cl^-$  es retenida en el RE por estar ligeramente mal plegada aunque podría funcionar correctamente si alcanzara la membrana plasmática (Alberts *et al.*, 2002).

---

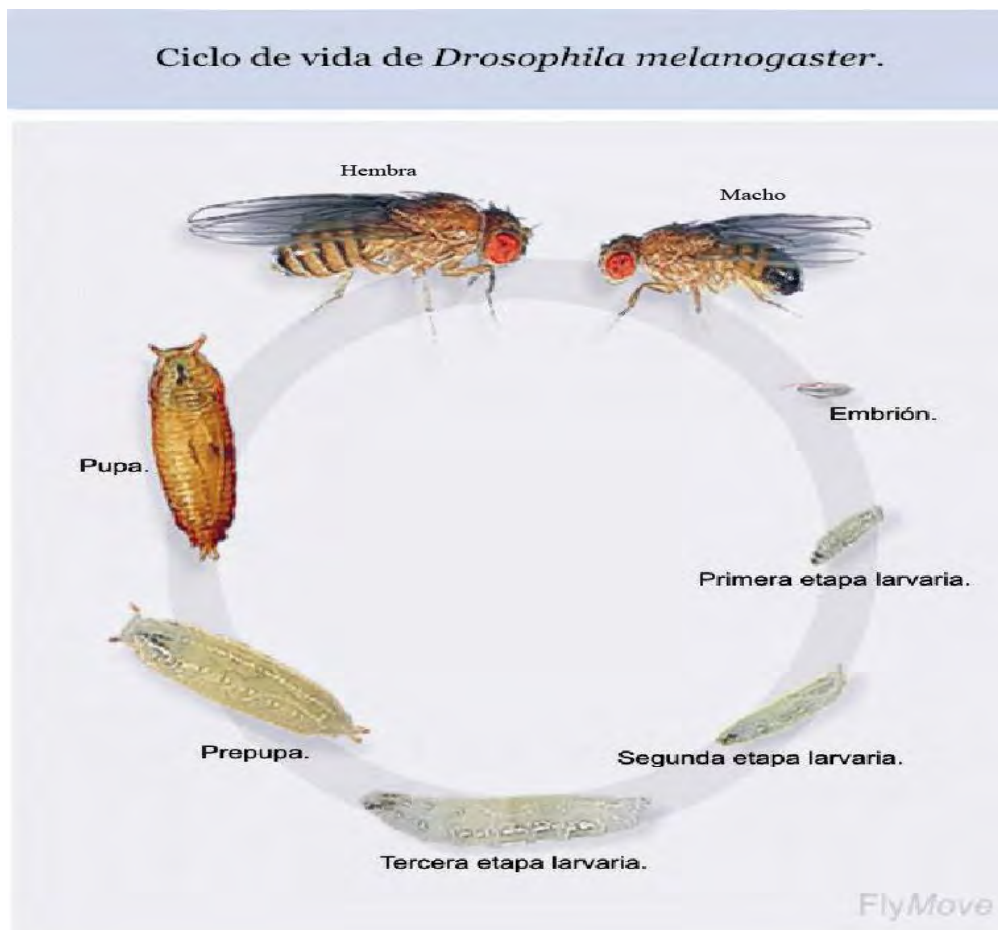
**Figura 3. Transporte vesicular en la vía de transporte intracelular.** La proteína Sar1 unida a GDP (inactiva) se activa al intercambiar GDP por GTP, gracias a una proteína de la membrana del RE (Sec12). Esto desencadena la señal de formación del complejo. El dímero Sec23/Sec24 se une a Sar1 y a la membrana. Posteriormente el tetrámero Sec13/Sec31 se acopla a las proteínas ancladas a la membrana. Este mecanismo provoca que la membrana del RE se deforme y se forme la vesícula. En el transporte mediado por COP I intervienen otras proteínas que regulan la formación de vesículas del aparato de Golgi al RE (tomado y modificado de Alberts *et al.*, 2002).



## 2.6 *Drosophila melanogaster*.

La mosca de la fruta, *D. melanogaster* (Phylum; Arthropoda, Clase; Hexapoda) es un organismo de enorme importancia en el estudio de diversos fenómenos genéticos, ya que reúne características fundamentales que facilitan la investigación científica. Este díptero tiene un tamaño considerablemente pequeño, un ciclo de vida corto y un número reducido de cromosomas (4 pares), particularidades que posibilitan el crecimiento y manutención de un gran número de individuos por muchas generaciones en el laboratorio (Figura 4). Fue adoptada como animal de experimentación genética por Thomas H. Morgan a principios del silgo XX en Columbia University. El genoma de este insecto se encuentra secuenciado en su totalidad (gracias a un consorcio público y a Celera Genomics) y se tienen aislados miles de mutantes y transcritos (Adams, 2000). El tamaño de su genoma representa aproximadamente un octavo (165 Mb) del genoma humano (3000 Mb). El 50% de las secuencias proteicas de la mosca tienen análogos en los mamíferos. Sin duda alguna todo esto le confiere la peculiaridad de ser un versátil modelo para el manejo y análisis genético (Rubin, 1988).

*D. melanogaster* es un insecto holometábolo que presenta cuatro estadios diferentes durante su ciclo de vida: embrión, larva, pupa y adulto (Figura 4). Durante el primero de ellos, la embriogénesis, ocurren diversos eventos morfogenéticos gracias a la coordinación y a las señalizaciones bioquímica y genética de todas sus células, impulsados por la continua síntesis y transporte de compuestos de toda índole, como moléculas de naturaleza lipídica y proteica (vía de transporte intracelular) y por una contribución materna fundamental para el inicio del desarrollo embrionario. Pero además de estos procesos, a lo largo de su vida se llevarán a cabo de manera reiterada diversos fenómenos de diferenciación y de proliferación celular que requerirán del funcionamiento óptimo de esta maquinaria biosintética.



**Figura 4. Ciclo de vida de *D. melanogaster*.** El periodo que le toma a un embrión en llegar a ser adulto es aproximadamente de 10 a 12 días a temperatura ambiente (22°C) (tomado y modificado de Weigmann *et al.*, en prensa).

La metamorfosis es un fenómeno del desarrollo fundamental para que la larva llegue a la etapa adulta. Al inicio de este periodo la larva de tercer estadio entra en un estado prepupal y los discos imagales (epitelios que darán origen a las distintas estructuras del adulto) empiezan a sufrir una serie de cambios morfogenéticos. Existen distintos discos imagales para cada estructura particular en el adulto; discos de tórax, de ojo y antena, de patas, de alas, etc. Las células de estos epitelios proliferarán y se especializarán en los distintos grupos celulares que constituyen los diferentes tejidos en el adulto.

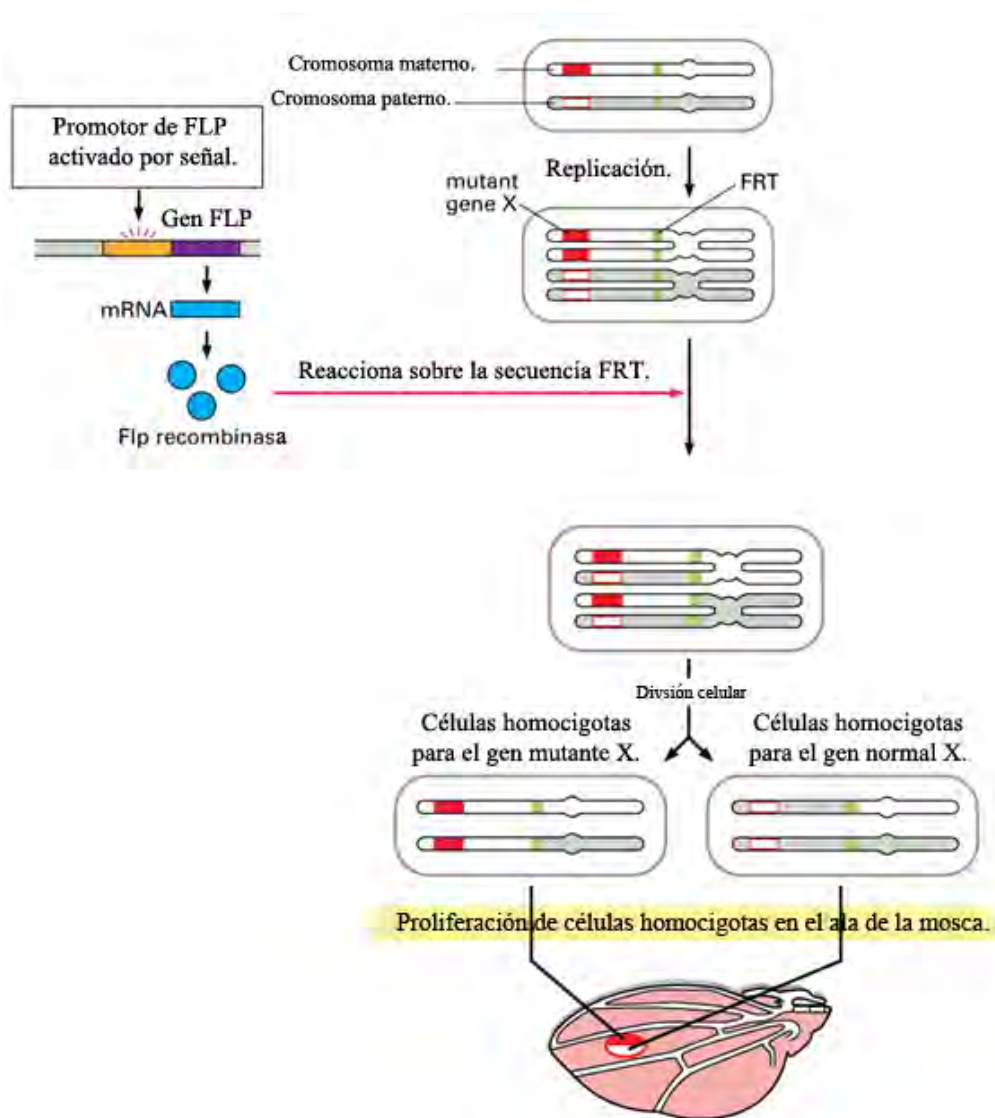
Uno de estos grupos son las células proneurales, responsables de prefigurar la formación de las quetas más grandes en la mosca, denominadas macroquetas. Estas estructuras son órganos sensoriales que forman parte del sistema nervioso periférico de la mosca. Cada macroqueta tiene cuatro componentes: 1) el pelo o queta que se compone de una sola célula denominada “tricógena” que crece en sentido apical gracias al constante transporte intracelular. 2) El socket ó enchufe (célula tormógena que secreta el componente extracelular de la queta), 3) Una neurona cuya proyección dendrítica depende del sistema de transporte mediado por COP II (Ye *et al.*, 2007) y 4) una célula glial. Innumerables enfermedades tienen que ver con una alteración a nivel de la vía de transporte intracelular (Campos-Ortega & Hartenstein, 1997; Hartenstein, 1993).

## **2.7 Generación de mosaicos genéticos en *D. melanogaster*.**

### **2.7.1 Sistema *FRT/FLP*.**

Gracias a la técnica de recombinación somática inducida se puede recombinar el ADN de subgrupos de células en estadios tardíos del desarrollo, lo que implica que es posible generar un genotipo específico en grupos de células en un momento dado del desarrollo (clonas celulares). La forma común de desarrollar este procedimiento es utilizando moscas transgénicas que contienen dos tipos de elementos genéticos procedentes de levaduras: el gen de la recombinasa específica de lugar Flipasa (FLP) y la secuencia *FRT*, diana de la recombinasa FLP. Generalmente el animal es homocigoto para una inserción de la secuencia *FRT* cerca del centrómero en un brazo determinado del cromosoma de interés. Mientras que en otra parte del

genoma se ha insertado una construcción que contiene el gen *FLP* bajo un promotor de choque térmico. Si este embrión o larva se somete a un choque térmico, se logra inducir la expresión de *FLP* logrando que esta enzima catalice el cruzamiento y la recombinación entre los cromosomas materno y paterno en el lugar de inserción de *FRT* (Figura 5). Si el choque térmico es débil, este cambio sólo se produce en unas cuantas células, distribuidas al azar. Si además el animal es heterocigoto para un gen de interés en la región cromosómica entrecruzada, el proceso puede producir dos células hijas homocigotas, una de las cuales ha recibido dos copias del alelo materno del gen y otra las dos copias del alelo paterno. Cada una de estas células hijas se divide dando lugar a zonas clónicas de progenie homocigota (Alberts *et al.*, 2002; Luque & Herráez, 2002).



---

**Figura 5. Creación de células mutantes inducida por recombinación somática.** El diagrama muestra el camino que siguen cada uno de los cromosomas homólogos durante este proceso. Estos cromosomas tienen un elemento *FRT* (verde) insertado cerca del centrómero y contienen un *locus* para un gen de interés (gen X) en el mismo brazo del cromosoma. En el cromosoma paterno (en este ejemplo) está el gen de interés de forma silvestre y en el cromosoma materno se encuentra el mismo gen pero mutado (tomado y modificado de Alberts *et al.*, 2002).

La incidencia del entrecruzamiento se suele detectar fácilmente dado que el animal escogido también es heterocigoto para una mutación de un gen marcador (un gen de pigmentación, por ejemplo) que está situado en el mismo brazo del cromosoma que el gen de interés y que por lo tanto experimenta la misma recombinación. Así es posible generar clones de células homocigóticas claramente marcadas. También se pueden utilizar estos elementos de recombinación (*FLP* y *FRT*) para activar o inhibir la expresión de genes. Un ejemplo de esto último sería la activación de la *FLP* bajo el patrón de expresión de un gen de la mosca que se active sólo en un lugar y momento determinados. Así el suceso de recombinación se desencadenará solo cuando se active la *FLP* dependiente de esta secuencia reguladora. Una variante más utiliza alelos termosensibles de un factor de transcripción de las levaduras (*GAL4*) que en la mosca se utilizan para activar o inhibir de forma reversible la expresión de un gen seleccionado de mosca de acuerdo con el patrón normal de expresión de algunos otros genes de la mosca elegidos. Esta técnica se vale de elementos genéticos móviles (elementos *P*) para generar las moscas transgénicas que tienen incorporados dentro de los transposones estos genes de levaduras (Chou & Perrimon, 1996; Xu & Rubin, 1993; Cooley *et al.*, 1988).

## **2.8 Elementos genéticos móviles en *Drosophila*: elementos *P*.**

Los estudios genéticos en esta mosca han permitido un claro entendimiento de distintos mecanismos moleculares. Un fenómeno ampliamente comprendido es el de los elementos genéticos móviles o transposones (Spradling *et al.*, 1995).



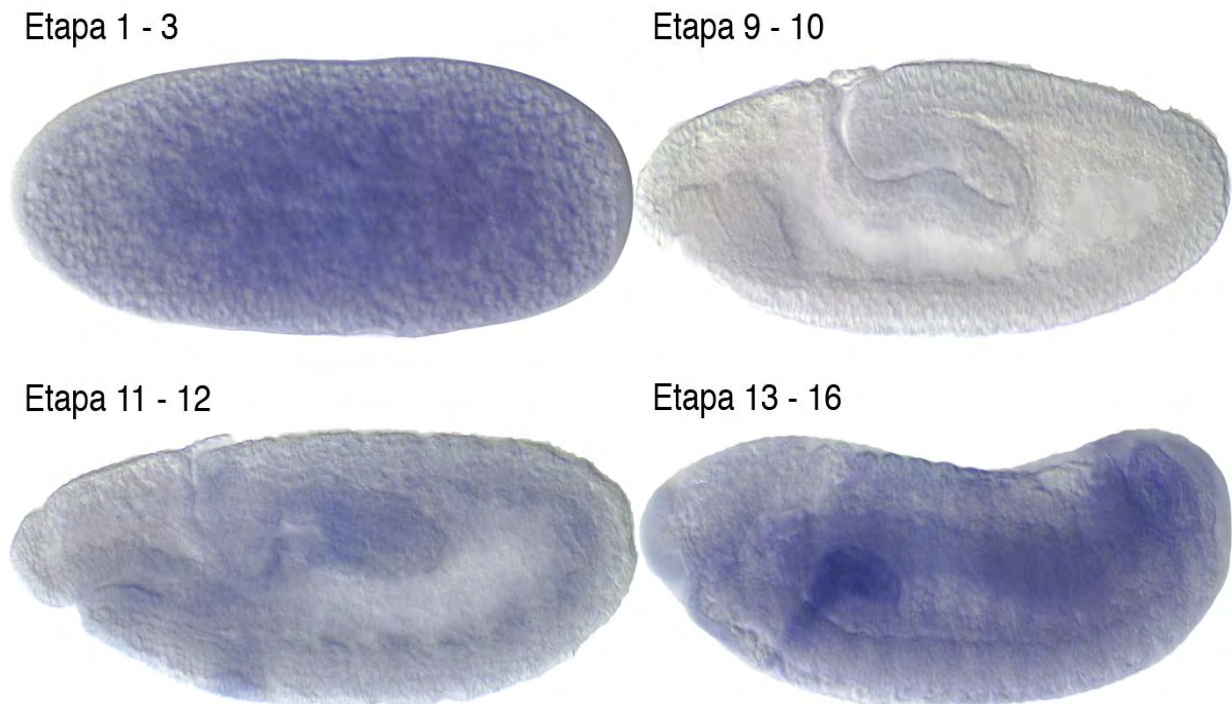
Los elementos transponibles o transposones son segmentos de ADN que se mueven como unidades discretas de un lugar a otro dentro del genoma. Una cualidad de estos elementos móviles es que pueden trasponerse entre un cromosoma, entre varios cromosomas e incluso entre un cromosoma y ADN extracromosómico, como los plásmidos. Estas “mutaciones inestables”, como las denominó Bárbara McClintock, se han encontrado en varios organismos de distintas clases taxonómicas, como *Zea mays*, *Drosophila* o humanos.

Existe una clase de transposón bastante conocida en este díptero, llamado “elemento *P*”, que se ha convertido en una excelente herramienta en la ingeniería genética. Los elementos *P* silvestres tienen 2907 pares de bases con inversiones terminales repetidas de 31 pares de bases. Dichas secuencias terminales son fundamentales para la transposición porque son el sitio de acción de una transposasa (codificada por el mismo elemento *P*) que realiza los cortes y pegados genómicos involucrados en la transposición. Sin embargo, existen otros elementos *P* que carecen de la transposasa debido a una delección. La movilización de estos elementos ocurre solamente si está presente otro elemento *P* que provea la transposasa. Las inserciones por elementos *P* han sido muy útiles en el análisis genético y han jugado un papel esencial en el Proyecto del Genoma de *D. melanogaster*. (Rorth *et al.*, 1996; Spradling, *et al.*, 1995).

Una variante de esta tecnología son los elementos *P* de tipo EP. Los elementos EP tienen sitios de unión a un factor activador de la transcripción propio de las levaduras, GAL4, seguido de un promotor apuntando hacia la región 3' genómica aledaña a la inserción. Así, al integrarse este elemento *P* en el genoma, puede proveer de un “enhancer” y promotor heterólogo a un gen o genes endógeno(s) 3' de la inserción. Para que este “enhancer” esté activo, es necesario cruzar moscas con esta inserción con moscas que expresen, merced a la inserción de otro elemento *P* del tipo trampa de enhancer el factor de transcripción GAL4 en un patrón determinado. De esta manera se logra la expresión ectópica de genes endógenos 3' de la inserción del elemento EP bajo el patrón de expresión de GAL4 (Alberts, 2004; Liao *et al.*, 2000). La mutante nula con la que se trabajó en este proyecto se generó gracias a la inserción de un elemento *P* en la zona reguladora del gen *sar1* que evita su expresión.

## 2.9 Contribución materna.

Es fundamental el control temporal y espacial durante el desarrollo embrionario de cualquier individuo. Para regular los eventos que ocurren durante la embriogénesis es necesaria la expresión de genes de origen materno (en forma de ARNm o proteínas) que funcionan como un aporte fundamental que regula y dictamina el inicio de la embriogénesis. Esta contribución materna quedará depositada en el ovocito durante su maduración en el tracto reproductor. El contenido de esta contribución materna se distribuye en el citoplasma celular. La viabilidad de la embriogénesis depende exclusivamente de la distribución y funcionalidad de estas proteínas o ARNm. Desde el inicio de la activación del genoma cigótico se requiere de la síntesis y transporte de proteínas. Esta es, probablemente, la razón principal por la que el ARNm de Sar1 está presente en estos primeros momentos del desarrollo (Figura 6).



**Figura 6. Hibridación *in situ* del ARNm de Sar1 en embriones de *Drosophila*.** Sólo en las etapas indicadas en la imagen se observa expresión de Sar1 (evidenciada con tinción azul). Desde los primeros momentos de la embriogénesis ya está presente el ARNm de Sar1 debido a la contribución materna, fundamental para el inicio

del desarrollo embrionario. Los embriones están orientados con la parte dorsal hacia arriba y la parte anterior hacia la izquierda (Konikoff *et al.*, 2009).

### **2.10 Alelos del gen *sec13* en *D. melanogaster*.**

Existen diversas proteínas de las que no se puede prescindir por su relevancia en el desarrollo embrionario. A los genes que codifican para este tipo de proteínas y que al perder prematuramente su función en el desarrollo ocasionan la muerte se les denomina “letales embrionarios” (Alberts *et al.*, 2002). Particularmente críticos son los genes denominados “letales celulares” porque su falta de función también ocasiona muerte celular. Se cree que las proteínas que conforman el complejo COP II son de este tipo porque son las encargadas de la única vía de transporte entre el RE y el Golgi. En el laboratorio se caracterizó un alelo mutante de *sec13* que codifica para una proteína que forma parte del complejo COP II. Estos alelos mutantes presentan fenotipos similares a los que ocasionan genes letales embrionarios como los fenotipos de cerrado dorsal o los de involución de la cabeza (fenotipos tardíos embrionarios). A la par se generaron, mediante mecanismos de recombinación somática inducida, larvas de moscas con falta de función de *sec13* en los tejidos que tienen como destino formar el ala y el ojo adultos (zonas clónicas de progenie homocigótica). Tomando en cuenta que el desarrollo de estas estructuras necesita la continua síntesis de proteínas se esperaría que las células afectadas a nivel de la vía COP II perecieran pero las células de estas zonas clónicas (con el gen *sec13* mutado) siguen desarrollándose (Riesgo-Escovar *et al.*, datos no publicados).

### **2.11 Alelos del gen *sar1* en *D. melanogaster*.**

Los embriones mutantes de *sar1* también presentan fenotipos similares a los de mutantes de *sec13*. La característica principal de estos embriones es que logran desarrollarse durante las primeras etapas de la embriogénesis pero no alcanzan el estadio larvario. Existen estudios genéticos sobre las moscas mutantes de *sar1* que relacionan la carencia de esta proteína con malformaciones en el sistema circulatorio y el sistema nervioso (Ye *et al.*, 2007; Yi *et al.*, 2006). Ye *et al.*, (2007) demuestran que no se transporta la subunidad  $\gamma$  de la proteína G en los

cardioblastos debido a que *sar1* se encuentra mutado. Esto provoca una falta de coordinación entre pericardioblastos y cardioblastos con la consecuencia de una fatal malformación cardíaca en los embriones de moscas. Yi *et al.* (2006) estudian la importancia que tiene Sar1 para el crecimiento dendrítico embrionario. Sin embargo, como las mutaciones en *sar1* causan letalidad embrionaria no hay muchos estudios relacionados con las mutantes de esta proteína en este díptero. El análisis desarrollado en esta tesis ofrece un marco de referencia que considera la importancia del complejo COP II fuera del contexto de la embriogénesis.

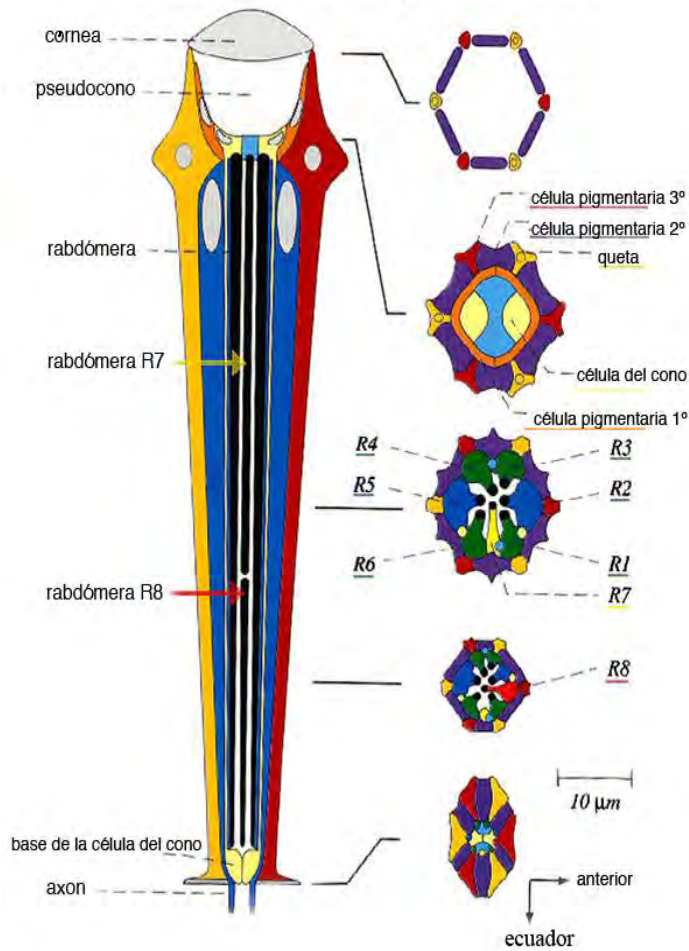
Es indudable la importancia que tienen tanto Sar1, Sec13 y las demás proteínas del complejo COP II en el transporte intracelular, esto se refleja en una variedad de trastornos en el desarrollo en diversos organismos por mutaciones en proteínas de dicho complejo. Como ejemplo está la anemia tipo II en humanos (Shewarz *et al.*, 2009), las malformaciones cefálicas (displasia craneolenticulosutural) en el pez cebra (Townley *et al.*, 2008) o la anomalía en el cerrado del tubo neural (craneoraquisquisis) en ratones (Merte *et al.*, 2010). Sin embargo los resultados del análisis de mutantes del complejo COP II en *D. melanogaster* sugieren una nueva interpretación del paradigma de transporte vesicular en la vía entre el RE y el aparato de Golgi.

## **2.12 Ojo compuesto de *D. melanogaster* y la Rodopsina.**

El ojo compuesto de la mosca está formado por alrededor de 800 unidades hexagonales, denominados omatidios (Figura 7B). Cada omatidio contiene 20 células, ocho de ellas son células fotorreceptoras. Las células pigmentarias secundarias rodean a las células fotorreceptoras. A su vez en los vértices de los omatidios se encuentran alternadas células pigmentarias terciarias y células mecanorreceptoras (quetas) (Figura 7A). Cada fotorreceptor posee un organelo en su membrana plasmática formado por microvellosidades llamado rabdómera, el cual es el equivalente funcional del segmento externo de los conos y bastones de vertebrados (Figura 7D). Existen alrededor de 50 000 a 70 000 microvellosidades en cada célula fotorreceptora. Este organelo le otorga a la membrana celular una enorme superficie en la cual se concentra una gran cantidad de rodopsina, proteína indispensable para llevar a cabo la fototransducción (Borst, 2009; Wang & Montell, 2007).

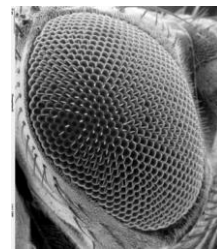
La rodopsina representa alrededor del 50% de todas las proteínas que existen en las células fotorreceptoras. Para que llegue a la membrana de estas células el complejo COP II debe de llevarla del RE al aparato de Golgi para que luego llegue a la rabdómera. Esta proteína es clave para que el estímulo luminoso desencadene la fototransducción, pues al activarse provoca un cambio en la permeabilidad de las membranas. El transporte de la rodopsina a la rabdómera se realiza de manera constante; si este fenómeno disminuye el resultado es que la rabdómera se degenera (Borst, 2009; Richard *et al.*, 2006).

A) Omatidio de *Drosophila* adulta

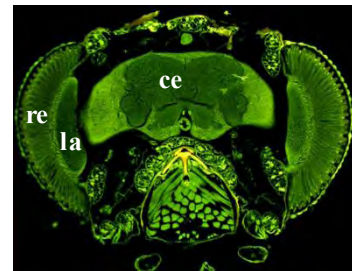


Copyright 1993 Donald Ready  
used with permission

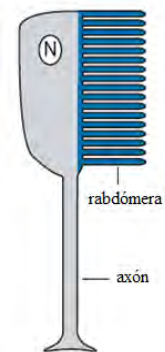
B)



C)



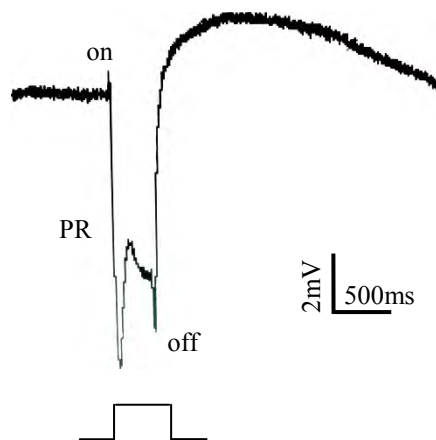
D)





**Figura 7. Estructura del ojo compuesto de *D. melanogaster*.** **A.** Corte longitudinal de omatidio del ojo compuesto, junto con cortes transversales a diferentes alturas del mismo. Las células fotorreceptoras se representan con la letra R. En los cortes entre la base de las células del cono y la cornea siempre se aprecian 7 células fotorreceptoras. Los óvalos negros representan las rabdómeras. **B.** Escaneo en microscopía electrónica de barrido del ojo compuesto de la mosca de la fruta. **C.** Corte coronal de la cabeza de una mosca adulta: ce, cerebro; la, lamina; re, retina. **D.** Vista longitudinal de una célula fotorreceptora donde se muestran las microvellosidades que conforman la rabdómera, el núcleo y el axón (B y D tomados de Wang & Montell, 2007; C de Alberts *et al.*, 2002).

Una manera de comprobar que la rodopsina llega a la rabdómera es mediante un análisis electrofisiológico, realizando un electroretinograma (EG), ya que sólo cuando la rodopsina se encuentra en la membrana de las células fotorreceptoras es que se puede registrar un cambio eléctrico ante un estímulo luminoso. Los EG's registran extracelularmente las respuestas sumadas de las células de la retina hacia la luz. Para esto se coloca un electrodo en la superficie del ojo compuesto. Existen dos características muy importantes en un EG; la primera es el potencial del receptor (PR) que refleja la actividad en la retina y la segunda tiene que ver con los transitorios "on" y "off", los cuales ocurren debido a la actividad postsináptica en la lámina (Figura 7C) (Wang & Montel, 2007). Cuando la rodopsina es funcional se presenta un registro parecido al de la Figura 8.



**Figura 8. Registro de EG de una mosca silvestre.** La amplitud y la escala de tiempo marcados se incluyen en la imagen. El evento marcado debajo del registro indica el inicio y la finalización del estímulo luminoso. También se indican los transitorios "on" y "off" y el potencial del receptor (PR).

### III. JUSTIFICACIÓN.

Las investigaciones en los últimos años relacionadas con el transporte celular en sistemas vivos han sido encaminadas a la visualización de este mecanismo mediado por COP I y COP II en células en cultivo y en levaduras (modelos unicelulares), ayudando a interpretar la dinámica de esta maquinaria. No obstante, la investigación en *D. melanogaster* confiere la posibilidad de identificar de manera fiel los procesos involucrados en el transporte mediado por el complejo COP II en un organismo multicelular, en vivo. Este modelo nos permite estudiar la falta de función del complejo COP II en dípteros adultos evadiendo la mortalidad embrionaria y la contribución materna, particularidades que en otros modelos sería imposible de esquivar. El estudio de los clones homocigotos mutantes permite elucidar de manera correcta el paradigma de transporte vesicular anterógrado. En nuestro laboratorio se estudiaron mutantes de una de las proteínas del complejo COP II (Sec13). Estos estudios ponen en duda el papel obligatorio y fundamental del complejo COP II en el transporte celular, es por eso que los retomamos en este trabajo para analizar otro miembro del complejo, Sar1.

#### **IV. HIPÓTESIS.**

Al igual que Sec13 la proteína Sar1 es prescindible para llevar a cabo el transporte intracelular a través de la vía del RE hacia el aparato de Golgi.



## V. OBJETIVO.

### Objetivo general.

Caracterizar los fenotipos del gen *sar1* en *D. melanogaster*.

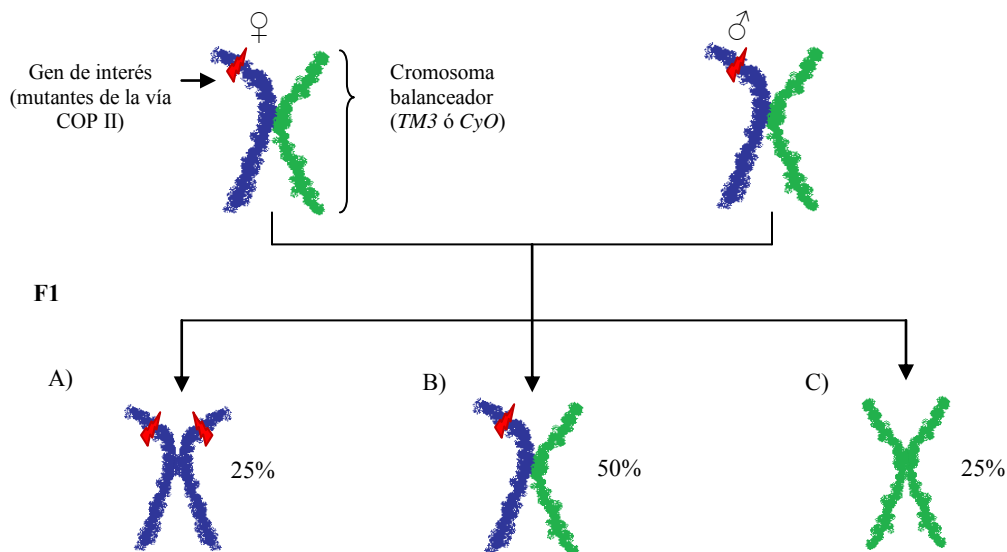
### Objetivos específicos.

- Caracterizar fenotipos embrionarios del alelo mutantes para *sar1*<sup>05712</sup>.
- Generar clones homocigotos mutantes de *sar1*<sup>05712</sup> en el tejido ocular de *D. melanogaster*.
- Caracterizar fenotípicamente los clones homocigotos mutantes de *sar1*<sup>05712</sup> en la región ocular de *D. melanogaster*.
- Caracterizar las interacciones genéticas de mutaciones en *sar1*<sup>05712</sup> con otras mutantes del complejo COP II en *D. melanogaster*.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 6.1 Características de la mutante para Sar1 (alelo mutante *sar1*<sup>05712</sup>).

El alelo mutante de *sar1*<sup>05712</sup> se generó gracias a la inserción de un elemento *P* en el exón más 5' de dicho gen. Es embrionario letal y debido a la inserción del elemento *P* solo se expresa el 20% del ARNm respecto a una mosca silvestre (Yi *et al.*, 2006). La inserción contiene una construcción del gen *rosy* de 7.2 kb y el gen *lacZ*, bajo un promotor de la transposasa del elemento *P*. La mutación se encuentra balanceada con el cromosoma balanceador *TM3*. Los cromosomas balanceadores son cromosomas que poseen múltiples inversiones, mutaciones letales recesivas y un marcador genético dominante que facilita su identificación. Las múltiples inversiones evitan que este cromosoma pueda recombinarse con su homólogo durante la meiosis en las moscas hembras, dado que no existe recombinación en la meiosis masculina. Todos los alelos utilizados en esta tesis se encuentran balanceados. La manera en que se obtuvieron embriones homocigotos para las distintas mutantes del complejo COP II se ejemplifica en la Figura 9.



**Figura 9. Esquema de cruzas para generar embriones homocigotos letales de genes de la vía COP II.** Los alelos mutantes del complejo COP II (*sec23*<sup>313c8</sup>, *sec24*<sup>F05576</sup>, *sec31*<sup>e00167</sup>, *sec13*<sup>10327</sup> y *sar1*<sup>05712</sup>) son letales en

condición homocigota. El cromosoma balanceador (verde) posee inversiones múltiples que evitan el apareamiento con su homólogo (azul) durante la recombinación meiótica. **A)** Homocigotos mutantes del gen de interés (letal embrionario) que son recolectados para su estudio. **B)** Heterocigotos que representan la mitad de la población que sobrevive. **C)** Homocigotos del balanceador (poseen genes que en condición homociga causan letalidad sin presentar fenotipos embrionarios).

## **6.2 Preparación de cutículas.**

### **6.2.1 Obtención de embriones.**

Para realizar puestas de huevos y obtener embriones, se modifica la base de vasos de precipitado de plástico de 100 ml. haciendo pequeñas perforaciones, para después colocar en ellos moscas control (*yw*) y en otros moscas balanceadas mutantes para *sar1*. Cada vaso se tapa con una caja de Petri que tenga el mismo diámetro de la boca del vaso para así crear un ambiente propicio para la puesta de huevos (la caja de Petri contiene agarosa con jugo de uva y un poco de levadura en la superficie). Posteriormente el vaso se invierte y se coloca en un cuarto de cultivo (25 °C y humedad relativa de 50%). Después de 24 hrs de incubación la caja de Petri es remplazada por una nueva (también con levadura en su superficie). Las cajas que ya tengan 24 hrs de incubación se dejan en las condiciones ya mencionadas hasta esperar que el desarrollo embrionario se complete y se seleccionan los embriones muertos que son homocigotos mutantes de *sar1*, dado que el gen es embrionario letal (Yi *et al.*, 2006 y Zhu *et al.*, 2005).

### **6.2.2 Colección de embriones.**

Posterior a las 48 hrs de puesta la caja de Petri se enjuaga con agua destilada y con un pincel de pelo de camello se despegan los embriones, y se filtran en una malla de poro pequeño adaptada para retener embriones. Siguiendo el protocolo de Sullivan *et al.*, (2000) estos embriones se enjuagan varias veces hasta que la levadura quede disuelta. Los embriones recolectados se sumergen en una solución 1:1 de hipoclorito de sodio con agua destilada, hasta que se decorionan (con la ayuda de un microscopio estereoscópico se puede llevar a cabo una

observación precisa de este fenómeno). Posteriormente estos embriones decorionados se enjuagan en agua destilada, se quita el exceso de agua y se transfieren a un vial 1.5 ml con 750  $\mu$ l de heptano con la ayuda de un pincel remojado en dicha sustancia.

### 6.2.3 Fijado y montaje.

Ya que los embriones se encuentran en el heptano se adicionan 750  $\mu$ l de metanol y EGTA 0.5 M (1  $\mu$ l por cada 10  $\mu$ l de metanol), y se agitan intensamente por 120 segundos para romper la membrana vitelina. Finalmente se remueve el líquido y se procede a hacer tres lavados con metanol y luego dos con agua desionizada. Estos embriones se montan en un portaobjetos con solución de Hoyer para digerir los tejidos blandos y se cubren con un cubreobjetos. Se dejan incubar a 60 °C por 12 hrs, y después de 24 hrs se observan al microscopio y se toman fotografías (Sullivan *et al.*, 2000). Alternativamente se pueden montar en una solución de fenol, ácido láctico y alcohol polivinílico pero el periodo que se requiere para digerir tejidos blandos es mayor; de dos a tres días a 60°C.

### 6.3 Recombinación de *FRT82-sar1* en un mismo cromosoma.

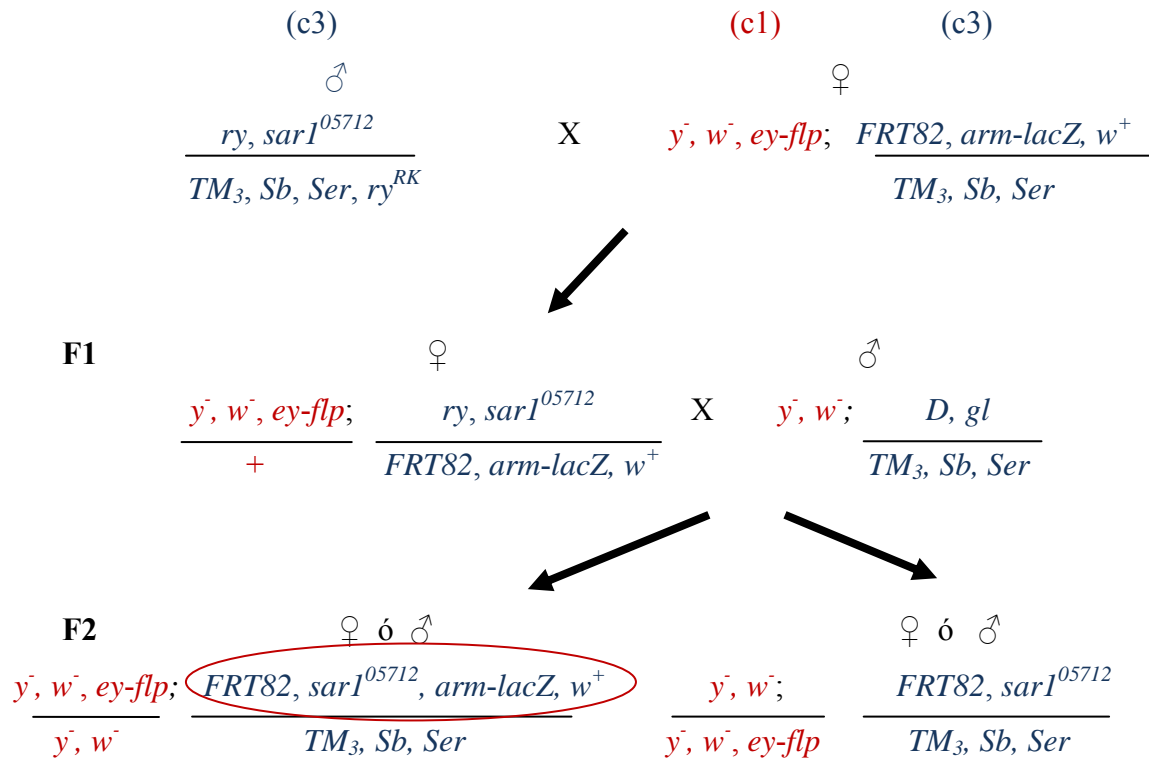
Como fue aclarado en la introducción, el sistema de generación de clonas celulares proporciona una manera muy precisa de estudiar células homocigotas para *sar1*<sup>05712</sup> en una zona determinada. Para lograr esto primero se necesita recombinar *FRT82* y *sar1*<sup>05712</sup> en un mismo cromosoma y en células germinales femeninas (en machos no existe recombinación meiótica). El esquema de cruza de la Figura 9 ejemplifica como se logró esto. La línea con la secuencia *FRT* que se utilizó (insertada gracias a un transposón en el brazo derecho en la región citogenética 82), también posee una inserción con los genes reporteros *arm-lacZ* (*lacZ* codifica para la enzima  $\beta$ -galactosidasa de *Escherichia coli*) y el gen *white* silvestre (*w*<sup>+</sup>) de la mosca que confiere una pigmentación roja en el ojo. Estos marcadores permiten identificar a las células donde se den los eventos de recombinación deseados.

En algunas células germinales de las hembras F1, se obtuvo por recombinación el cromosoma *sarI*<sup>05712</sup>, *arm-lacZ*, *w*<sup>+</sup> y *FRT82* (círculo rojo en la Figura 10). La recombinación de estos elementos se promovió en 158 eventos independientes (separando 158 individuos con los fenotipos esperados de la F2 en la Figura 10 y cruzándolos cada uno nuevamente con moscas de la línea *y*<sup>-</sup>, *w*<sup>-</sup>; *D*, *gl/TM<sub>3</sub>*, *Sb*, *Ser*). Fue de esta manera que se obtuvieron 158 posibles recombinantes de las cuales sólo 10 presentaron recombinación de los elementos deseados (nueve con fenotipo de ojos rojos, *w*<sup>+</sup> y una con fenotipo de ojos blancos, *w*<sup>-</sup>).

En este trabajo, se utilizaron dos fuentes de Flipasa. Una, *ey-flp*, donde la Flipasa se expresa bajo el control del promotor del gen *eyeless* (*ey*) en las células precursoras del ojo y antena y otra, *hs-flp*, donde la Flipasa se expresa bajo el control de un promotor inducible por choque térmico en todo el organismo (Figuras 10, 11, 12 y 13), de esta forma podemos controlar tanto espacial como temporalmente la formación de clonas. Por otra parte, para los diferentes experimentos en donde se obtuvieron clonas en el ojo, el tórax y en la línea germinal se utilizaron distintos cromosomas con marcadores que permiten identificar clonas celulares homocigotas con genotipos específicos: 1) *FRT82*, *CD2*, *y*<sup>+</sup> 2) *FRT82*, *rpS3*, *ubi-GFP* y 3) *FRT82*, *ovo*<sup>D1</sup>, *w*<sup>+</sup>. Los esquemas de las Figuras 10, 11, 12 y 13 presentan los sistemas de cruzas que se requirieron para obtener líneas de moscas con los genotipos deseados. Los genes de interés para esta tesis están en el cromosoma sexual (**c1**) y en el cromosoma tres (**c3**).

---

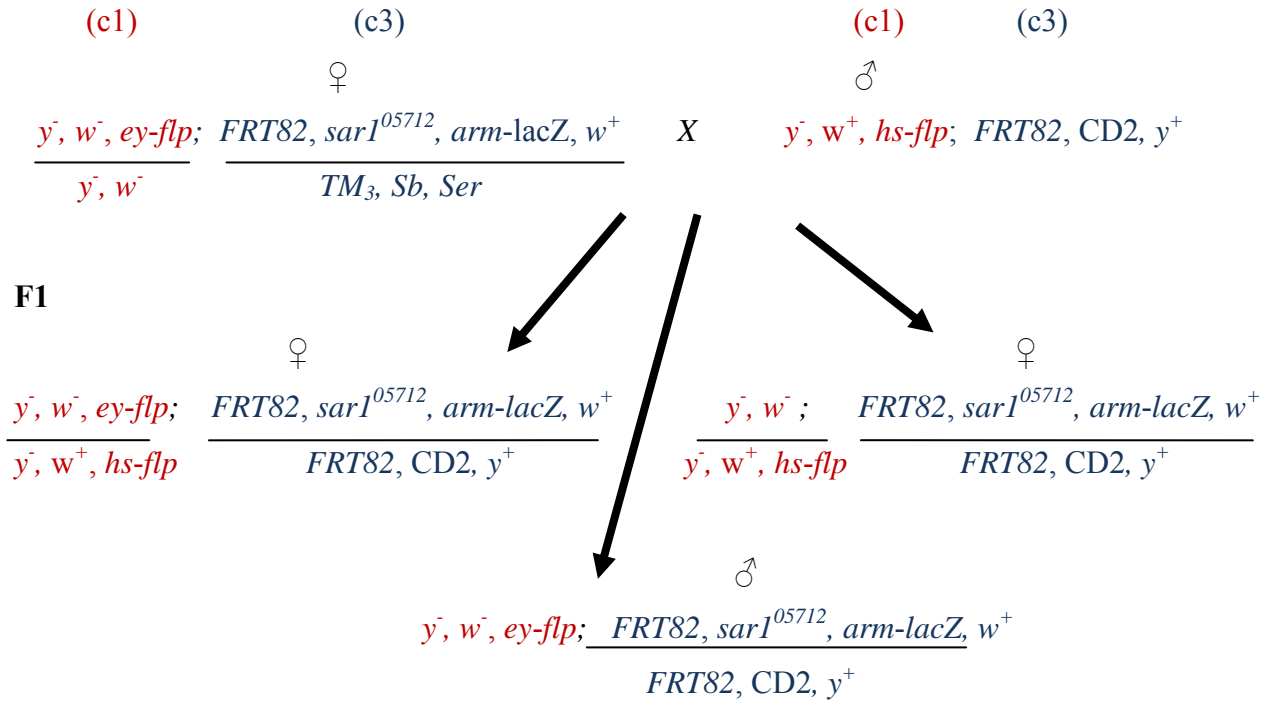
**Figura 10. Esquema de cruzas para generar el cromosoma recombinante *FRT82*, *sarI*<sup>05712</sup> para la obtención de clonas celulares *sarI*<sup>05712</sup>/*sarI*<sup>05712</sup>.** Las células germinales de algunas hembras F1 sufrieron recombinación meiótica que propició la combinación de *sarI*<sup>05712</sup>, *FRT82* en el cromosoma 3 (fenotipo con ojos blancos, *w*<sup>-</sup>). También se generaron nueve líneas con el cromosoma *FRT82*, *sarI*<sup>05712</sup>, *arm-lacZ*, *w*<sup>+</sup> (ojos rojos, círculo rojo en el esquema) (sólo se esquematizan los genotipos de interés).



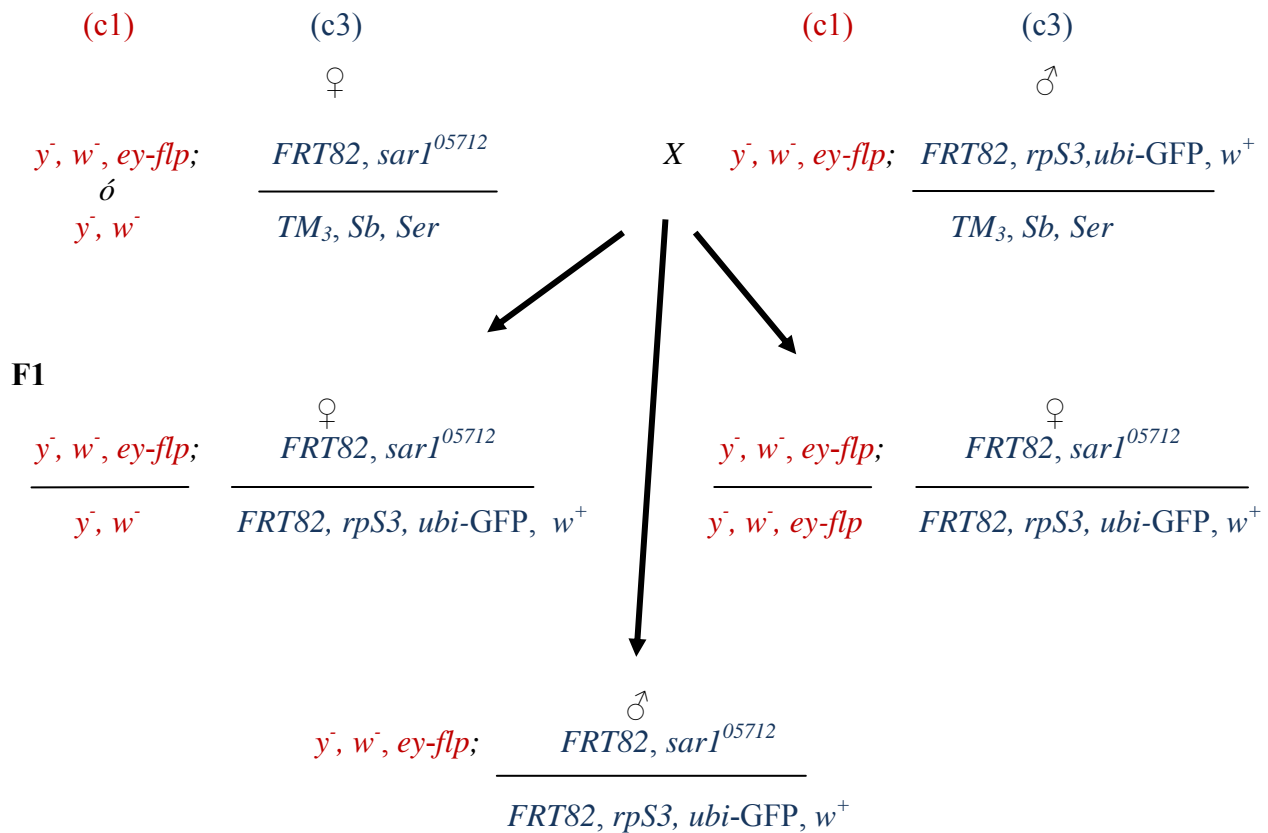
#### 6.4 Generación de clones homocigotos mutantes de Sar1.

El sistema FLP-*FRT* ofrece un fenómeno de recombinación mitótica adecuado para analizar los fenotipos de células mutantes de la proteína *sar1*. Se siguió la técnica descrita por Newsome *et al.*, (2002) para generar clones mutantes  $sar1^{05712}/sar1^{05712}$  en la región ocular y el tórax de moscas adultas de *D. melanogaster*. En estos experimentos la Flipasa se activa bajo el promotor del gen *eyeless* (*ey*), este gen sólo se expresa en las células precursoras del ojo. En los esquemas de las Figuras 11 y 12 se presentan dos estrategias para obtener animales donde se pueden inducir clonas en el ojo. En la primera se generarán clonas CD2,  $y^+/CD2, y^+$  que se distinguirán por la falta de pigmento en el ojo ( $w^-$ ) y clonas  $sar1^{05712}, w^+/sar1^{05712}, w^+$  que resaltarán en el ojo por la expresión de pigmento rojo (Figura 20). Además si se usa otra fuente de expresión de la Flipasa (*hs-flp*) como se ejemplifica en el esquema de cruza de la Figura 11 se pueden distinguir zonas clónicas de  $sar1^{05712}/sar1^{05712}$  por ausencia de pigmento en la cutícula de clonas CD2,  $y^+/CD2, y^+$  que expresan *yellow* (*y*) (gen que contribuye a la pigmentación en la cutícula). CD2 es el epítipo de un antígeno de superficie de los linfocitos T humanos que se usa

como marcador. De la segunda estrategia se obtienen clonas  $rpS3, w^+, ubi\text{-GFP}/rpS3, w^+, ubi\text{-GFP}$ . En donde la mutación en  $rpS3$  (proteína ribosomal S3) es letal. Y también se obtienen un grupo de clonas  $sar1^{05712}/sar1^{05712}$  que se distinguen por la falta de pigmento rojo (Figura 12).



**Figura 11.** Esquema de cruzas para obtener individuos con clonas homocigotas  $sar1^{05712}/sar1^{05712}$  y clonas homocigotas CD2/CD2 en el ojo. Se pueden obtener tres fenotipos de interés para generar clonas en distintas partes del cuerpo ( $y^-, w^-/y^-, w^+, hs\text{-}flp; \frac{FRT82, sar1^{05712}, arm\text{-}lacZ, w^+}{FRT82, CD2, y^+}$ ) o exclusivamente en el ojo. Existe el inconveniente de que no se pueden marcar las zonas clónicas en ojos de moscas hembra ya que, como se visualiza en el esquema, las células pigmentarias son  $w^+$  ( $y^-, w^-, ey\text{-}flp/y^-, w^+, hs\text{-}flp; \frac{FRT82, sar1^{05712}, arm\text{-}lacZ, w^+}{FRT82, CD2, y^+}$ ). Los machos heredan exclusivamente el gen  $ey\text{-}flp$  por lo que sólo producen clonas en el ojo ( $y^-, w^-, ey\text{-}flp; \frac{FRT82, sar1^{05712}, arm\text{-}lacZ, w^+}{FRT82, CD2, y^+}$ ).



**Figura 12. Esquema de cruza para obtener individuos donde se pueden inducir clonas  $sarI^{05712}/sarI^{05712}$  y  $rpS3/rpS3$ .** La condición homocigota mutante de  $rpS3$  es letal. Debido a esto los omatidios que se formen en el ojo estarán estructurados por células  $sarI^{05712}/sarI^{05712}$  y tejido heterocigoto no recombinado ( $y^-, w^-, ey-flp; FRT82, sarI^{05712}/FRT82, rpS3, ubi-GFP$ ), marcado con  $w^+$  (solamente se esquematizan los genotipos de interés).

La F1 de la crusa que es representada en la Figura 12 se mantuvo a temperatura ambiente durante el periodo de desarrollo embrionario y pupal. Se contaron e inspeccionaron las pupas que se formaban sobre las paredes de los tubos de crusa. El tiempo promedio para que la F1 de esta crusa alcance la última etapa de la metamorfosis es aproximadamente 11 días a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este periodo se identificaron moscas con problemas en el desarrollo cefálico a las que se les denominó “jíbaros” y “pelonas”. Estas moscas presentan defectos en toda la porción cefálica porque  $ey-flp$  se expresa en todas las células precursoras del ojo y antena (estructuras que constituyen una gran parte de la cabeza en este díptero). Se analizaron 10 moscas “jíbaro” durante 48 hrs para darle seguimiento al desarrollo cefálico.



## 6.5 Electrorretinogramas.

Basándonos en la técnica de Ayer y Carlson (1991) se colocó un electrodo de registro sobre la superficie del ojo de las moscas “pelonas” (cuya cabeza y ojos presentan clonas  $sarI^{05712}/sarI^{05712}$ ) o en las silvestres y otro se insertó como referencia en el tórax. Posterior a la estimulación luminosa de la retina se procedió a registrar la respuesta eléctrica evocada midiéndose la amplitud de cada uno de los siguientes parámetros: transitorio On, potencial de receptor y transitorio Off. Se tomaron 10 registros en ojos silvestres y 10 en ojos mutantes de  $sarI^{05712}/sarI^{05712}$  (“pelonas”) de hembras. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante una prueba T de Student, con valor de  $\alpha=0.1$ . El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el software Prism 5<sup>®</sup>, versión 5, desarrollado por GraphPad Software, Inc.

## 6.6 Caracterización fenotípica del tejido ocular homocigoto $sarI^{05712}/sarI^{05712}$ .

Se caracterizó la forma del tejido generado en ojos de moscas control (*yw*) y ojos con clonas  $sarI^{05712}/sarI^{05712}$  (“pelonas”). Para esto se analizó la estructura de los omatidios mediante cortes histológicos finos (0.5, 1 y 1.5  $\mu\text{m}$ ). Los cortes obtenidos se tiñeron con azul de metileno y se montaron en portaobjetos.

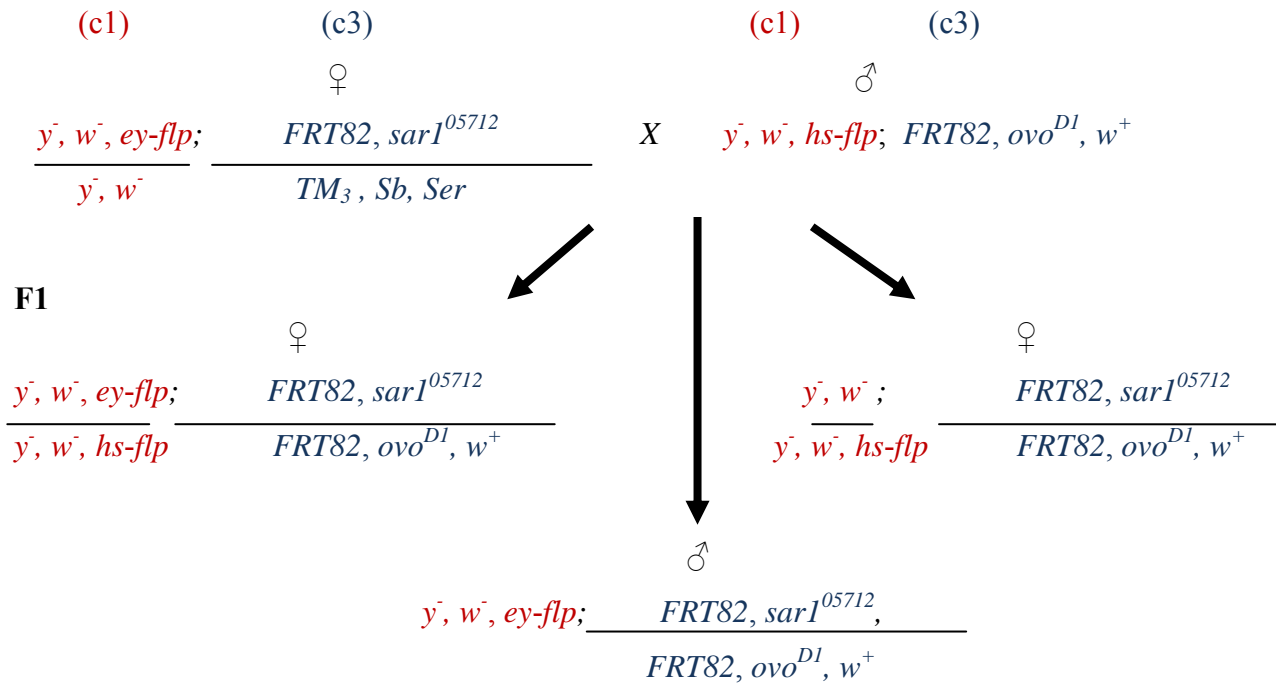
La técnica de fijación del tejido ocular fue la siguiente: se disecaron cabezas de mosca y se transfirieron a solución Ringer. Posteriormente se sustituyó el Ringer por una mezcla fijadora de glutaraldehído 2% y tetraóxido de osmio ( $\text{OsO}_4$ ) al 1%, diluidos en solución amortiguadora de cacodilatos al 0.1M, pH 7. El periodo de fijación fue de 30 min. Después se sustituyó la solución fijadora por  $\text{OsO}_4$  al 2% y se dejó fijando por un periodo de 2 hrs. Todo el proceso de fijación se llevó a cabo en hielo. Posteriormente se sometió el tejido a una deshidratación con acetona en un equipo automatizado. La deshidratación se realizó de forma gradual sumergiendo la muestra en primera instancia a una solución al 30% durante cinco min, luego se cambió a distintas concentraciones (50, 70, 90, 96, 100% y acetona absoluta) hasta llevarla a una de acetona absoluta, dejando el mismo margen de tiempo entre cada cambio de concentración con excepción de los dos últimos pasos en donde el tiempo fue de 10 min. Una vez que finalizó la

deshidratación la muestra se transfirió a una resina de medio de inclusión (Spurr) que se compone de dióxido de vinilciclohexano (7.5g), nonenil succínico anhidro (19.5g), propilengliol diglicil éter (3.75g) y dimetilaminoetanol (0.3g). La resina se diluyó 1:1 con acetona. La muestra se dejó sumergida en la resina aproximadamente 14 hrs. Al finalizar este periodo se trasladó el tejido a una solución de Spurr al 100% por 4 hrs. Por último la muestra se transfirió a moldes de inclusión en donde se orientaron y luego se catalizó la solidificación en un horno a 65°C por un periodo de 18 a 70 hrs.

### **6.7 Generación de clones homocigotos $sar1^{05712}/sar1^{05712}$ en la línea germinal.**

Con la técnica FLP-DFS (de **FLiPase** target site-specific recombinase **Dominant Female Sterile**) se logró generar clonas de línea germinal en hembras heterocigotas para la mutación del gen  $ovo^{D1}$ . Esta mutación es dominante y provoca esterilidad en las hembras, por lo tanto sólo las células germinales que eliminan esta mutación por eventos de recombinación y sean homocigotas para el cromosoma homólogo (sin la mutación  $ovo^{D1}$ ) podrán convertirse en huevos. Con la ayuda de la recombinasa sitio-específica/flipasa, podemos incrementar notablemente la frecuencia de recombinación de sitios FRT. Esta enzima se expresa bajo el control del promotor de  $hsp70$ .

Para analizar el desarrollo de embriones sin la contribución materna de Sar1 ( $sar1^{05712}$  es un alelo amorfo) se generaron clonas de línea germinal homocigotas  $sar1^{05712}/sar1^{05712}$  en hembras heterocigotas. De esta manera los huevos producidos por estas hembras tienen un aporte deficiente de este gen (Yi *et al.*, 2006). Esto se logró conforme a la estrategia planteada en la Figura 13. Para esto se utilizó un cromosoma que contiene el alelo  $ovo^{D1}$  en el mismo brazo del cromosoma 3 que contiene al locus de  $sar1$ . De este modo las únicas células de línea germinal que no tienen una copia de  $ovo^{D1}$  son las que conducen a la formación de huevos y son homocigotas mutantes para  $sar1$  ( $sar1^{05712}/sar1^{05712}$ ).



**Figura 13. Esquema de cruces para obtener individuos de donde se pueden generar células germinales  $sarI^{05712}/sarI^{05712}$ .** La Flipasa bajo el patrón de expresión de *hsp70* (inducida por choque térmico) recombinó los cromosomas homólogos en las células de línea germinal de hembras (este proceso también se puede inducir en cualquier otra línea celular). Los machos de la F1 sólo sufren recombinación en el ojo ya que únicamente pueden heredar una Flipasa proveniente de la madre que se activa bajo el patrón de expresión del gen *eyeless* (el gen *ey-flipasa* se encuentra en el cromosoma X).

## 6.8 Interacciones genéticas.

Se caracterizaron las interacciones genéticas de  $sarI^{05712}$  con otros genes mutados que codifican para otras proteínas del complejo COP II. Para esto se revisaron cuáles son los fenotipos más acusados en individuos homocigotos para  $sarI^{05712}$  con una y/o dos copias mutantes de otro elemento de vía (por ejemplo:  $sarI^{05712}/sarI^{05712}, sec13^{10327}/sec13^{10327}$ ).

## VII. RESULTADOS.

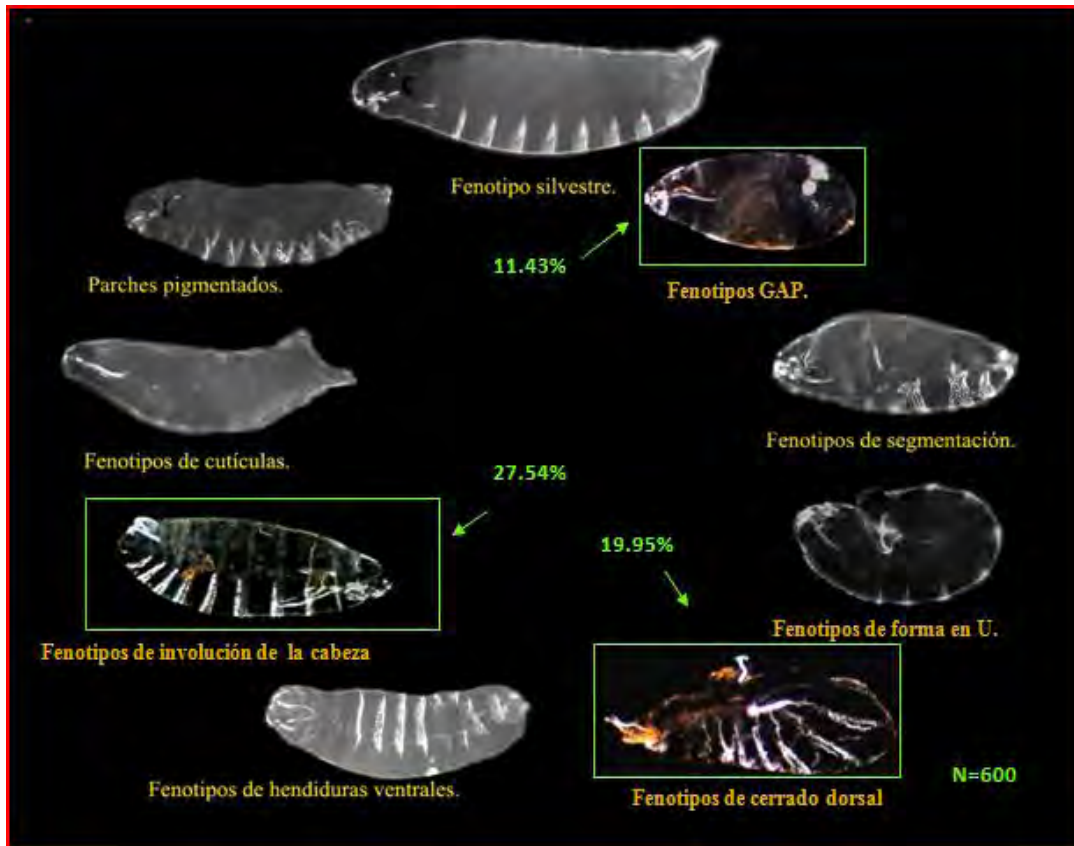
### 7.1 Caracterización de fenotipos en individuos mutantes para *sar1*.

#### 7.1.1 Fenotipo cigótico de *sar1*<sup>05712</sup>.

El primer paso para interpretar la importancia del complejo COP II en el transporte intracelular fue el análisis de mutantes embrionarios del gen *sar1*. La mutación en este gen, causada por la inserción de un elemento *P*, provoca letalidad embrionaria y sólo se encuentra cerca del 20% del RNAm en embriones homocigotos mutantes *sar1*<sup>05712</sup>/*sar1*<sup>05712</sup> (Yi *et al.*, 2006). Estos mutantes presentan en su mayoría fenotipos relacionados con alteraciones en las etapas finales de la embriogénesis (cerrado dorsal e involución de la cabeza). También hay un porcentaje considerable de alteraciones durante la especificación de segmentos y en las primeras etapas del desarrollo (fenotipos tipo “gap”). La variedad de fenotipos observados en los individuos *sar1*<sup>05712</sup>/*sar1*<sup>05712</sup> podría estar reflejando su importancia en distintos momentos durante la embriogénesis (Figura 14). Aunque no existe expresión cigótica de este gen, la contribución materna puede contribuir a la diversidad de fenotipos observados. Es importante indicar que la condición no isogénica (fondo genético heterogéneo) de los embriones *sar1* mutantes también se ve reflejada en la diversidad de los fenotipos encontrados. Las Figuras 13, 14 y 15 presentan únicamente fenotipos embrionarios homocigotos de las distintas mutantes del complejo COP II (esta condición homóciga también es letal para el resto de los genes del complejo COP II), los fenotipos restantes (heterocigos o balanceador/balanceador) no se muestran en las figuras y representan aproximadamente el 75% del total de embriones depositados en las cajas de puesta de cada una de las cinco proteínas.

En el laboratorio se caracterizó un alelo mutante de *sec13* (*sec13*<sup>01031</sup>) que codifica para otra proteína que forma parte del complejo COP II (Riesgo-Escovar, datos no publicados). La mutación ocasionada por la inserción de un elemento *P* provoca que este alelo sea nulo. La mutante *sec13*<sup>01031</sup>/*sec13*<sup>01031</sup> también presenta fenotipos similares a los de *sar1*<sup>05712</sup>/*sar1*<sup>05712</sup> (Figura 15). Existen evidencias en otros modelos a cerca de la importancia de *sec13* para el transporte de proteínas. Un ejemplo de ello son los estudios de Fromme *et al.*, (2007) y Schwarz

*et al.*, (2009) que muestran alteraciones en la formación de la cabeza del pez cebra durante la embriogénesis debido a la falta de expresión de *sec13*. La demostración de que tanto *sar1* como *sec13* presentan fenotipos embrionarios semejantes sugiere que ambos genes tienen igual importancia para el transporte intracelular de proteínas en *D. melanogaster*.

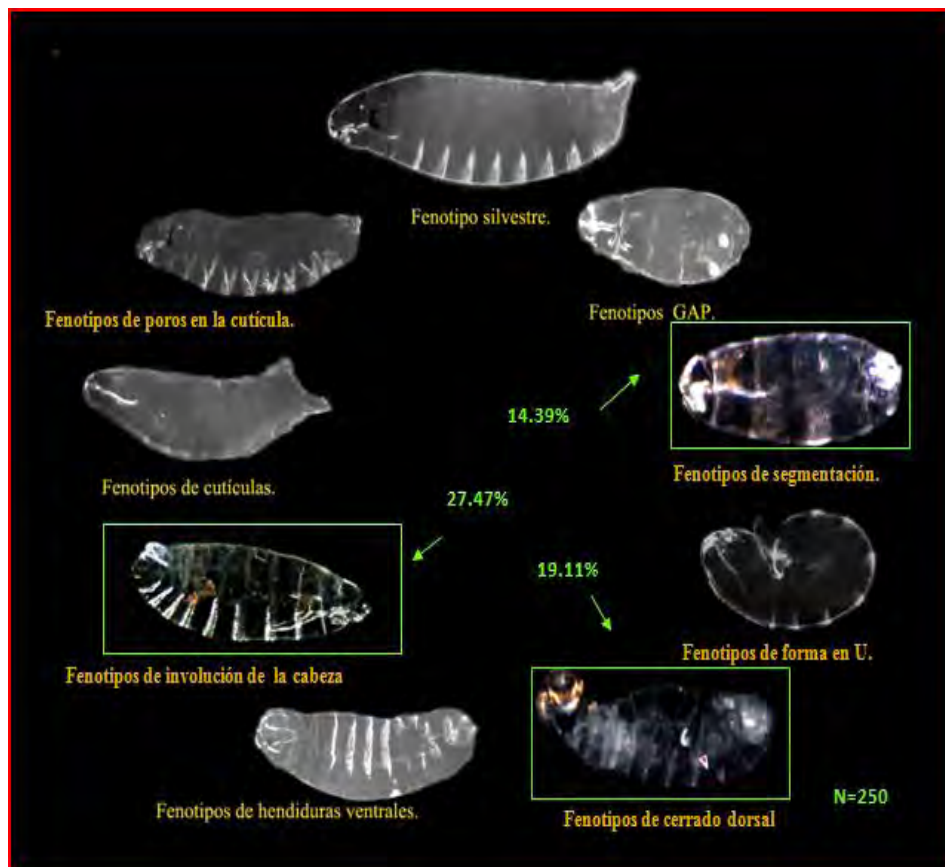


**Figura 14. Fenotipos embrionarios mutantes  $sar1^{05712}/sar1^{05712}$ .** Los embriones mutantes  $sar1^{05712}/sar1^{05712}$  presentan principalmente fenotipos en etapas finales de la embriogénesis. Los fenotipos mutantes (Gap, involución de la cabeza y cerrado dorsal) sugieren que la función de este gen interviene de manera reiterada en la embriogénesis de la mosca y que podría requerirse de manera crucial en etapas específicas. Las imágenes muestran embriones con la parte ventral orientada hacia arriba y la zona anterior a la izquierda.

Una manera de saber si los genes del complejo COP II tienen efectos sumatorios es generar individuos con mutaciones en dos o más genes de este complejo. La forma más sencilla de hacerlo es recombinando dos alelos mutantes de dos genes diferentes del complejo COP II en

un mismo cromosoma para posteriormente analizar sus fenotipos embrionarios. De la misma manera en que se generó la recombinación entre el alelo *sar1*<sup>05712</sup> y la secuencia *FRT82* se logró recombinar *sar1*<sup>05712</sup> y *sec13*<sup>01031</sup> en el cromosoma tres. Los fenotipos encontrados en los individuos dobles homocigotos *sar1*<sup>05712</sup>, *sec13*<sup>01031</sup> / *sar1*<sup>05712</sup>, *sec13*<sup>01031</sup> son semejantes a los fenotipos presentados en embriones homocigotos *sar1*<sup>05712</sup>/*sar1*<sup>05712</sup> ó *sec13*<sup>01031</sup>/*sec13*<sup>01031</sup>, por lo que no parece haber un efecto acumulativo. La mayoría de los defectos ocurren en las mismas etapas que en los individuos homocigotos *sar1*<sup>05712</sup>/*sar1*<sup>05712</sup>.

Esto en principio implica que *sec13* y *sar1* al intervenir en el mismo proceso tienen funciones igualmente críticas, también denota que actúan en el mismo complejo y que la falta de cualquiera de ellos es igualmente deletérea, ya que no se generan fenotipos más acusados o más tempranos. Los resultados generados a partir de individuos dobles homocigotos mutantes demuestran una ventaja del análisis genético que difícilmente puede lograrse en otros modelos genéticos como el pez cebra.



---

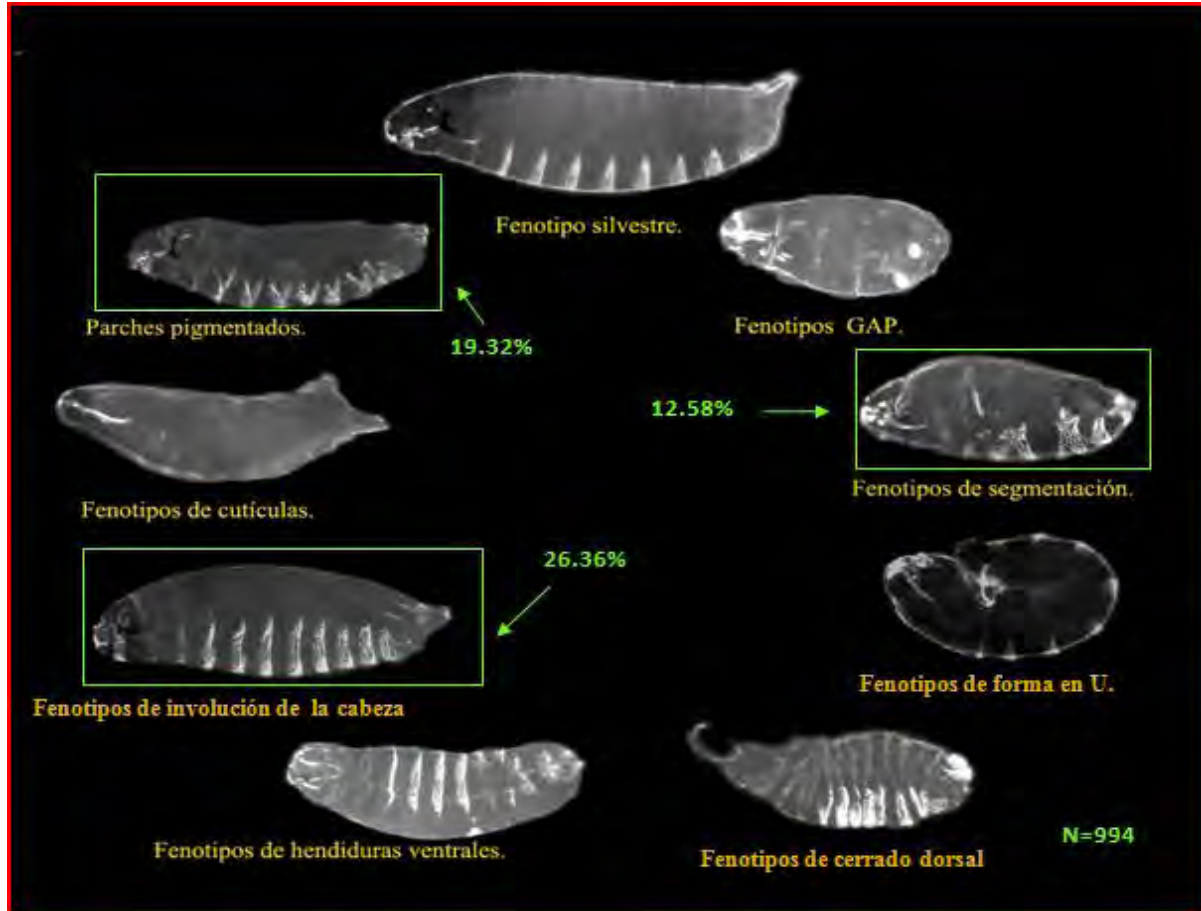
**Figura 15. Fenotipos embrionarios de mutantes  $sec13^{01031}/sec13^{01031}$ .** Los embriones mutantes  $sec13^{01031}/sec13^{01031}$  presentan fenotipos letales sobre todo en etapas intermedias de la embriogénesis (cerrado dorsal, involución de la cabeza y problemas de segmentación). En general estos fenotipos son afines a los presentados por los individuos mutantes en *sar1*.

Se analizaron los fenotipos embrionarios de  $sec23^{j13c8}/sec23^{j13c8}$  y se encontró con que son semejantes a los de  $sar1^{05712}/sar1^{05712}$  (datos no mostrados). El hecho de que los fenotipos embrionarios de estos tres mutantes ( $sec13^{01031}$ ,  $sar1^{05712}$  y  $sec23^{j13c8}$ ) sean semejantes nos permite concluir que se trata de un complejo en el que estos componentes son necesarios en igual medida.

En vista de lo anterior y dado que se cuenta con alelos mutantes  $sec24^{F05576}$  y  $sec31^{e00167}$  se elaboró un resumen de los fenotipos más frecuentes encontrados en las mutantes de todos los elementos del complejo COP II (Figura 16). Los fenotipos que aparecen en la figura 16 denotan que en general las mutaciones en proteínas del complejo COP II causan el mismo efecto y todas son indispensables para el desarrollo embrionario, este proceso que implica la formación de un organismo completo en aproximadamente 24 horas requiere sin duda de una alta eficacia del transporte intracelular. Debido a que la contribución materna juega un papel muy importante durante la embriogénesis de *Drosophila* es necesario analizar embriones que no tengan contribución de Sar1.

---

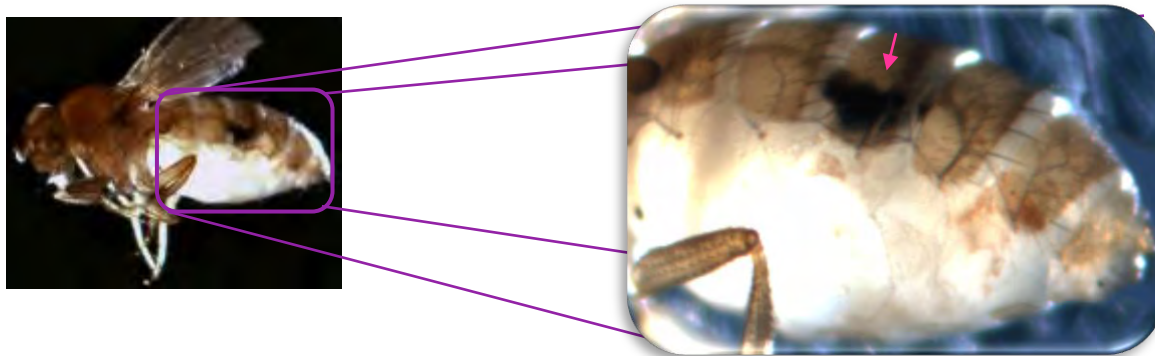
**Figura 16. Fenotipos embrionarios más frecuentes encontrados en individuos con deficiencias en las funciones de  $sar1^{05712}/sar1^{05712}$ ,  $sec13^{01031}/sec13^{01031}$ ,  $sec23^{j13c}/sec23^{j13c8}$ ,  $sec24^{F05576}/sec24^{F05576}$  y  $sec31^{e00167}/sec31^{e00167}$ .** La mayoría de los problemas observados debido a mutaciones en estos genes se presentan en los últimos estadios de la embriogénesis, en estas etapas las proteínas del complejo COP II parecen ser decisivas para cumplir con los requerimientos de desarrollo del embrión.



### 7.1.2 Sar1 es necesario durante la ovogénesis.

Para determinar la importancia de Sar1 durante la ovogénesis y durante las primeras etapas de la embriogénesis decidimos analizar embriones sin contribución materna del gen *sar1*. Para ello indujimos clones mutantes *sar1*<sup>05712</sup>/*sar1*<sup>05712</sup> en células germinales de hembras heterocigotas (*sar1*<sup>05712</sup>/*ovo*<sup>D1</sup>), de manera que los huevos que generaran estas hembras tuvieran una contribución materna deficiente de *sar1*. La mayoría de las hembras adultas que durante el tercer estadio larvario sufrieron el choque térmico para inducir la recombinación mitótica (ver Materiales y Métodos) presentaron necrosis en la región donde se ubica el aparato reproductor femenino (Figura 17). Lo que sugiere que *sar1* es necesario para algún proceso importante de la ovogénesis.





**Figura 17. Hembras adultas de la inducción de clones homocigotos  $sar1^{05712}/sar1^{05712}$  en la línea germinal.** Las hembras a las que se les indujo la recombinación mitótica por choque térmico no ponen huevos y presentan zonas necróticas en el abdomen (indicadas por la flecha) en la región donde se encuentran los ovarios. Este resultado sugiere que la expresión de Sar1 en las células germinales es vital para la ovogénesis

## 7.2 Generación de clones somáticos homocigotos $sar1^{05712}/sar1^{05712}$ por medio de *ey-flp*

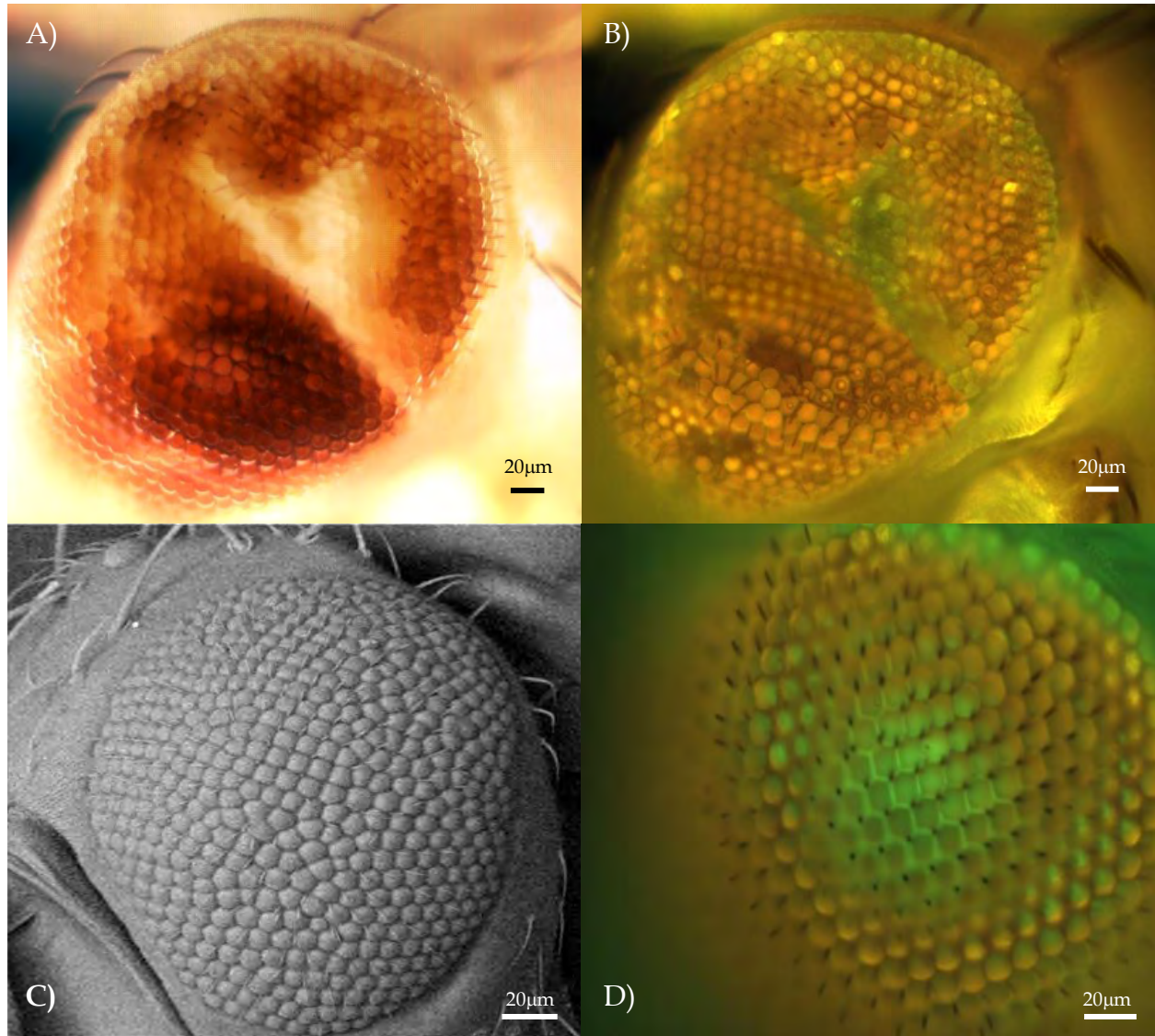
Los experimentos de clones  $sec13^{01031}$  en el ojo (Riesgo-Escovar datos no publicados) muestran que, a pesar de la relevancia de *sec13* en distintos eventos de la embriogénesis, el complejo COP II parece no ser fundamental durante todos los eventos del desarrollo de *D. melanogaster*. Por ello se decidió generar clones  $sar1^{05712}/sar1^{05712}$  en el ojo con la finalidad de definir si este gen es importante para el desarrollo de esta estructura sensorial. Otro fenómeno en donde Sar1 parece tomar un papel muy significativo es durante el transporte intracelular de Rodopsina en las células fotorreceptoras que forman parte del mismo órgano sensorial. Esta fue una razón más para estudiar lo que estaba pasando con clones  $sar1^{05712}/sar1^{05712}$ . Mediante la técnica de recombinación mitótica en el laboratorio generamos 10 líneas independientes que tienen un cromosoma con la secuencia *FRT* cercana a  $sar1^{05712}$  (ver Figura 10), gracias a esto se pueden generar eventos de recombinación mitótica que produzcan células homocigotas mutantes  $sar1^{05712}/sar1^{05712}$  por medio del sistema *FLP/FRT*.

### 7.2.1 Clones homocigotos $sarI^{05712}/sarI^{05712}$ y $arm-lacZ/arm-lacZ$ usando $ey-flp$ .

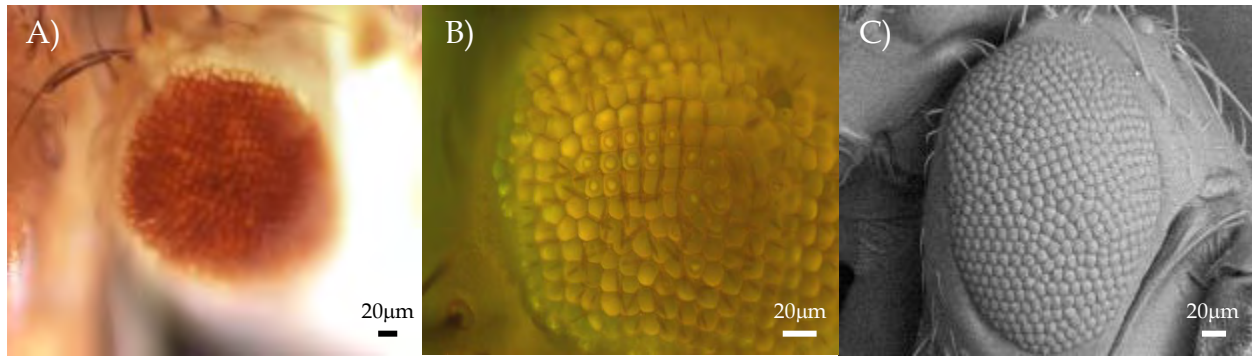
La Flipasa (Flp) que utilizamos para este experimento se expresa bajo el promotor del gen *eyeless* (*ey*), debido a que este gen se expresa primordialmente en el disco imagal del ojo y antena la recombinación mitótica se llevará a cabo en células que formarán parte de la estructura del ojo y de la cabeza durante la metamorfosis de la mosca (omatidios y quetas mecanorreceptoras), generando principalmente dos grupos diferentes de células;  $sarI^{05712}/sarI^{05712}$  y  $arm-lacZ, w^+/arm-lacZ, w^+$ .

Aquellas zonas en el ojo que expresen el gen *white* silvestre ( $w^+$ ) se podrán distinguir debido a que presentarán una pigmentación roja ( $arm-lacZ, w^+/arm-lacZ, w^+$ ) a diferencia de las zonas donde se desarrollen células homocigotas  $sarI^{05712}/sarI^{05712}$ . Si utilizamos la línea  $y^-, w^-/y^-, w^-$ ,  $ey-flp$ ;  $FRT82, sarI^{05712}/TM_3, Sb, Ser$  de ojos blancos (Figura 10) para generar clonas en el ojo obtendremos el fenotipo antes mencionado (Figura 18). Las zonas formadas por células  $sarI^{05712}/sarI^{05712}$  se siguen desarrollando y forman omatidios (Figuras 18A, B, C) a pesar de que estas estructuras presentan un arreglo distinto al de un ojo silvestre (Figura 18D).

Si se generan clonas con cualquiera de las nueve líneas restantes  $y^-, w^-/y^-, w^-$ ,  $ey-flp$ ;  $FRT82, sarI^{05712}, arm-lacZ, w^+/TM_3, Sb, Ser$  (Figura 10) no es posible distinguir entre los dos tipos de células ( $arm-lacZ, w^+/arm-lacZ, w^+$  ó  $sarI^{05712}, arm-lacZ, w^+/sarI^{05712}, arm-lacZ, w^+$ ) ya que ambos grupos expresan el gen  $w^+$  (Figura 19). Sin embargo el desarreglo de los omatidios es semejante a los generados por la línea  $y^-, w^-/y^-, w^-$ ,  $ey-flp$ ;  $FRT82, sarI^{05712}/TM_3, Sb, Ser$  de ojos blancos.



**Figura 18. Clonas homocigotas  $sar1^{05712}/sar1^{05712}$  en el ojo.** Se obtuvieron mosaicos genéticos en el disco imagal de ojo induciendo la expresión del promotor del gen *eyeless* (*ey*) que controla la expresión de la Flipasa. Esta lleva a cabo la recombinación en las zonas donde esté presente la secuencia *FRT*. A, B y C son el mismo ojo y todas las imágenes muestran el ojo izquierdo de moscas adultas con la parte anterior orientada a la izquierda. **A)** Las regiones homocigotas  $sar1^{05712}/sar1^{05712}$  están marcadas por la ausencia de pigmento (*w*). Fotografía tomada en microscopio óptico compuesto. **B)** En este panel se observan claramente los omatidios en regiones mutantes  $sar1^{05712}/sar1^{05712}$  (zonas verde-amarillas). Fotografía tomada en microscopio óptico compuesto. Las figuras 18B, 18D y 19B se iluminaron con luz de  $\lambda = 425\text{nm}$  aprox. con la finalidad de distinguir la forma de los omatidios. **C)** El desorden de los omatidios es una característica constante que se observa en la región central del ojo. Fotografía tomada con microscopio electrónico de barrido. **D)** Ojo de una mosca silvestre que presenta un arreglo normal de omatidios. Fotografía en microscopio óptico compuesto.

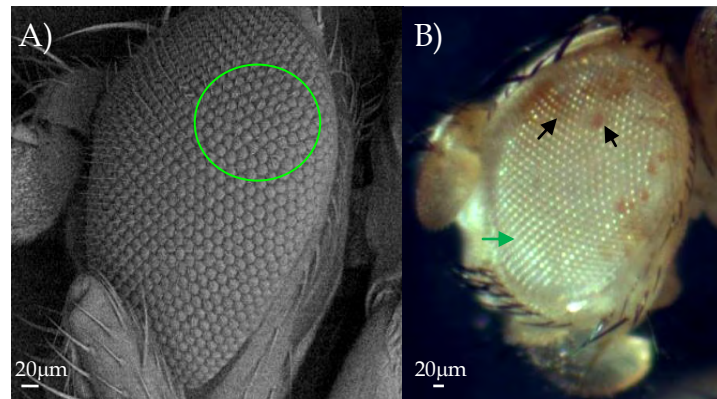


**Figura 19. Los ojos adultos con clonas homocigotas  $sar1^{05712}/sar1^{05712}$  presentan un desarreglo de omatidios.** Este fenotipo se presenta en las 9 líneas que se generaron. Las células que componen estos ojos con distintos genotipos; células homocigotas  $sar1^{05712}, w^+/sar1^{05712}, w^+$ ; células homocigotas  $arm-lacZ, w^+/arm-lacZ, w^+$  (silvestres para  $sar1$ ) y probablemente células heterocigotas  $sar1, w^+/arm-lacZ, w^+$  no pueden ser distinguidas. Sólo una línea puede generar fenotipos distinguibles (Figura 18). Todas las imágenes muestran el ojo derecho de moscas adultas con la parte anterior orientada a la derecha. **A)** En esta fotografía en microscopio óptico compuesto de un ojo donde hay clonas homocigotas  $sar1^{05712}, w^+/sar1^{05712}, w^+$ ; se muestran claramente diversas zonas irregulares. Sin embargo los grupos de clonas  $sar1^{05712}, w^+/sar1^{05712}, w^+$ ; no se pueden diferenciar de las  $arm-lacZ, w^+/arm-lacZ, w^+$  debido a que ambas son  $w^+$ . **B)** El fenotipo en omatidios irregulares es evidente si se compara con el control en la Figura 18D (Fotografía tomada con microscopio óptico compuesto). **C)** Este fenotipo de desarreglo es más claro en esta fotografía tomada con microscopio electrónico de barrido.

### 7.2.2 Generación de clones homocigotos $sar1^{05712}/sar1^{05712}$ y CD2/CD2 usando $hs-flp$ y $ey-flp$ .

La finalidad de este experimento fue inducir clonas  $sar1^{05712}/sar1^{05712}$  en otras regiones del cuerpo de la mosca usando otros marcadores ( $y^+, CD2$ ). El propósito de utilizar la línea  $y^-, w^+, hs-flp; FRT82, CD2, y^+$  fue para poder identificar en la cutícula la presencia de regiones homocigotas  $sar1^{05712}/sar1^{05712}$  ya que estas zonas están marcadas por la ausencia de pigmento ( $y^-$ ) y pueden ser diferenciadas de las zonas aledañas ( $CD2, y^+/CD2, y^+$ ) con un anticuerpo para CD2 y porque expresan pigmento ( $y^+$ ). Pero si utilizamos cualquiera de las líneas  $y^-, w^-/y^-, w^-, ey-flp; FRT82, sar1^{05712}, arm-lacZ, w^+/TM3, Sb, Ser$  se pueden generar clonas en el ojo de la mosca como el de la Figura 20. Esto se logra por medio de la expresión de  $ey-flp$  o bien por  $hs-flp$  si coincide la inducción de choque térmico con el momento de la división mitótica de células que forman al ojo. Bajo estas condiciones las únicas moscas que tienen un fenotipo como el de la

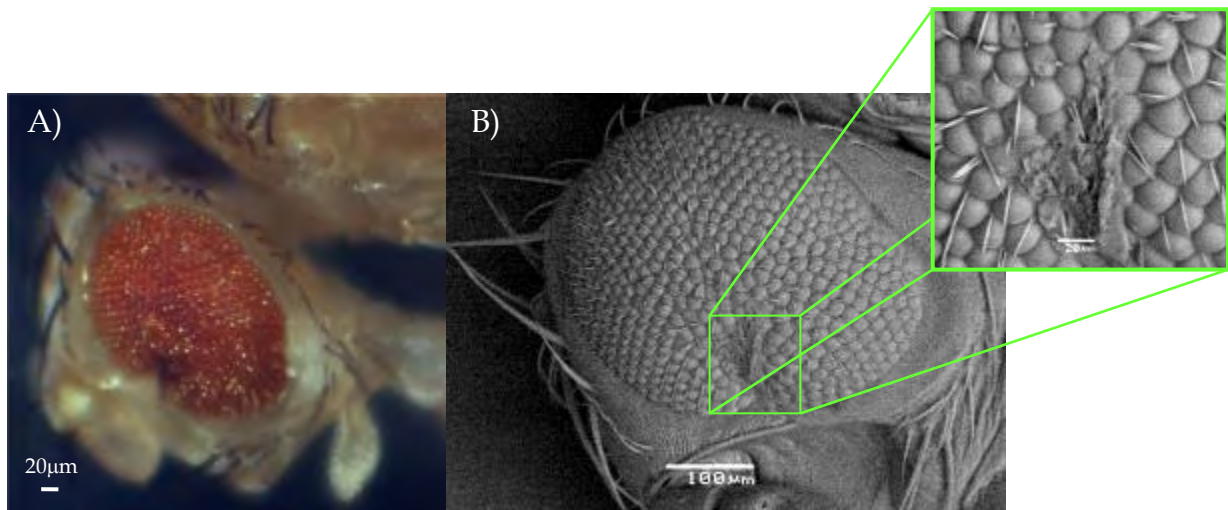
Figura 19 son los machos  $y^-$ ,  $w^-$ ,  $ey-flp$ ;  $FRT82$ ,  $sar1^{05712}$ ,  $arm-lacZ$ ,  $w^+/FRT82$ ,  $CD2$ ,  $y^+$  representados como parte de la F1 de la Figura 11. Los dos tipos de clonas que se forman en estos machos son  $sar1^{05712}$ ,  $w^+/sar1^{05712}$ ,  $w^+$  (zonas rojas) y  $CD2$ ,  $y^+/CD2$ ,  $y^+$  (zonas blancas). El fenotipo también es el de un desarreglo en los omatidios.



**Figura 20. Ojo de machos con clonas homocigotas  $sar1^{05712}/sar1^{05712}$  y clonas homocigotas  $CD2/CD2$ .** Los machos con el genotipo:  $y^-$ ,  $w^-$ ,  $ey-flp$ ;  $FRT82$ ,  $sar1^{05712}$ ,  $arm-lacZ$ ,  $w^+/FRT82$ ,  $CD2$  presentan un desarreglo parecido a los generados con el cromosoma  $FRT82$ ,  $arm-lacZ$ ,  $w^+$ . A y B son fotografías tomadas al ojo izquierdo de la misma mosca. **A)** Fotografía de escaneo con microscopio electrónico de barrido que muestran irregularidades en el arreglo de omatidios. La disposición de los omatidios varía de manera muy sutil en algunas regiones del ojo (círculo verde) **B)** Fotografía tomada con microscopio óptico compuesto donde los grupos de omatidias rojizas ( $w^+$ ) (flechas negras) corresponden a las zonas clónicas para  $sar1^{05712}/sar1^{05712}$ . Las demás zonas son los sitios de clonas de  $CD2$  que no expresan pigmento ( $w^-$ , flecha verde).

Con la intención de obtener en el tórax de moscas adultas, mosaicos de células con deficiencia de  $sar1$  ( $sar1^{05712}$ ,  $arm-lacZ$ ,  $w^+/sar1^{05712}$ ,  $arm-lacZ$ ,  $w^+$ ), se analizaron hembras adultas con clonas de células con el genotipo mencionado, al igual que clonas de células  $CD2$ ,  $y^+/CD2$ ,  $y^+$  (seguir esquema de cruces de la Figura 11). La intención de esto fue distinguir cada uno de los genotipos pues las zonas con clones de  $CD2$  expresan el gen *yellow* ( $y^+$ ) que le confiere una pigmentación café a la cutícula mientras que las clonas de células  $sar1^{05712}/sar1^{05712}$  serían  $y^-$  lo que provocaría el fenotipo de la cutícula más claro (tonos en amarillo). Los mosaicos genéticos en estas moscas no se pudieron distinguir probablemente porque las zonas clónicas

*sar1<sup>05712</sup>/sar1<sup>05712</sup>* (*y<sup>-</sup>*) fueron demasiado pequeñas. Como las hembras de este experimento también heredaron la secuencia *ey-flp* (seguir esquema de cruces de la Figura 11) que nos permite obtener clonas mutantes en los ojos de manera similar a los experimentos anteriores, se analizaron los ojos de estos animales. Se encontraron fenotipos semejantes a los clones antes generados pero tampoco se pueden distinguir las zonas homocigotas *sar1<sup>05712</sup>/sar1<sup>05712</sup>* (Figura 21). Más adelante, en la página 54, se presentan clonas en la zona torácica.



**Figura 21. Ojo de hembras con clonas homocigotas *sar1<sup>05712</sup>/sar1<sup>05712</sup>* y clonas homocigotas para *CD2/CD2*.** A y B corresponden al ojo izquierdo de la misma mosca. Al igual que en los experimentos anteriores (Fig. 18, 19 y 20) los ojos con clonas *sar1<sup>05712</sup>/sar1<sup>05712</sup>* de este experimento presentan un fenotipo de desorganización en los omatidios. **A)** Debido a que las clonas se generaron en un fondo *w<sup>+</sup>* no se pueden distinguir las zonas homocigotas *sar1<sup>05712</sup>/sar1<sup>05712</sup>*, sin embargo es notorio el daño en la estructura del ojo en estas hembras (fotografía tomada con microscopio óptico compuesto). **B)** Se puede apreciar la duplicación de quetas y la deformación de omatidios en la zona enmarcada. También se observa desarreglo de omatidios en la mayor parte del ojo (escaneo con microscopio electrónico de barrido).

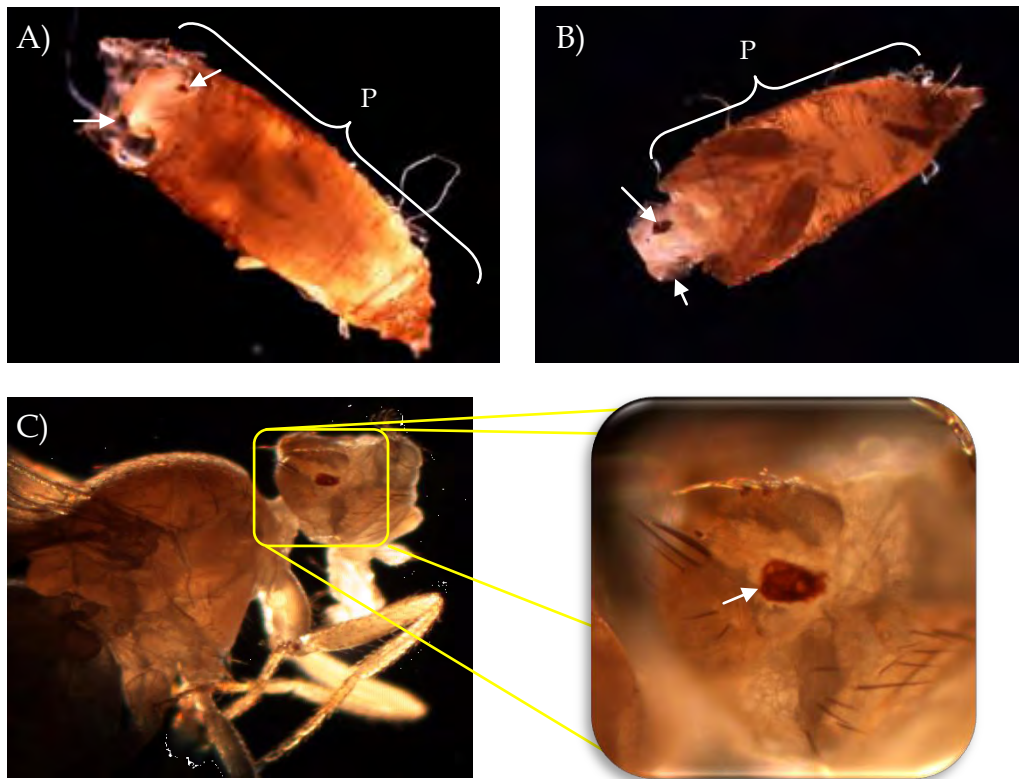
### 7.3 Generación de clones homocigotos *sar1<sup>05712</sup>/sar1<sup>05712</sup>* y *rps3/rps3*.

Si un grupo de células en proceso de diferenciación carece de elementos necesarios para un óptimo desarrollo (como lo son las proteínas COP II) y crece rodeado de un conjunto de

células con características normales (o al menos sin prescindir de estos elementos), puede involucrarse en un fenómeno de competencia en donde las primeras células no pueden cumplir con las exigencias que subyacen a la especialización celular. Todas las células durante el desarrollo emprenden su diferenciación antes de mostrar algún cambio visible y es durante este proceso que van adquiriendo un destino particular. Aquellas células que no alcanzan un desarrollo óptimo pero que ya están determinadas para cumplir una función concreta retienen valores posicionales que reflejan su localización espacial (Alberts, 2002). Las células con problemas para su desarrollo y diferenciación terminan por morir ya que se encuentran en un ambiente de competencia con células vecinas que se desarrollan adecuadamente. Estudios llevados a cabo por los científicos Johnston (2009), de la Cova *et al.*, (2004) y Tyler *et al.*, (2007) sugieren que existe una inducción por parte de estas células vecinas para que entren en apoptosis aquellas células que se encuentren con deficiencias en su desarrollo. Estas células muertas pueden seguir enviando señales de localización pero al final las células aledañas logran proliferar en estas zonas (Johnston, 2009). Todo este reacomodo puede provocar alteraciones en la estructura final del tejido donde se encuentran dichas células.

En particular el fenómeno de diferenciación y especialización que ocurre en las células que formarán el ojo de la mosca adulta puede alterarse al provocar la formación de clonas de *sarI*<sup>05712</sup>/*sarI*<sup>05712</sup> que compiten con clonas sin mutaciones en COP II (como en el caso de los mosaicos expuestos anteriormente). Para evitar el enmascaramiento ocasionado por la competencia generamos en el ojo un grupo de clonas homocigotas para *rpS3/rpS3* y otro grupo de clonas mutantes para *Sar1*. La mutante *rpS3* es letal ya que no expresa una proteína ribosomal. De esta manera aquellas células que se formen en el ojo sólo podrán ser homocigotas *sarI*<sup>05712</sup>/*sarI*<sup>05712</sup> mientras que el resto del cuerpo se mantiene heterocigoto para estas dos mutaciones (*sarI*<sup>05712</sup>/*rpS3*) (ver esquema de cruza de la página 31). Este proceso de generación de mosaicos está orquestado por el promotor del gen *ey* y por lo tanto solo se obtienen clonas en la zona ocular. De esta manera se generó un fenómeno de recombinación en donde se pudiera observar el desarrollo del ojo a partir de células en su mayoría homocigotas *sarI*<sup>05712</sup>/*sarI*<sup>05712</sup>. Encontramos tres fenotipos: a) malformaciones de quetas del ojo y omatidios (Figura 22), b) Falta de crecimiento de quetas en toda la región de la cabeza (Figura 23); fenotipo al que calificamos como “pelona” y c) displasias cefálicas, fenotipo al que nombramos “jíbaro”. El

nombre de estas últimas hace referencia a una costumbre de los Shuar (o jíbaros), un pueblo amazónico que practicaba el tzantza, técnica que consistía en la reducción y momificación de las cabezas de sus adversarios. Las moscas “jíbaros” no desarrollan del todo la parte cefálica dando la apariencia de una cabeza de jíbaro (Figura 24).

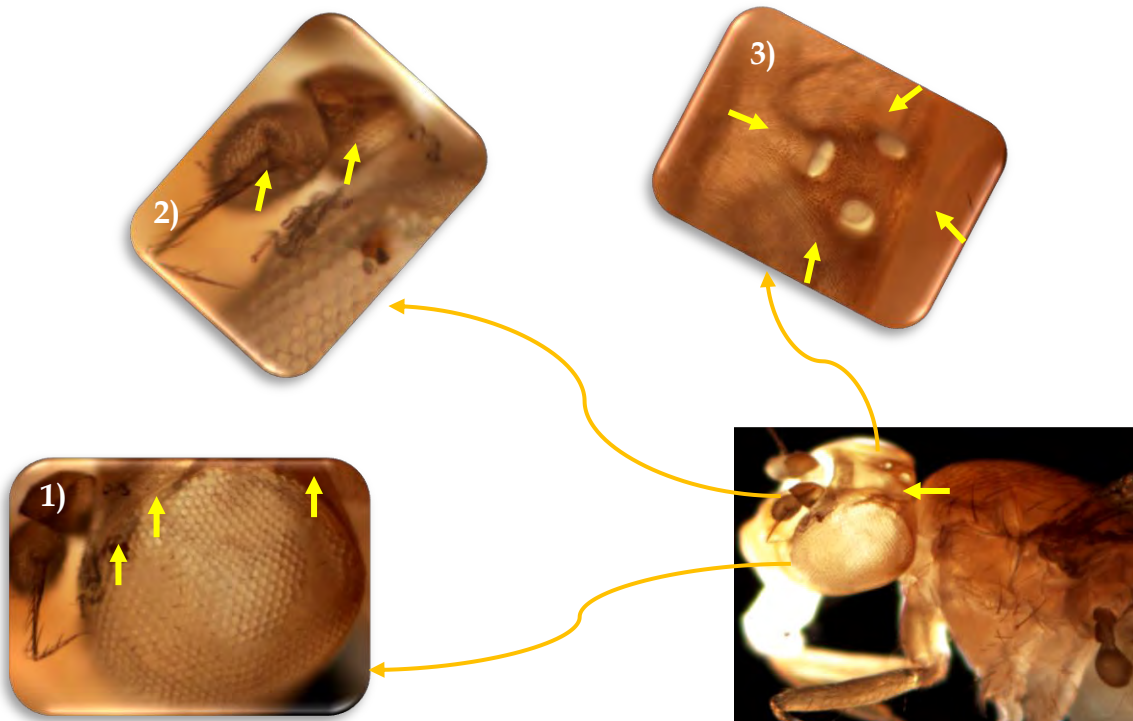


**Figura 22. Individuos con clonas homocigotas  $sarI^{05712}/sarI^{05712}$  en la región cefálica.** En general el fenotipo se caracteriza por presentar displasias sólo en la cabeza, un crecimiento anormal de quetas mecanorreceptoras, falta de formación de las aristas en las antenas y omatidios alterados (flechas). **A)** y **B)** Vistas dorsal y ventral respectivamente de una mosca en el pupario (P) con clonas homocigotas  $sarI^{05712}/sarI^{05712}$  en la región cefálica (flechas). Algunas moscas con este fenotipo tardan más en salir de sus puparios **C)** Malformaciones cefálicas. Las moscas con estas alteraciones logran sobrevivir el mismo tiempo que las moscas silvestres (vista lateral de una mosca, la parte anterior está orientada a la derecha).

Los resultados mostrados en las figuras 22 y 23 de las clonas  $sarI^{05712}/sarI^{05712}$  indican que a pesar de la mutación en este gen las células se desarrollan y forman parte de la estructura



del ojo. El fenotipo de las moscas “pelonas” evidencia la importancia del sistema de transporte intracelular. Si bien en ausencia del complejo COP II el desarrollo del ojo continúa, las quetas cefálicas no alcanzan a crecer. Esto permite comparar los ritmos de crecimiento de dos estructuras sensoriales distintas. Por una parte la formación del ojo inicia en el disco imagal del ojo y antena (un conjunto de células que darán origen a la estructura ocular y antenal), tardando en desarrollarse bajo condiciones normales cuatro días mientras que la quetas cefálicas (que en su mayoría también provienen de este disco imagal) crecen al final de la metamorfosis a un ritmo más acelerado tardando sólo 16 hrs (Tilney et al., 2004). Al igual que la embriogénesis (que dura 24 hrs) el crecimiento de las quetas tiene un periodo de formación más corto que el desarrollo de los ojos, esto implica que el transporte de proteínas y lípidos debe de ser mucho más rápido en aquellas células que darán origen al embrión y a las quetas. Estos fenómenos de crecimiento ‘acelerado’ ponen de manifiesto la importancia del complejo COP II, pero no implican que sea fundamental, pareciera ser que este complejo agiliza el transporte intracelular.

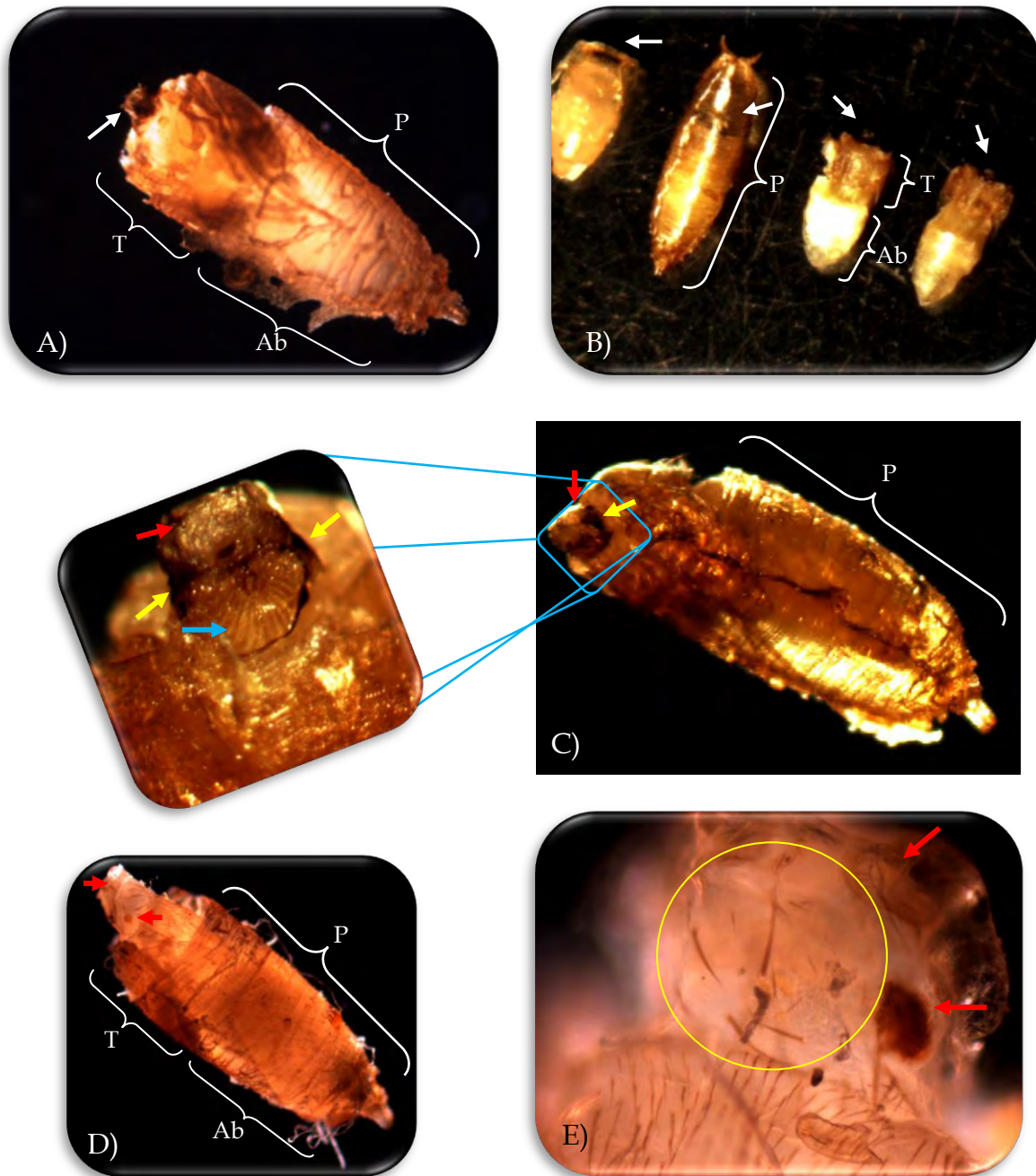


**Figura 23. Individuos con clones homocigotas  $sarI^{05712}/sarI^{05712}$  en la región cefálica. Fenotipo “pelona”.** La característica de este fenotipo es la carencia de quetas en toda la cabeza (las flechas indican las zonas

donde debería haber quetas). Aquí se observa un mosaico en donde existen dos clases de células principalmente:  $sarI^{05712}/sarI^{05712}$  ( $w^-$ ) y  $rpS3/rpS3$  que por su condición letal no se desarrollan. Las imágenes a mayor aumento muestran el ojo (1), la antena (2) y la zona postfrontal y ocelar (3) de cabezas desprovistas de quetas.

El fenotipo “jíbaro” (Figura 24) presenta malformaciones en estructuras de la zona frontal de la cabeza durante la metamorfosis (retina, quetas, antena, etc.). Como ya se analizó, en las moscas donde se generan clonas se puede presentar el caso de que la cabeza se desarrolle y la mosca sobreviva (Figura 23) pero también existe un porcentaje de moscas que mueren por presentar el fenotipo jíbaro (12.25%). Estos defectos se localizan fundamentalmente en los ojos y la parte dorsal de la cabeza, estructuras derivadas del disco imagal ojo-antena. Estas moscas logran desarrollar omatidios deformados e inclusive logran sobrevivir unas horas dentro del pupario (Figura 24C). Aproximadamente 24 hrs después de morir, la parte anterior (ojos, antenas y probóscide) se degenera quedando visible sólo la zona dorsal ennegrecida (Figura 24A). Esta condición es visible aunque se encuentren dentro del pupario (Figura 24B). Es importante señalar que los “jíbaros” sí desarrollan estructuras cefálicas pero éstas se degeneran rápidamente.

La aparición de dos fenotipos tan distintos en una misma clase genotípica ( $sarI^{05712}/sarI^{05712}$ ) como lo son las “jíbaros” y las “pelonas” probablemente está relacionado con la expresión de la Flipasa que se encarga de generar clonas en el ojo. Una mayor expresión de la Flipasa podría asegurar la ausencia de células heterocigotas de ( $sarI^{05712}/rpS3$ ) que crecen más rápido y que por lo tanto inducen la apoptosis en células homocigotas  $sarI^{05712}/sarI^{05712}$  ya que son células más débiles. Esto da como resultado malformaciones más fuertes como las observadas en las Figuras 22 y 24. Si la mayoría de las células son homocigotas  $sarI^{05712}/sarI^{05712}$ , el fenómeno de competencia descrito por Johnston (2009) no se manifiesta de manera tan marcada como en el caso de las “jíbaros” y la estructura puede desarrollarse dando un fenotipo como el de las “pelonas” (Figura 23).



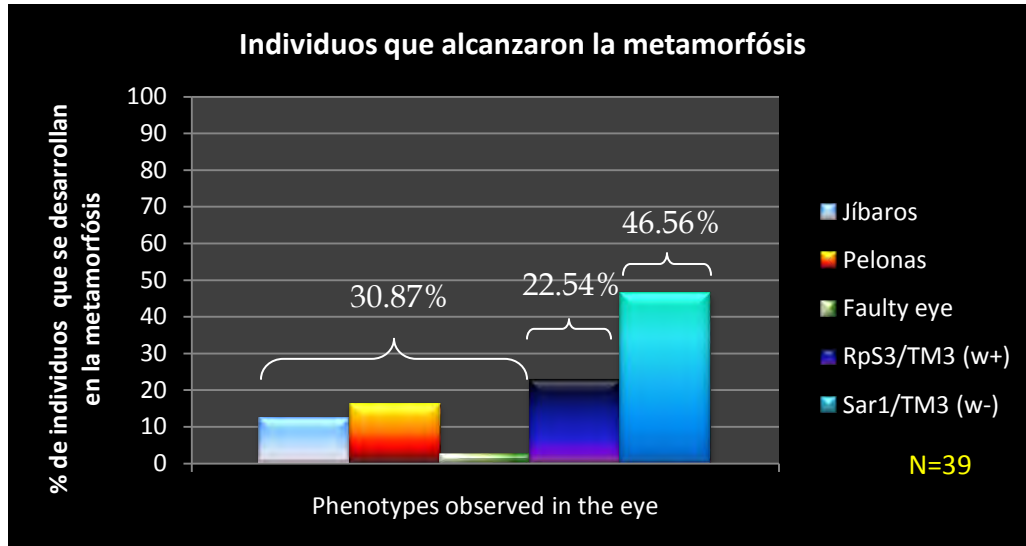
**Figura 24. Individuos con clonas homocigotas para  $sar1^{05712}/sar1^{05712}$  en la región cefálica. Fenotipo “jibaro”.** Al final de la metamorfosis se puede apreciar que la cabeza no se forma de manera regular, los principales defectos se observan en la región ocular (flechas rojas) y en la zona postgenal (flechas amarillas). De A-D las moscas se muestran dentro del pupario (P) y se puede observar que tanto el tórax (T) como el abdomen (Ab) logran desarrollarse. **A)** y **B)** muestran individuos con una metamorfosis imperfecta. Las moscas con fenotipo “jibaro” sólo presentan alteraciones visibles en la cabeza (flechas blancas). **C)** Displasias en la cabeza. Las zonas donde se generaron las clonas  $sar1^{05712}/sar1^{05712}$  (ojos y antena) también presentan defectos (flechas rojas). La probóscide que

se origina de un grupo de células distintas logra desarrollarse (flecha azul, ver recuadro amplificado); al momento de la fotografía esta mosca se encontraba con vida y se lograron filmar sus movimientos dentro del pupario. **D)** “Jíbaro” joven. Las moscas “jíbaro” alcanzan a desarrollar la parte cefálica pero no logran salir de la pupa y unas horas después la cabeza se degenera. **E)** La fotografía muestra una vista dorsal de la cabeza de un “jíbaro” antes de eclosionar extraído del pupario para apreciar los omatidios y las quetas que algunas veces se logran observar. Aproximadamente 24 h después, la zona donde se localizan los ocelos (círculo amarillo) se ennegrece junto con la porción dorsal y frontal de la cabeza (ojos y antenas) y sufren necrosis (flechas rojas)

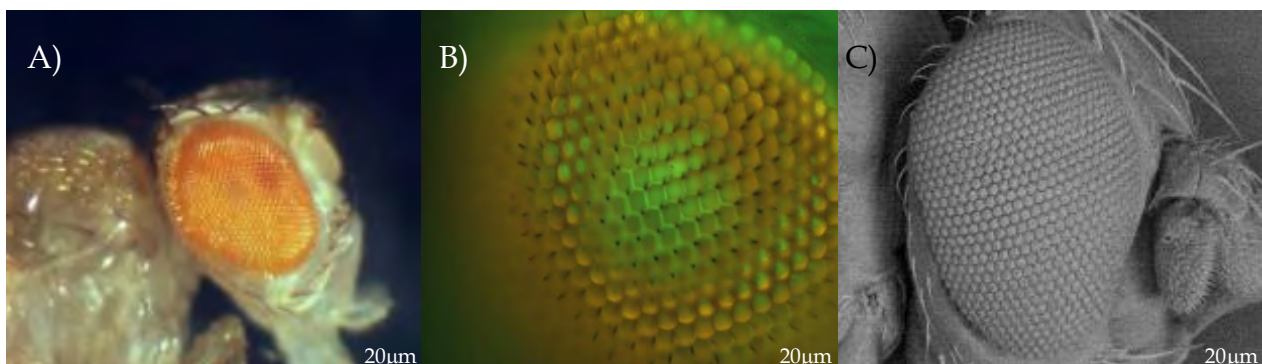
De la cruce;  $y^-, w^-, ey-flp; FRT82, rpS3, ubi-GFP/TM3$  X  $y^-, w^-, ey-flp/y^-, w^-; FRT82, sar1^{05712}/TM3$  se obtuvieron, entre otros, individuos ( $sar1^{05712}/rpS3$ ) con fenotipos mostrados en las figuras 22, 23 y 24. La gráfica de la figura 25 muestra el porcentaje de moscas que logran desarrollarse hasta la metamorfosis. La finalidad de contar estas moscas (F1 de la Figura 12) fue para analizar las causas por las que se generan dos fenotipos tan distintos (“jíbaros” y “pelonas”). La proporción entre “jíbaros” y “pelonas” puede variar dependiendo de la temperatura a la que se desarrollen (a 29°C no se forman “pelonas”, mientras que a 18°C o a 25°C la proporción entre “jíbaros” y “pelonas” es semejante). En la Figura 25 sólo se representan moscas que se desarrollaron hasta la metamorfosis a 25°C. No se representan homocigotos del balanceador *TM3* porque son letales y no alcanzan esta etapa del desarrollo. La proporción de moscas con fenotipo en los ojos respecto al total de organismos que forman pupa es aproximadamente de 1/3, lo que corresponde a lo esperado ya que sólo los individuos  $y^-, w^-, ey-flp; FRT82, rpS3, ubi-GFP/FRT82, sar1^{05712}$  son capaces de generar clonas.

---

**Figura 25. Proporción de defectos de individuos que se desarrollan hasta la etapa de faratos (metamorfosis tardía). F1 de la cruce;  $y^-, w^-, ey-flp; FRT82, rpS3, ubi-GFP/TM3$  X  $y^-, w^-, ey-flp$  ó  $y^-, w^-; FRT82, sar1^{05712}/TM3$ .** Los organismos con defectos en los ojos atribuibles a grupos de células  $sar1^{05712}/sar1^{05712}$ , representan un tercio de la población. Entre estos individuos existe variación en el grado de expresión del fenotipo, lo que posiblemente está relacionado con la cantidad de Flipasa que heredan (una o dos copias del gen *ey-flp*) y el fondo genético. La proporción de individuos  $rpS3/TM3$  es menor al tercio esperado, probablemente porque *rpS3* es una mutación *Minute* y las moscas tardan más en desarrollarse y son más débiles. En un medio donde los organismos compiten entre sí por el alimento, los organismos menos vigorosos tienden a perecer.



Para asegurarnos de que los fenotipos observados se debían a la homocigosis  $sarI^{05712}/sarI^{05712}$  en los clones y no a posibles células homocigotas con los genotipos  $rpS3/rpS3$  ó  $arm-lacZ/arm-lacZ$  que producen en los experimentos anteriores, decidimos hacer un experimento control donde se generaran clones homocigotas  $arm-lacZ/arm-lacZ$  y clones homocigotas  $rpS3/rpS3$  (Figura 26). Pudimos corroborar que cuando se da una competencia durante el desarrollo del ojo entre células homocigotas  $rpS3/rpS3$  y células que no tienen esta mutación no se genera ningún fenotipo similar al encontrado en “pelonas” o “jíbaros” (falta de quetas y displasias en la cabeza). Las células  $rpS3/rpS3$  son letales celulares, por lo que no sobreviven, y sólo se observan en el adulto clones  $arm-lacZ/arm-lacZ$ . Por lo tanto la falta de crecimiento de quetas así como las malformaciones cefálicas se deben a las células  $sarI^{05712}/sarI^{05712}$ .

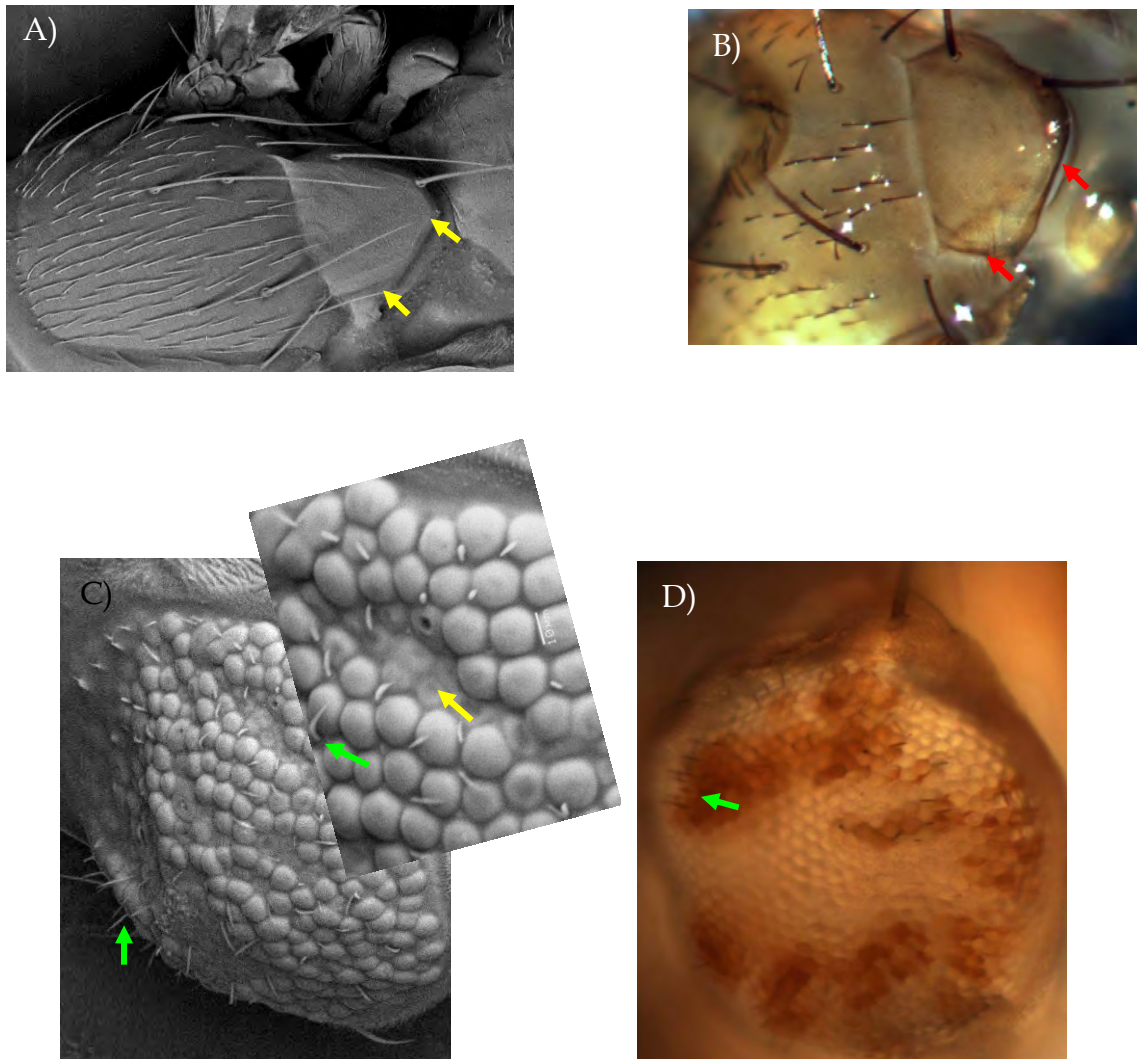


**Figura 26. Arreglo de omatidios en clonas homocigotas *arm-lacZ/arm-lacZ*.** No se observan clones homocigotos *rpS3/rpS3* debido a que esta mutación es una *Minute* y en homocigosis es letal celular. En estos individuos no existen irregularidades en la formación del ojo (A-C). El número de quetas en la cabeza es normal (A). La estructura y arreglo de los omatidios es normal (B y C). Las imágenes fueron generadas en microscopio óptica compuesto (A y B) y en microscopio electrónico de barrido (C).

#### **7.4 Fenotipo “pelona” al generar clones *sarI*<sup>05712</sup>/*sarI*<sup>05712</sup> en el tórax (*hs-flp*) y el ojo (*ey-flp*).**

La generación de clonas de línea germinal se indujo bajo el promotor *hsp70* entre el segundo y tercer estadio del desarrollo de la larva (Figura 4). La finalidad de esto fue inducir la recombinación de células germinales que se encuentran en división mitótica. Aunque esto ocurrió en las células de línea germinal también puede manifestarse en cualquier célula del organismo que se encuentre en mitosis ya que la *hs-flp* se expresa en todas las células sometidas al cambio de temperatura. Bajo este método se obtienen células susceptibles a recombinarse que generan grupos de clonas en cualquier parte del cuerpo. Fue así como descubrimos la falta de crecimiento de quetas en otras partes del organismo (datos no mostrados). Durante la inducción de clonas de línea germinal los machos que sólo heredaron la construcción *ey-flp* (seguir esquema de cruza de la Figura 13) presentaron fenotipos de falta de crecimiento de quetas en los ojos y malformación de omatidios. Las zonas homocigas *sarI*<sup>05712</sup>/*sarI*<sup>05712</sup> (*w*<sup>-</sup>) no presentan crecimiento de quetas, mientras que los territorios homocigos *ovo*<sup>D1</sup>, *w*<sup>+</sup>/*ovo*<sup>D1</sup>, *w*<sup>+</sup> sí las tienen (Figura 27 C y D).

Las clonas somáticas inducidas con la *ey-flp* nos permitieron descubrir el fenotipo “pelona” caracterizado por la falta de quetas. Buscando reproducir este fenotipo, analizamos hembras adultas que se sometieron a la inducción de clonas *sarI*<sup>05712</sup>/*sarI*<sup>05712</sup> por choque térmico. En estos individuos se buscaron regiones del cuerpo que presentaran anomalías en la formación de quetas. Encontramos alteraciones que se asemejan a los fenotipos de “pelonas” en la cabeza (falta de quetas) en lo que creemos son clonas *sarI*<sup>05712</sup>/*sarI*<sup>05712</sup> en el tórax (Figura 27 A). Sin embargo, no siempre fue posible diferenciar los territorios clonales que no expresan *yellow* (*y*, gen marcador de pigmentación) de zonas *sarI*<sup>05712</sup>/*CD2*, *y*<sup>+</sup> ó zonas *CD2*, *y*<sup>+</sup>/*CD2*, *y*<sup>+</sup> (seguir esquema de cruza de la figura 11).



**Figura 27. Clones homocigotos  $sar1^{05712}/sar1^{05712}$  inducidas por choque térmico.** A y B presentan la parte dorsal de un tórax de mosca con la parte anterior orientada a la izquierda **A) Tórax con clones  $sar1^{05712}/sar1^{05712}$  que presentan el fenotipo de falta de quetas.** Micrografía de barrido donde se observa que generalmente las quetas más largas son las que no se desarrollan (postcutelar y prescutelar indicadas con flechas amarillas) Se puede notar que estas quetas sí están presentes al otro lado del eje de simetría donde el territorio es silvestre para *sar1*. **B) Clonas en un fondo genético  $y^-$ .** Se generaron dos grupos de células; homocigotas  $sar1^{05712}/sar1^{05712}$  ( $y^-$ ) y homocigotas  $y^+/y^+$  en una mosca con fondo genético  $y^-$ . Con este marcador no se pudieron distinguir las clonas  $sar1^{05712}/sar1^{05712}$  ( $y^-$ ) (zona ausente de quetas indicada en flechas rojas) probablemente porque este grupo de células es muy pequeño. **C) y D) Mosaico de clones  $sar1^{05712}/sar1^{05712}$  con fenotipo de “pelonas”.** Las zonas homocigotas  $sar1^{05712}/sar1^{05712}$  (flechas amarillas) no presentan crecimiento de quetas a diferencia de las regiones heterocigotas  $sar1^{05712}/+$  donde sí se aprecian estas estructuras sensoriales (flechas verdes) (las imágenes

fueron tomadas al mismo ojo derecho de la mosca y se muestra la parte dorsal orientada hacia arriba mientras que la parte anterior a la derecha).

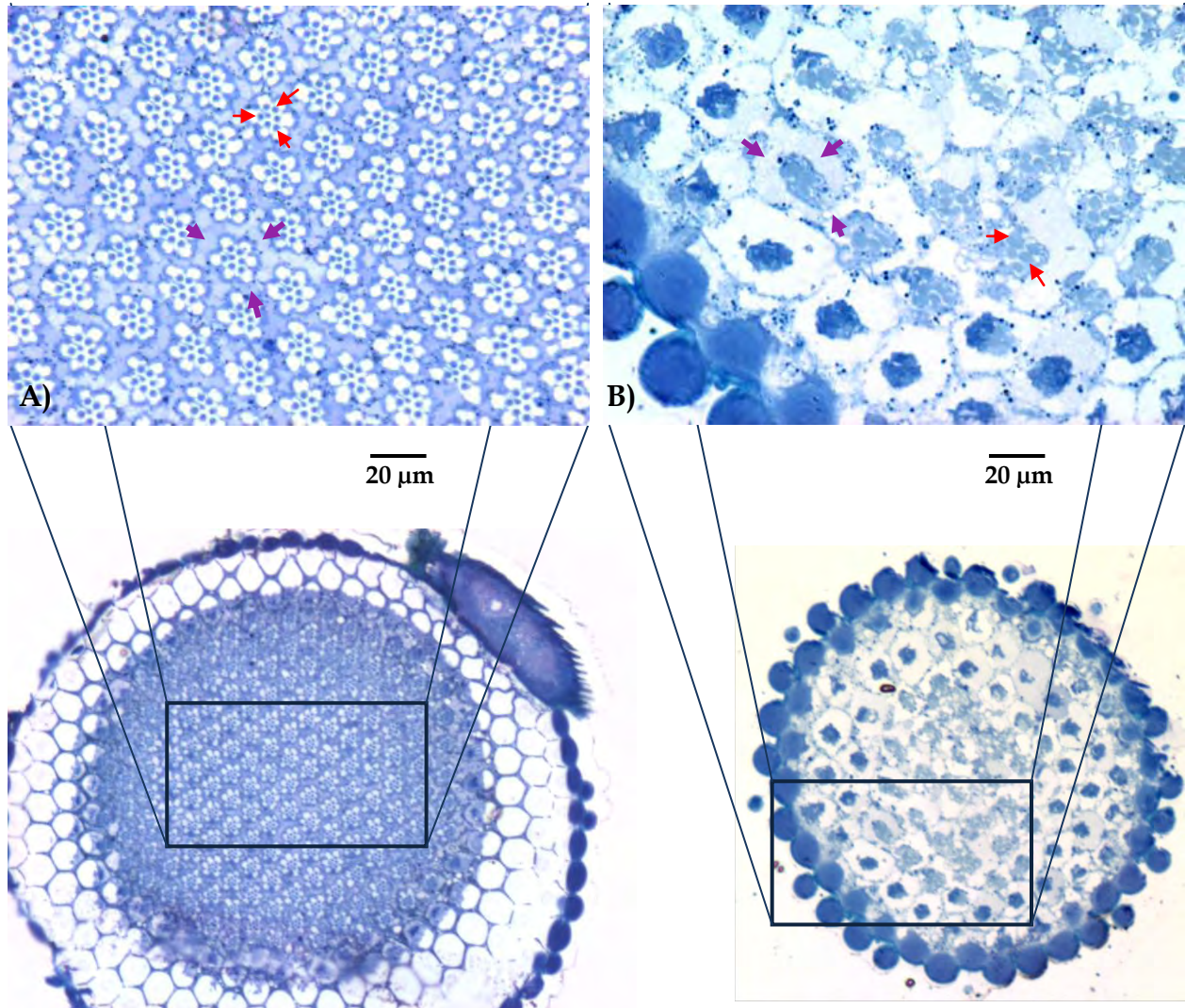
### 7.5 Cortes de ojos homocigotos *sar1<sup>05712</sup>/sar1<sup>05712</sup>*.

La mayoría de las moscas “jíbaras” no sobreviven a la metamorfosis y en algunos casos los individuos con clones *sar1<sup>05712</sup>/sar1<sup>05712</sup>* en el ojo forman toda la estructura ocular con el fenotipo “pelonas”, sin otras malformaciones visibles (Figura 23). Desconocíamos si el arreglo interno de los omatidios en estos animales estaba alterado. Debido a esto realizamos cortes histológicos de ojos de moscas “pelonas”.

Se observaron alteraciones morfológicas en la estructura de la retina de las “pelonas”, comparadas con las moscas control *yw* (Figura 28). Se aprecia que el arreglo de los omatidios es irregular, similar a lo observado en el microscopio electrónico de barrido. En general la arquitectura de los omatidios está severamente afectada, pero pese a ello se logran distinguir varias rabdómeras en cada omatidio. El número de rabdómeras (flechas rojas en la Figura 28) es menor y éstas se encuentran deformadas. Las regiones donde se ubican las células pigmentarias y las quetas son discontinuas (flechas violetas en la Figura 28). Se analizaron nueve ojos de cinco moscas “pelonas”, y todos presentaron el mismo tipo de alteraciones.

**Figura 28. Desorganización en la estructura de los omatidios de las moscas “pelonas” *sar1<sup>05712</sup>/sar1<sup>05712</sup>*. A) Ojo silvestre.** En este corte horizontal de la retina se aprecian siete células fotorreceptoras con sus respectivas rabdómeras (flechas rojas) y la zona que los rodea (flechas violetas) donde se ubican las células pigmentarias y las quetas. **B) Ojo de moscas “pelonas”.** El número de rabdómeras en los omatidios está disminuido y los espacios ocupados por las células pigmentarias y las quetas son amorfos, irregulares y amplios (flechas violetas). Corte de 0.5µm de ojos de moscas adultas observados en microscopio óptico compuesto.



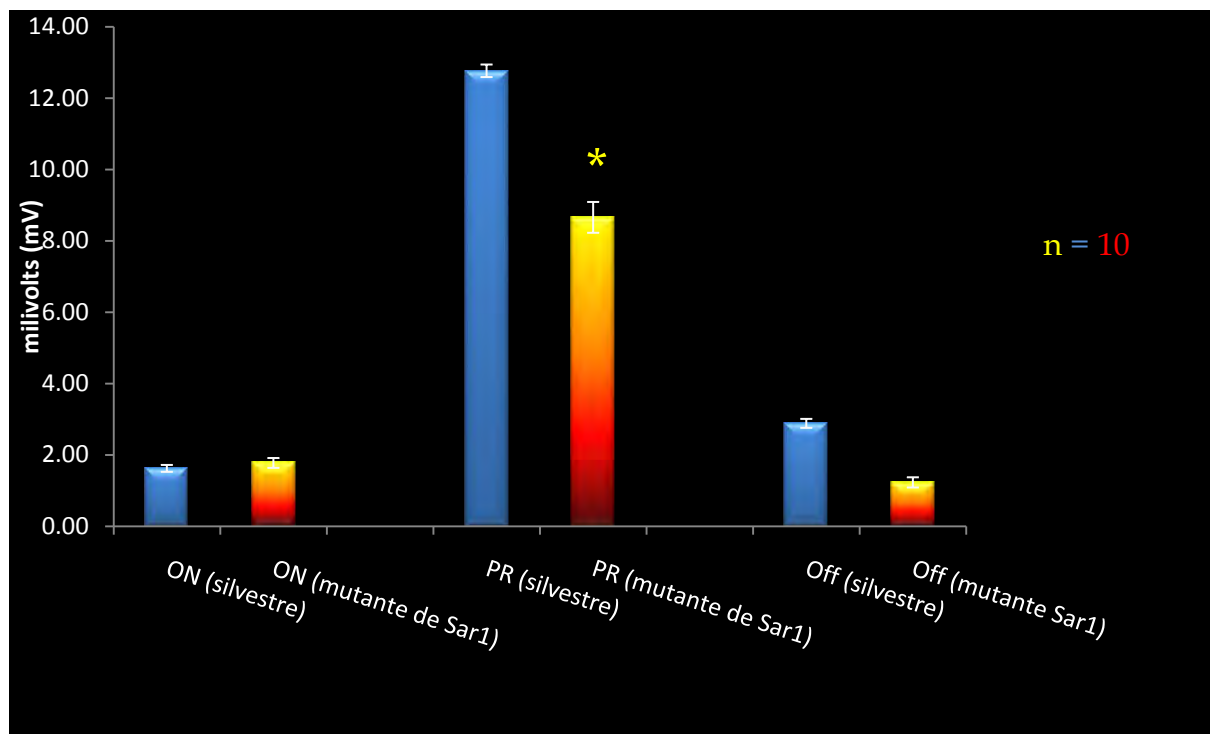


## 7.6 Electrorretinogramas.

A pesar de la falta de crecimiento de quetas y de la irregularidad estructural de los omatidios, en algunos casos los ojos de los individuos con las clonas *sar1<sup>05712</sup>/sar1<sup>05712</sup>* forman, aunque defectuosa, la estructura de la retina. Nos preguntamos entonces si esta estructura mutante era funcional. Para esto decidimos realizar registros electrofisiológicos de las células fotorreceptoras en moscas “pelonas”. La actividad de los fotorreceptores y las neuronas monopolares con las que hacen sinapsis es fácilmente detectable por medio de un electrorretinograma (Wang & Montel, 2007). Definimos dos parámetros en el registro; el primero fue el potencial del receptor (PR) que denota la actividad de la retina y el segundo la actividad

postsináptica de las células fotorreceptoras en la lámina, medida por los transitorios “ON” y “OFF”.

El parámetro en el que se obtuvo una diferencia significativa fue en el PR de las retinas de las moscas “pelonas”. El hecho de que el PR de estas moscas sea menor respecto al control sin duda se relaciona con la disminución en el número de las rabdómeras y con las alteraciones a nivel de las células fotorreceptoras. La actividad de las neuronas monopolares de las “pelonas” no presenta alteraciones ya que la respuesta en los transitorios “ON” y “OFF” fue similar al control. Cabe resaltar que a pesar del desarreglo estructural de los omatidios y de un cambio significativo en el PR de las moscas “pelonas” la retina sigue respondiendo al estímulo luminoso.



**Figura 29. Electrorretinogramas en ojos homocigotos  $sar1^{05712}/sar1^{05712}$  de moscas “pelonas”.** Los fotorreceptores mutantes (barras rojas) se activan de manera similar que los controles (barras azules), pero el potencial del receptor es menor (PR). Las células fotorreceptoras responden al estímulo luminoso a pesar de que Sar1 se encuentra mutado. Los transitorios “ON” y “OFF” son evidencia de comunicación entre fotorreceptores y neuronas del cerebro, esta comunicación no se ve alterada en las retinas mutantes de  $sar1^{05712}/sar1^{05712}$  ( $t(13)=2.16$ ,  $p<0.1$ ).

## VIII. DISCUSIÓN.

La referencia más completa que se tiene sobre el transporte mediado por COP II proviene de los estudios realizados en la levadura *S. cerevisiae*. La forma en que se abordó el estudio de las proteínas COP II fue similar a los experimentos realizados en la levadura. Al contar con mutantes para este grupo de genes (*sar1*, *sec13*, *sec23*, *sec 31* y *sec24*) logramos analizar los efectos de la falta de función en embriones de mosca. Los estudios en embriones de mosca también sugieren que si se interrumpe la función de COP II la letalidad celular es inminente probablemente debido a la obstrucción del transporte de sustancias imprescindibles para la célula (Fromme *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2004; Alberts *et al.*, 2002; Pelham y Rothman, 2000; Scales *et al.*, 1997; Presley *et al.*, 1997; Kaiser y Schekman, 1990).

Una de las ventajas que se tuvo al trabajar con la mosca de la fruta fue contar con herramientas genéticas que nos brindan una perspectiva distinta sobre este fenómeno de transporte. El primer indicio que tuvimos para revisar este paradigma de transporte surgió del análisis de la mutante *sec13*<sup>01031</sup> en nuestro laboratorio. La generación de clonas mutantes de este gen en los ojos de la mosca permitió observar que las células carentes de la proteína sobrevivían y formaban una estructura ocular similar a una silvestre. Debido a que Sec13 es una proteína que se ensambla al último en el complejo COP II centramos nuestro estudio en la GTPasa Sar1 que es fundamental para atraer a las demás proteínas y formar el sistema de transporte.

Los embriones que carecen de la proteína Sar1 se mueren antes de eclosionar. La mayoría presenta fenotipos embrionarios tardíos. Las evidencias de nuestros experimentos demuestran que durante la embriogénesis es fundamental contar con esta proteína al igual que con las otras que forman el complejo COP II. Dado que la embriogénesis de la mosca dura tan sólo 24 hrs a 25°C y que este tiempo es indispensable para la formación de las estructuras larvarias, el sistema de transporte intracelular debe de mantenerse a un ritmo de actividad muy acelerado para lograr en un día la formación completa del embrión.

Valiéndonos de la misma técnica de generación de clonas hecha con mutantes *sec13*<sup>01031</sup> (Riesgo-Escovar, datos no publicados) se encontró que la ausencia de la proteína Sar1 no causa

necesariamente letalidad en células del ojo, aunque si provoca alteraciones en el desarrollo de la estructura de este órgano y en el sistema nervioso periférico de la cabeza.

La técnica de mosaicos genéticos nos permitió revisar los efectos de la competencia celular entre dos poblaciones distintas, unas deficientes de Sar1 y otras que la expresan de manera normal. Cuando dos grupos de células destinadas a generar el mismo tejido carecen de las mismas condiciones de crecimiento se puede presentar un fenómeno de competencia, en donde las que tienen mejores condiciones de desarrollo se imponen sobre las débiles e incluso son capaces de inducir apoptosis en ellas (Johnston, 2009). Esto se interpretó durante la formación del ojo, cuando se provocó la génesis de grupos de células homocigotas *sar1<sup>07512</sup>/sar1<sup>07512</sup>* que se desarrollaban a la par de clonas de células silvestres. En general la anatomía del ojo bajo esta condición es anormal, los omatidios (unidades estructurales del órgano de la visión) y las quetas en el ojo (estructuras mecanorreceptoras) tienen un arreglo atípico en las zonas con clonas *sar1<sup>07512</sup>/sar1<sup>07512</sup>*. Este fenotipo probablemente se debe a que las células sin alteración genética proliferan más que las homocigotas *sar1<sup>07512</sup>/sar1<sup>07512</sup>*. Las células alteradas no alcanzan un desarrollo óptimo dando como consecuencia malformaciones en el ojo.

Al inducir la generación de células homocigotas *sar1<sup>07512</sup>/sar1<sup>07512</sup>* libres de competencia encontramos los siguientes fenotipos: a) Displasias en omatidios y malformación de quetas en la cabeza; b) “Pelonas”. Falta de crecimiento de quetas en la cabeza y c) “Jíbaros” deformación e involución de la porción cefálica. El desarrollo de quetas (muchas de naturaleza mecanorreceptora) y la formación del ojo compuesto son parte de un proceso ontogénico distinto al de la embriogénesis que ocurre durante la metamorfosis. Esta etapa es fundamental al final del desarrollo larvario de la mosca porque generará las estructuras adultas. Este fenómeno, aunque también requiere de síntesis de proteínas de manera acelerada, en conjunto tarda más tiempo que la embriogénesis. Es por eso que interpretamos este lapso como una ventana temporal menos rígida por la cual el transporte proteico (mediado o no por Sar1) debe de actuar. Nuestros resultados muestran que si bien la formación del ojo se lleva a cabo pese a la deficiencia de Sar1, hay defectos y es común que no se formen quetas.

La falta de crecimiento de quetas en el ojo probablemente tiene que ver con la forma en que se desarrollan durante la metamorfosis y la eficacia del transporte proteico. El crecimiento de esta estructura sensorial requiere de una eficiencia temporal en el transporte mucho mayor a la que se da en toda la estructura del ojo. Para que se estructure el mecanorreceptor (o queta) se necesita de la diferenciación a partir de un grupo de células precursoras neuronales que formarán cuatro tipos celulares principalmente; neurona, célula glial, célula tricógena y célula tormógena (Alberts *et al.*, 2002). Las células tormógenas rodean a los tres tipos restantes y ayudan en la secreción de cutícula que cubrirá a las células tricógenas. Estas últimas células se prolongarán por encima de la superficie epidermal alcanzando longitudes de varios milímetros de largo. Al final estas células tricógenas también necesitarán secretar componentes de la cutícula para proteger sus membranas (Borst, 2009; Richard *et al.*, 2006). Todos estos procesos de secreción son fundamentales para el desarrollo de esta estructura sensorial y cada uno de ellos necesita del transporte intracelular (Wang & Montell, 2007). El fenómeno de diferenciación de la queta sólo toma dos días pero el alargamiento de las células tricógenas se lleva a cabo en tan sólo 18 hrs casi al final de la metamorfosis, lo que representa una enorme tarea de transporte de moléculas en un periodo muy corto. Siendo particularmente sensible a la falta de componentes del complejo COP II.

Cuando analizamos clonas *sarI*<sup>07512</sup>/*sarI*<sup>07512</sup> en el tórax buscando repetir el mismo fenotipo de falta de crecimiento de quetas encontramos que efectivamente no se generan estas estructuras sensoriales en algunas partes del cuerpo, generalmente en la zona del escutelo donde siempre faltan una o dos quetas. Estas zonas no pudieron ser marcadas adecuadamente porque probablemente las células que forman estas regiones no son muy numerosas. Para corroborar los resultados encontrados en el ojo, sería más adecuado un análisis con cortes histológicos de estas regiones torácicas.

Debido a los resultados anteriores una parte importante de la tesis se concentró en demostrar que las células homocigotas *sarI*<sup>07512</sup>/*sarI*<sup>07512</sup> en el ojo eran capaces de realizar transporte intracelular. Como las células fotorreceptoras transportan constantemente rodopsina del RE a la rabadómera decidimos analizar la reacción de éstas a la luz ya que la rodopsina necesita ser transportada a esta estructura membranal para que se lleve a cabo la fototransducción

(Borst, 2009; Wang & Montell, 2007). Hicimos cortes histológicos del ojo de “pelonas” para analizar la estructura interna de los omatidios. Encontramos malformaciones y menor número de rabdómeras. A pesar de encontrar serias alteraciones en el arreglo de las rabdómeras varias lograban desarrollarse.

Cuando realizamos los electrorretinogramas en moscas “pelonas” observamos que existe una actividad similar a los controles. La rodopsina es una de las proteínas necesarias para que los fotorreceptores respondan a la luz. Esta proteína requiere del transporte intracelular para llegar a la rabdómera, y tiene una vida media de tres horas, por lo que es necesario que se transporte constantemente para cumplir con su función (Wang & Montell, 2007). Si los ojos mutantes de *Sar1* son capaces de responder a la luz implicaría que la rodopsina sigue transportándose a la rabdómera de las células fotorreceptoras a pesar de la ausencia de esta proteína. Lo anterior implica que el transporte intracelular ocurre a pesar de la mutación en *sar1*. Por otra parte, la rodopsina es aproximadamente el 50% de toda la proteína de los fotorreceptores (Alberts, 2002), así que esto implicaría un nivel de transporte, que si bien no es normal en estas mutantes, es sustancial.

Como se describió en los antecedentes de esta tesis los efectos que pueden surgir cuando se altera el sistema de transporte pueden ocasionar alteraciones a distintos niveles puesto que este complejo moviliza desde proteínas transmembranales hasta moléculas señalizadoras que serán vertidas al espacio extracelular. Por lo tanto, aún cuando nos enfoquemos en el problema del transporte de la rodopsina a la membrana, no debemos olvidar que existen muchas otras proteínas que no llegan a su destino membranal o extracelular adecuadamente. Es evidente que si alteramos el sistema de transporte intracelular las consecuencias de ello pueden ser muy diversas y determinantes. A pesar de todo esto y de los diversos requerimientos de transporte de todo tipo de proteínas para la formación y manutención de las células fotorreceptoras, éstas logran desarrollarse y logran responder al estímulo luminoso. Por lo tanto, el transporte intracelular, en general., se lleva a cabo en estas células, aunque de manera defectuosa.

Es un hecho que durante la ovogénesis el complejo COP II es fundamental. Cuando quisimos desarrollar ovocitos mutantes de *sar1* se encontró que no se podían desarrollar. Estas

hembras no pueden poner huevos. Un análisis más detallado de los órganos reproductores de estas hembras podría darnos más pistas sobre lo que ocurre con las células germinales *sarI<sup>07512</sup>/sarI<sup>07512</sup>*. Sin embargo, es plausible pensar que la ovogénesis, con las necesidades apremiantes de síntesis y transporte de proteínas en tiempos muy cortos, pudiera representar un caso semejante al del desarrollo de las quetas, en donde un transporte defectuoso fuera incompatible con la viabilidad de la estructura.

Los avances en el estudio de esta proteína nos permiten concluir que no es vital para la formación del ojo y la fototransducción en la mosca. El complejo COP II se requiere para agilizar el transporte intracelular pero no es indispensable en todos los casos como se analizó en esta tesis. Planteamos entonces que durante el periodo de formación de las quetas (18hrs) o del embrión (24hrs) se necesita incrementar el transporte intracelular debido al ritmo de crecimiento tan rápido al que están sujetos estos fenómenos. Pero no ocurre lo mismo durante el desarrollo del ojo (cinco días aproximadamente). La variación de fenotipos observados en las Figuras 21, 22 y 23 (clonas de *sarI<sup>07512</sup>/sarI<sup>07512</sup>* en el ojo) refleja la importancia que tiene el fenómeno de competencia descrita por Johnston (2009) ya que cuando se expresa más la Flipasa (enzima encargada de la generación de clonas) se producen en mayor cantidad grupos de células mutantes que al estar libres de competencia pueden estructurar toda la cabeza (“pelonas”). Indagar más sobre el papel del complejo COP II en el transporte, nos permitirá elucidar de manera más precisa como las células llevan a cabo el transporte intracelular de proteínas y lípidos.

## IX. CONCLUSIÓN.

Las mutantes del gen *sar1* presentan letalidad embrionaria. Sin embargo, cuando se induce la generación de células homocigotas *sar1*<sup>05712</sup>/*sar1*<sup>05712</sup> en el ojo, un porcentaje de estas logran sobrevivir y son capaces de llevar a cabo diversas funciones como el fenómeno de la fototransducción. La participación de Sar1 en fenómenos del desarrollo como el crecimiento de quetas, la formación de omatidios, la embriogénesis y la ovogénesis es importante. Cada uno de estos procesos probablemente requiere de un nivel de transporte distinto. Este requerimiento parece estar en función del tiempo que se ocupa para formar dichas estructuras.



## X. REFERENCIAS.

- Adams, M. D.; Celniker, S.; Holt, R.; Evans, C.; Gocayne, J.; Amanatides, P.; Scherer, S.; Li, P.; Hoskins, R.; Galle, R.; *et al.* 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*. **287**: 2185-2195.
- Alberts, B.; Jonson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. & Walter, P. 2002. Cell Communication. *Molecular Biology of the Cell*. (p. 831-906) USA: Garland Science.
- Arakawa, K.; Abe, M.; Noda, Y.; Adachi, H. & Yoda, K. 2006. Molecular cloning and characterization of a *Pichia pastoris* ortholog of the yeast Golgi GDP-mannose transporter gene. *Gen. Appl. Microbiol.* **52**: 137-145.
- Aridor, M.; Fish, K.; Bannykh, S.; Weissman, J.; Roberts, T. *et al.* 2001. The Sar1 GTPase coordinates biosynthetic cargo selection with endoplasmic reticulum export site assembly. *J. Cell Biol.* **152**: 213-229.
- Ayer, R. K. & Carlson, J. 1991. *acj6*: a gene affecting olfactory physiology and behavior in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**: 5467-5471.
- Barlowe, C. 2003. Signals for COP II-dependent export from the ER: what's the ticket out? *Trends Cell Biol.* **13**: 295-300.
- Borst, A. 2009. *Drosophila's* view on insect vision. *Current Biology.* **19**: 36-47
- Campos-Ortega, J. A. & Hartenstein, V. 1997. A summary of *Drosophila* Embryogenesis. The Embryonic development of *Drosophila melanogaster*. (p. 1-8) Alemania: Springer Verlag.
- Chou, T. & Perrimon, N. 1996. The autosomal FLP-DFS technique for generating germline mosaics in *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* **144**: 1673-1679.
- Cooley, L.; Kelley, R. & Spradling, A. 1988. Insertional mutagenesis of the *Drosophila* genome with single P elements. *Science.* **239**: 1121-1128.
- de la Cova, C.; Abril, M.; Bellosta, P.; Gallant, P. & Johnston, L. 2004. *Drosophila myc* regulates organ size by inducing cell competition. *Cell.* **117**: 107-116.
- Fromme, J.; Orci, L. & Schekman, R. 2008. Coordination of COP II vesicle trafficking by Sec23. *Trends Cell Biol.* **18**: 330-336.
- Hartenstein, V. 1993. Atlas of *Drosophila* development. (pp. 1558) USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Johnston, L. A. 2009. Competitive interactions between cells: death, growth and geography. *Science Review*. **324**: 1679-1682.
- Kaiser, C. A.; Schekman, R. 1990. Distinct sets of SEC genes govern transport vesicle formation and fusion early in the secretory pathway. *Cell*. **61**: 723-733.
- Konikoff, C.; McCutchan, M.; Van Emdem, B.; Busik, C.; Davis, K.; Ji, S.; Wu, L.; Ramos, H.; Brody, T.; Panchanatan, S.; Ye, J.; Karr, T.; Newfeld, S. & Kumar, S. 2009 (en prensa) FlyExpress: A platform for discovering co-expressed genes via comparative image analysis of spatial patterns in *Drosophila* embryogenesis.
- LaPointe, P. & Balch, W. 2005. Purification and properties of mammalian Sec23/24 from insect cells. *Methods in Enzymology*. **404**: 66-74.
- Lee, M. C.; Miller, E.; Goldberg, J.; Orci, L. & Schekman, R. 2004. Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. *Cell Dev. Biol*. **20**: 87-123.
- Liao, G.; Rehm, E. & Rubin, G. 2000. Insertion site preferences of the *P* transposable element in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. **97**: 3347-3351.
- Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky, L.; Matsudaira, P.; Baltimore, D. & Darnell, J. 2004. *Molecular Cell Biology*. (pp. 971) España: Médica panamericana.
- Luque, C. J. & Herráez, S. 2002. *Biología molecular e ingeniería genética*. (pp. 469) España: Elsevier Science.
- Matsuoka, K.; Orci, L.; Amherdt, M.; Bednarek, S.; Hamamoto, S.; Schekman, R. & Yeung, T. 1998. COP II-coated vesicle formation reconstituted with purified coat proteins and chemically defined liposomes. *Cell*. **93**: 263-275.
- Merte, J.; Jensen, D.; Wright, K.; Sarsfield, S.; Wang, Y.; Schekman, R. y Ginty, D. 2010. Sec24b selectively sorts Vangl2 to regulate planar cell polarity during neural tube closure. *Nat. Cell. Biol*. **12**: 1-8.
- Newsome, T.; Asling, B. & Dickson, B. 2000. Analysis of *Drosophila* photoreceptor axon guidance in eye-specific mosaics. *Development*. **127**: 851-860.
- Nishimura, N. & Balch, W. 1997. A di-acidic signal required for selective export from the endoplasmic reticulum. *Science*. **277**:556-558.
- Pelham, H. R. & Rothman, J. 2000. The debate about transport in the Golgi-Two sides of the same coin? *Cell*. **102**: 713-719.

- Presley, J. F.; Cole, N.; Schroer, T.; Hirschberg, K.; Zaal, K. & Lippincott-Schwartz, J. 1997. ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature*. **389**: 81-85.
- Richard, M.; Grawe, F. & Knust, E. 2006. *DPATJ* plays a role in retinal morphogenesis and protects against light-dependent degeneration of photoreceptor cells in the *Drosophila* eye. *Dev. Dynamics*. **235**: 895-907.
- Rorth, P. 1996. A modular misexpression screen in *Drosophila* detecting tissue-specific phenotypes. *Genetics*. **93**: 12418-12422.
- Rubin, G. 1988. *Drosophila melanogaster* as an experimental organism. *Science* **240**: 1453-1459.
- Scales, S. J.; Pepperkok, R. & Kreis, T. 1997. Visualization of ER-to-Golgi transport in living cells reveals a sequential mode of action for COP II and COP I. *Cell*. **90**: 1137-1148.
- Schwarz, K.; Lolascón, A.; Verissimo, F.; Trede, N.; Horsley, W.; Chen, W.; Paw, B.; Hopfner, K.; Holzmann, K.; Russo, R.; Esposito, M.; Spano, D.; De Falco, L.; Heinrich, K.; Joggerst, B.; Rojewsky, M.; Perrotta, S.; Denecke, J.; Pannicke, U.; Delaunay, J. Pepperkok, R. & Heimpel, H. 2009. Mutations affecting the secretory COP II coat component SEC23B cause congenital dyserythropoietic anemia type II. *Nature*. **41**: 936-940.
- Spradling, A. C.; Stern, D.; Hiss, I.; Roote, J.; Lavery, T. & Rubin, G. 1995. Gene disruption using P transposable elements: An integral component of the *Drosophila* genome project. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **92**: 10824-10830.
- Sullivan, W.; Ashburner, M. & Hawley, R. 2000. *Drosophila* protocols. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2000. Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp. 697.
- Tyler, D.; Li, W.; Zhuo, N.; Pellock, B. & Baker, N. 2007. Genes affecting cell competition in *Drosophila*. *Genetics*. **175**: 643-657.
- Tilney, L. G.; Connelly, P. & Guild, G. 2004. Microvilli appear to represent the first step in actin bundle formation in *Drosophila* bristles. *J. Cell. Sci.* **117**: 3531-3538.
- Townley, A. K.; Feng, Y.; Schmidt, K.; Carter, D.; Porter, R.; Verkade, P. & Stephens, D. 2008. Efficient coupling of Sec23-Sec24 to Sec13-Sec31 drives COP II-dependent collagen secretion and is essential for normal craniofacial development. *J. Cell. Sci.* **121**: 3025-3034.
- Wang, T. & Montell, C. 2007. Phototransduction and retinal degeneration in *Drosophila*. *Eur. J. Physiol.* **454**: 821-847.

- Weigman, K.; Klapper, R.; Strasser, T.; Rickert, C.; Technau, G.; Jäckle, H.; Janning, W. & Klämbt, C. (en prensa). FlyMove: a new way to look at development of *Drosophila*. Trends Genet.
- Weissman, J. T.; Plutner, H. & Balch, W. 2001. The mammalian guanine nucleotide exchange factor mSec12 is essential for activation of the Sar1 GTPase directing endoplasmic reticulum export. Traffic **2**: 465-475.
- Xu, T. & Rubin G. 1993. Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. Development. **117**; 1223-1237.
- Ye, B.; Zhang, Y.; Song, W.; Younger, S.; Jan, L. & Jan, Y. 2007. Growing dendrites and axons differ in their reliance on the secretory pathway. Cell. **130**: 717-729.
- Yi, P.; Han, Z.; Li, X. & Olson, E. 2006. The mevalonate pathway controls heart formation in *Drosophila* by isoprenylation of Gγ1. Science. **313**: 1301-1303.
- Yoshihisa, T.; Barlowe, C. & Schekman, R. 1993. Requirement for a GTPase-activating protein in vesicle budding from the endoplasmic reticulum. Science **259**: 1466–1468.
- Zhu, M.; Wilson, R. & Leptin, M. 2005. A screen for genes that influence Fibroblast Growth Factor signal transduction in *Drosophila*. Genetics. **170**: 767-777.

## XI. ÍNDICE DE FIGURAS.

	Página
<b>Figura 1.</b> Modelo clásico de la vía de secreción entre el RE y el aparato de Golgi	5
<b>Figura 2.</b> Transporte vesicular mediado por COP II	9
<b>Figura 3.</b> Transporte vesicular en la vía de transporte intracelular	11
<b>Figura 4.</b> Ciclo de vida de <i>D. melanogaster</i>	12
<b>Figura 5.</b> Creación de células mutantes inducida por recombinación somática	14
<b>Figura 6.</b> Hibridación <i>in situ</i> del ARNm de Sar1 en embriones de <i>Drosophila</i>	17
<b>Figura 7.</b> Estructura del ojo compuesto de <i>D. melanogaster</i>	20
<b>Figura 8.</b> Registro de EG de una mosca silvestre	21
<b>Figura 9.</b> Esquema de cruzas para generar embriones homocigotos letales de genes de la vía COP II	25
<b>Figura 10.</b> Esquema de cruzas para generar el cromosoma recombinante <i>FRT82</i> , <i>sar1<sup>05712</sup></i> para la obtención de clonas celulares <i>sar1<sup>05712</sup>/sar1<sup>05712</sup></i>	29
<b>Figura 11.</b> Esquema de cruzas para obtener individuos con clonas homocigotas <i>sar1<sup>05712</sup>/sar1<sup>05712</sup></i> y clonas homocigotas CD2/CD2 en el ojo	30
<b>Figura 12.</b> Esquema de cruzas para obtener individuos donde se pueden inducir clonas <i>sar1<sup>05712</sup>/sar1<sup>05712</sup></i> y <i>rpS3/rpS3</i>	31
<b>Figura 13.</b> Esquema de cruzas para obtener individuos de donde se pueden generar células germinales <i>sar1<sup>05712</sup>/sar1<sup>05712</sup></i>	34
<b>Figura 14.</b> Fenotipos embrionarios mutantes <i>sar1<sup>05712</sup>/sar1<sup>05712</sup></i>	36
<b>Figura 15.</b> Fenotipos embrionarios de mutantes <i>sec13<sup>01031</sup>/sec13<sup>01031</sup></i>	38
<b>Figura 16.</b> Fenotipos embrionarios más frecuentes encontrados en individuos con deficiencias en las funciones de <i>sar1<sup>05712</sup>/sar1<sup>05712</sup></i> , <i>sec13<sup>01031</sup>/sec13<sup>01031</sup></i> , <i>sec23<sup>j13c</sup>/sec23<sup>j13c8</sup></i> , <i>sec24<sup>F05576</sup>/sec24<sup>F05576</sup></i> y <i>sec31<sup>e00167</sup>/sec31<sup>e00167</sup></i>	39
<b>Figura 17.</b> Hembras adultas de la inducción de clones homocigotos <i>sar1<sup>05712</sup>/sar1<sup>05712</sup></i> en la línea germinal	40
<b>Figura 18.</b> Clonas homocigotas <i>sar1<sup>05712</sup>/sar1<sup>05712</sup></i> en el ojo	42
<b>Figura 19.</b> Los ojos adultos con clonas homocigotas <i>sar1<sup>05712</sup>/sar1<sup>05712</sup></i> presentan un desarreglo de omatidios	43

<b>Figura 20.</b> Ojo de machos con clonas homocigotas $sarI^{05712}/sarI^{05712}$ y clonas homocigotas CD2/CD2	44
<b>Figura 21.</b> Ojo de hembras con clonas homocigotas $sarI^{05712}/sarI^{05712}$ y clonas homocigotas para CD2/CD2	45
<b>Figura 22.</b> Individuos con clonas homocigotas $sarI^{05712}/sarI^{05712}$ en la región cefálica	47
<b>Figura 23.</b> Individuos con clonas homocigotas $sarI^{05712}/sarI^{05712}$ en la región cefálica. Fenotipo “pelona”	48
<b>Figura 24.</b> Individuos con clonas homocigotas para $sarI^{05712}/sarI^{05712}$ en la región cefálica. Fenotipo “jíbaro”	50
<b>Figura 25.</b> Proporción de defectos de individuos que se desarrollan hasta la etapa de faratos (metamorfosis tardía). F1 de la crucea; $y^-, w^-, ey-flp; FRT82, rpS3, ubi-GFP/TM3$ X $y^-, w^-, ey-flp$ ó $y^-, w^-, FRT82, sarI^{05712}/TM3$	52
<b>Figura 26.</b> Arreglo de omatidios en clonas homocigotas $arm-lacZ/arm-lacZ$ .	52
<b>Figura 27.</b> Clones homocigotos $sarI^{05712}/sarI^{05712}$ inducidas por choque térmico	54
<b>Figura 28.</b> Desorganización en la estructura de los omatidios de las moscas “pelonas” $sarI^{05712}/sarI^{05712}$	56
<b>Figura 29.</b> Electrorretinogramas en ojos homocigotos $sarI^{05712}/sarI^{05712}$ de moscas “pelonas”	57

