

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR Y GENETICA



"ACTIVIDAD FUNCIONAL DEL MOTIVO YPWM DE
ANTENNA PEDIA EN EL POTENCIADOR dpp674LacZ"

TESIS

QUE EN OPCION AL TITULO DE
QUIMICO BACTERIOLOGO PARASITOLOGO

PRESENTA:
MELISA GOMEZ VELAZQUEZ

DIRECTOR DE TESIS:
DRA. DIANA RESENDEZ PEREZ

JULIO 2006

TL
QL958
.G66
2006
c.1

THE
HISTORY OF THE
CITY OF NEW YORK
FROM 1624 TO 1898

W. G. V.



1080093200

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR Y GENETICA



"ACTIVIDAD FUNCIONAL DEL MOTIVO YPWM DE
ANTENNAPEDIA EN EL POTENCIADOR dpp674LacZ"

TESIS

QUE EN OPCION AL TITULO DE
QUIMICO BACTERIOLOGO PARASITOLOGO

PRESENTA:

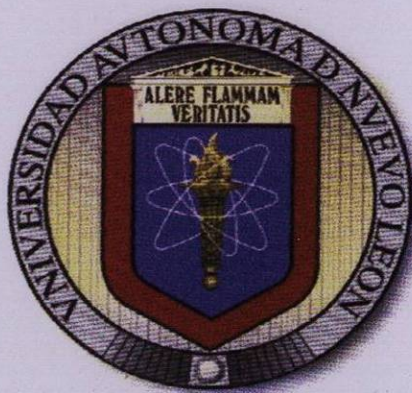
MELISA GOMEZ VELAZQUEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. DIANA RESENDEZ PEREZ

JULIO 2006

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y GENÉTICA



**“ACTIVIDAD FUNCIONAL DEL MOTIVO YPWM DE
ANTENNAPEDIA EN EL POTENCIADOR dpp674LacZ”**

TESIS

**QUE EN OPCION AL TITULO DE
QUÍMICO BACTERIÓLOGO PARASITÓLOGO**

PRESENTA:

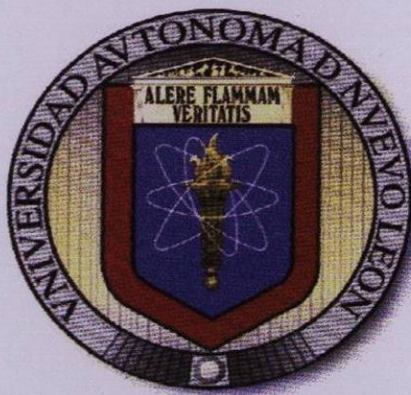
MELISA GÓMEZ VELÁZQUEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. DIANA RESENDEZ PEREZ

JULIO 2006

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y GENÉTICA



“ACTIVIDAD FUNCIONAL DEL MOTIVO YPWM DE
ANTENNAPEDIA EN EL POTENCIADOR dpp674LacZ”

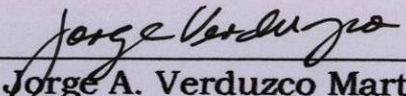
TESIS
QUE EN OPCION AL TITULO DE
QUÍMICO BACTERIÓLOGO PARASITÓLOGO

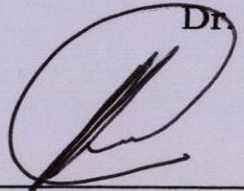
PRESENTA:

Melisa Gómez Velázquez

COMISIÓN DE TESIS


Dra. Diana Reséndez Pérez
Director


Dr. Jorge A. Verduzco Martínez
Secretario


Dr. Carlos Leal Garza
Vocal

A mi papá y mi mamá

AGRADECIMIENTOS

A mi familia: Papá, Mamá, Karina y Jéssica que me aguantaron, apoyaron y ayudaron (mis hermanas más o menos ja ja) durante toda mi existencia y más en la tesis aunque no tienen idea de lo que hice en el laboratorio, solo saben que trabajé con moscas. Por estar ahí, desmañanándose y desvelándose por mi sin preguntar.

A la Dra. Diana por dejarme trabajar y aprender en su laboratorio.

A Karina y Arturo por aligerarme la carga y la presión de los últimos meses de la tesis con sus estruendosas y contagiosas risas. Por escuchar, apoyar, ayudar y opinar cuando era necesario. Ah y por aguantar mis quejas, lloriqueos y pequeñas crisis.

A Claudio por orientarme con paciencia a pesar de mi desesperación.

A Ricardo por introducirme a la biología del desarrollo y enseñarme lo que se debe y lo que no se debe hacer en el laboratorio.

A todos los del laboratorio 8:

Ixchelt (estoy casi segura de que así no se escribe) por enseñarme baile árabe y por ser mi médico aunque lo que tenía era solo stress. Maribel por hacerme reír más de 20 minutos con los boletos de teatro y gracias a ella aparece la mosca en la esquina superior derecha. Fermín por prestarnos a Maribel para ir al cine y su agradable conversación de humor raro. Paco por preparar la comida de las moscas que es un verdadero dolor de cabeza y por hacerme reír con sus comentarios entre dientes. Jeannie por llevarnos comida, dejarme utilizar/acábarme su cinta, y traerme a mi casa. Salomé por enseñarme a usar el Adobe Photoshop. Diana por alimentarnos en las mañanas. Delia, Nancy, Izaskun, Yenny, Caro, maestro Verduzco y Alejandra por reducir los tiempos muertos con su plática. Claudio, Carlos y Alejandro por hacerme reír la mayoría de las tardes y fines de semana.

A los ex-integrantes del L8:

Argentina, Wendy, Roxana y Ricardo por amenizar los días en el laboratorio.

A Soraya y Deya por seguir siendo mis amigas a pesar de verlas cada siglo, por ayudarme y darme ánimos.

A Lupita por escuchar y orientar a esta persona durante 5 años !!!!

A Clara, Gaby Salinas y Diana por ser mis compañeras y cómplices en los últimos años de la carrera.

A la Dra. Norma por dejarme experimentar en su laboratorio cuando no sabía nada de nada y al maestro Eduardo por enseñarme microbiología.

A Alberto Cruz por su apoyo y consejos.

A mis compañeros de generación de QBP's Agosto 01- Diciembre 05 porque de todos aprendí algo.... en la mayoría de los casos bueno.

A Sara, Arianna, Paty, Addis, Alejandra, Cynthia y Sagrario, por su amistad.

A todos aquellas personas que conocí y se me olvidó mencionar y que en su momento dejaron algo bueno en mí.

A Pablo simplemente gracias.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León (PACYT, Proyecto CN1130-05) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, Proyecto 39479-Q) por el apoyo económico que recibí de su parte.



TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
Área de trabajo	i
ABREVIATURAS	ii
LISTA DE FIGURAS	iv
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	4
3. ANTECEDENTES	4
3.1 Biología del desarrollo	4
3.1.1 Los problemas de la biología del desarrollo	4
3.1.2 Las etapas del desarrollo animal	5
3.1.3 Modelos de estudio en biología del desarrollo	6
3.2 <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo de estudio	7
3.2.1 Generalidades de la mosca de la fruta	7
3.2.2 Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i>	8
3.3 Mutaciones homeóticas	9
3.4 Control de la identidad en <i>Drosophila melanogaster</i>	10
3.4.1 Segmentos y parasegmentos	10
3.5 Genes homeóticos	10
3.5.1 Genes homeóticos y evolución	13
3.6 El homeobox	14
3.7 Antennapedia	15
3.7.1 Estructura del gen de Antennapedia	16
3.7.2 Unión de Antennapedia al ADN	16
3.8 Genes blanco	16
3.8.1 <i>Teashirt</i>	17
3.8.2 <i>Decapentaplegic</i>	17
3.8.2.1 Mesodermo visceral	17
3.8.2.2 Potenciadores del gen <i>dpp</i>	18
3.9 Homeoproteínas y el tetrapéptido YPWM	19
3.9.1 Análisis de la función del tetrapéptido	



	YPWM <i>in vitro</i>	20
	3.9.2 Análisis de la función de YPWM utilizando al ratón como modelo de estudio	22
	3.9.3 Análisis de la función de YPWM utilizando a la mosca de la fruta como modelo de estudio	22
4.	IMPORTANCIA	25
5.	OBJETIVO GENERAL	25
	5.1 Objetivos particulares	25
6.	HIPÓTESIS	26
7.	ESTRATEGIA GENERAL	27
8.	MATERIALES Y MÉTODOS	28
	8.1 Descripción de líneas de moscas transgénicas	29
	8.2 Amplificación y mantenimiento de las líneas de moscas transgénicas	30
	8.3 Sexado y realización recruzadas genéticas	31
	8.4 Coecta, decorionización, fijación y devitelinización de los embriones de <i>D. melanogaster</i>	31
	8.5 Detección de β-galactosidasa y Antennapedia en embiones de <i>D. melanogaster</i>	32
9.	RESULTADOS	34
	9.1 Visualización del patrón de expresión de dpp674LacZ	34
	9.2 Expresión ectópica de Antennapedia utilizando dos sistemas de expresión	34
	9.2.1 Promotor de choque térmico (HS)	35
	9.2.2 Potenciador patched (ptc)	36
	9.3 Antp dirigida con el promotor de choque térmico no activó de manera ectópica el potenciador dpp674LacZ	37
	9.4 Activación ectópica del potenciador dpp674LacZ por Antp silvestre dirigida con el potenciador patched	38
	9.5 El tetrapéptido YPWM de Antp no es necesario para la activación ectópica del potenciador dpp674LacZ	41



10.	DISCUSIÓN	43
11.	CONCLUSIONES	46
12.	PERSPECTIVAS	46
13.	BIBLIOGRAFÍA	47
14.	APÉNDICE	53



Área de trabajo

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Biología del Desarrollo del Laboratorio de Inmunología y Virología, en el Departamento de Biología Celular y Genética, en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo la Asesoría de la Dra. Diana Reséndez Pérez.



ABREVIATURAS

Abd-A	Abdominal-A
Abd-B	Abdominal-B
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Antp	Antennapedia
Antp ^{AAA}	Antp con sustitución del tetrapéptido YPWM por un bloque de alaninas
Antp ^{ΔHD}	Antp con delección del homeodominio y del tetrapéptido YPWM
Ant-C	Complejo Antennapedia
ap	Eje antero-posterior
BSA	Albúmina sérica bovina
BX-C	Complejo Bithorax
°C	Grados Centígrados
cols	Colaboradores
Cyo	Curly
Dfd	Deformed
Dll	Distal-less
dpp	decapentaplegic
exd	extradenticle
fig	Figura
fkh250 ^{con1}	Secuencia consenso forkhead
g	Gramos
h	Horas
HD	Homeodominio
HRP	Peroxidasa de Rábano
HS	Choque térmico
L	Litro
lb	Labial
min	Minutos
mL	mililitros
μL	microlitros
NMR	Resonancia Magnética Nuclear
N-terminal	Extremo amino-terminal
P1	Promotor 1 de Antp
P2	Promotor 2 de Antp
pb	proboscipedia
PBS	Buffer de fosfatos salino
PBT	PBS + TritónX-100 0.1%
PBTween	PBS + Tween 20 0.05%
ps	Parasegmentos
ptc	patched
RNA ^m	Ácido ribonucleico mensajero
Scr	Sex Comb Reduced
T1	Segmento torácico 1
T2	Segmento torácico 2
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
tsh	teashirt
Ubx	Ultrabithorax
UAS	Secuencia de unión a Gal4
V	Volumen
v/v	volumen sobre volumenn
W	Triptofano
wg	wingless
YPWM	Tirosina-Prolina-Triptofano-Metionina



yw

Fenotipo de cuerpo amarillo y ojos blancos



LISTA DE FIGURAS

	Pág
1. <i>Drosophila</i> como modelo de estudio	7
2. Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i>	8
3. Expresión de los genes homeóticos en <i>Drosophila</i>	9
4. Segmentos y parasegmentos en el embrión de <i>Drosophila melanogaster</i>	11
5. Expresión colindar de los genes homeóticos en el embrión de <i>D. melanogaster</i>	11
6. Mutante Bithorax, Ubx no se expresa de manera adecuada y el tercer segmento se transforma en el segundo segmento torácico	12
7. Mutante Antennapedia, Antp se expresa en las antenas ocasionando la transformación de antena por pata	12
8. Los genes ortólogos, parálogos y homólogos	13
9. Modificaciones en los genes homeóticos que podrían influir en la evolución morfológica	14
10. El contacto del HD de Antp en el ADN se realiza en la tercera hélice de reconocimiento	15
11. Unión del homeodominio de Antp al surco mayor y del brazo N-terminal al surco menor	16
12. Sitios de unión de Ubx y Abd-A en el potenciador dpp813LacZ	18
13. Complejo Ubx-Exd-ADN	21
14. Línea transgénica dpp674LacZ en <i>Drosophila melanogaster</i>	35
15. Expresión del potenciador dpp674LacZ	36
16. Patrón de expresión de Antp endógena y de Antp ectópica usando el promotor HS y el potenciador ptc	36
17. Sistemas de activación ectópica de Antp: HS y ptc	37
18. Esquema de cruce para la integración de dos transgenes	38
19. Activación nula del potenciador dpp674LacZ por Antp silvestre usando HS	38
20. Esquema de cruces genéticas para la integración de los tres transgenes	39
21. Uso del sistema binario UAS/Gal4 para analizar la activación de dpp674LacZ por Antp	40
22. Activación ectópica del potenciador dpp674LacZ por Antp silvestre usando ptc	41
23. Activación ectópica del potenciador dpp674LacZ con Antp ^{AAAA} usando ptc	42



1. RESUMEN

Las regiones altamente conservadas de las homeoproteínas, como el homeodominio y el motivo YPWM en los diversos organismos, permiten la actividad funcional de estas homeoproteínas. Los homeodominios están ampliamente estudiados, pero se cuenta con muy poca información acerca de la actividad funcional del tetrapéptido YPWM en sistemas *in vivo*. En la especificidad funcional de otras homeoproteínas como Ubx y Abd-A, el tetrapéptido YPWM ha mostrado ser o no necesario dependiendo de su gen blanco

Interesantemente, los resultados obtenidos en nuestro laboratorio indican que el tetrapéptido “YPWM” de Antp es indispensable y crucial para la activación y represión de los genes blanco *tsh*, *Scr* y el elemento *fkh250*(*con1*).

El objetivo de este trabajo es analizar el requerimiento del motivo YPWM de Antp para la activación del potenciador dpp674LacZ de *decapentaplegic* (*dpp*).

Para cumplir con el objetivo planteado en este trabajo, se visualizaron los patrones de expresión del potenciador dpp674LacZ, de Antp endógena y de Antp ectópica dirigida mediante dos sistemas: un promotor de choque térmico (HS) y el potenciador *patched* (*ptc*). Además, se realizaron cruza genéticas con el fin de integrar los transgenes necesarios para sobre-expresar Antp con HS (HS-Antp/dpp674LacZ) y con *ptc* (*ptc*-Gal4/UAS-Antp/dpp674LacZ) en embriones de *D. melanogaster*. Una vez que se obtuvo la activación ectópica del potenciador dpp674LacZ con Antp silvestre dirigida con *ptc*, se evaluó el efecto de Antp mutante en el tetrapéptido YPWM (UAS-Antp^{AAAA}), sobre la expresión del potenciador dpp674LacZ.

Los resultados obtenidos en el desarrollo de esta tesis demuestran que: a) Antp silvestre dirigida con el potenciador *ptc* fue capaz de activar el potenciador dpp674LacZ, mientras que dirigida con el promotor de choque térmico no fue capaz de activar este elemento y que b) el tetrapéptido YPWM de Antp no es necesario para que Antp active la expresión del potenciador dpp674LacZ.

Estos resultados son similares a los obtenidos por Graba *et al* (2003) y Tour *et al* (2006) que demostraron que la activación del gen *dpp*, y su represión por Abd-A es independiente del tetrapéptido YPWM. Por lo que se sugiere que la regulación del gen *dpp* por las homeoproteínas durante el desarrollo embrionario de *D. melanogaster* es independiente de este motivo.



Lo anterior constituye la primera evidencia de que no se requiere el motivo YPWM en Antp, ya que la activación/represión de los genes blanco *tsh*, *Scr* y el elemento consenso *fkh250^{con1}* obtenidos por Canales del Castillo (2005) en nuestro laboratorio mostró en todos los casos que se requiere el motivo YPWM para la activación funcional de Antp.



2. INTRODUCCIÓN

La biología del desarrollo es la ciencia que permite el estudio y desciframiento del maravilloso enigma de cómo una “simple” célula (cigoto) puede dar origen a un organismo complejo. Curiosamente todas las células en un individuo eucariota cuentan con la misma información genética. Lo que conduce a la siguiente pregunta: ¿cómo se logra la diferenciación celular?. Esta claro que este proceso esta directamente influenciado por los genes, es decir, la regulación de la expresión génica permite que los genes se expresen en un tiempo y espacio determinado durante el desarrollo de un organismo eucariota. Cuando un gen se expresa fuera de su espacio y tiempo normal puede traer consecuencias severas, desde malformaciones hasta cáncer. Interesantemente, mutaciones de este tipo dieron la clave de cómo funcionan estos genes en el control genético del desarrollo.

En la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* se ha encontrado que los responsables de la diferenciación celular son ocho genes maestros: los genes homeóticos o selectores que tienen sus ortólogos en todo el reino animal, y que comparten dos secuencias altamente conservadas: el homeodominio y el tetrapéptido YPWM (Tirosina-Prolina-Triptofano-Metionina). Hasta la fecha, se ha demostrado la importancia funcional del homeodominio, y se sabe que el tetrapéptido “YPWM”, a diferencia del homeodominio, no establece contacto con el ADN e interactúa con cofactores que presumiblemente modulan la especificidad funcional de la homeoproteína. La actividad funcional del tetrapéptido no es muy clara a la fecha, ya que una homeoproteína puede o no requerir el tetrapéptido para realizar su función de activación o represión, tanto de genes blanco como en secuencias reguladoras como los potenciadores. Interesantemente, los resultados obtenidos en nuestro laboratorio por Canales-del Castillo en el 2005 permiten concluir que el tetrapéptido “YPWM” de Antp es indispensable y crucial para la activación y represión de los genes blanco analizados (*tsh*, *fkh* y *Scr*).

Debido a lo anterior, en este trabajo analizaremos el requerimiento del motivo YPWM en la proteína homeótica Antp para la activación del potenciador dpp674LacZ.

El hecho de que el 61 % de los genes de enfermedades humanas tengan su análogo en *D. melanogaster*, así como el 50% de las proteínas de mamíferos, facilita la extrapolación de los resultados a la especie humana.



3. ANTECEDENTES

3.1 Biología del desarrollo

El concepto de embrión es asombroso y construir un embrión es lo más difícil que alguien puede hacer. Para llegar a ser un embrión hay que partir de una sola célula, hay que respirar antes de tener pulmones, digerir antes de tener intestino, construir huesos cuando se es solo pulpa y formar arreglos ordenados de neuronas antes de saber como pensar.

Para plantas y animales la única forma de pasar de cigoto a adulto es a través del desarrollo del embrión. Mientras la mayor parte de la biología se enfoca en estudiar las estructuras adultas y su función, la biología del desarrollo considera las etapas de transición más interesantes.

Las preguntas que se intentan resolver por los biólogos del desarrollo son de “llegar a ser” mas que de “ser”. Decir que un mamífero XX es hembra y un mamífero XY es macho no explica la determinación del sexo en biología del desarrollo. Más bien, esta ciencia se encarga de saber como es que un genotipo XX da lugar a una hembra y como el genotipo XY da lugar a un macho (Gilbert, 1997).

3.1.1 Los problemas de la biología del desarrollo

El desarrollo tiene dos grandes funciones: generar diversidad celular y orden dentro de cada generación y asegurar la continuidad de la vida de una generación a la siguiente. Así, hay dos preguntas fundamentales en biología del desarrollo: ¿Como es que de un cigoto se origina un adulto? y ¿cómo es que un adulto da origen a otro adulto? Cada especie tiene sus propias respuestas, pero se han establecido ciertas generalidades. Tradicionalmente estas preguntas se han subdividido en cuatro problemas generales para la biología del desarrollo:

El problema de la diferenciación. Una sola célula, el cigoto, da lugar a cientos de diferentes tipos celulares (células musculares, neuronas, eritrocitos, etc.). Esta generación de diversidad celular se conoce como diferenciación. Dado que cada célula del cuerpo contiene el mismo material genético, es necesario entender como es que el mismo material genético puede producir diferentes tipos de células.

El problema de la morfogénesis. Nuestras células diferenciadas no están distribuidas al azar. Sino que están organizadas en tejidos y en órganos. Estos órganos están distribuidos de cierta manera: los dedos están en la punta de la mano y no en el medio, los ojos están en la cabeza y no en los pies. El establecimiento de este orden se denomina



morfogénesis. ¿Cómo es que las células se auto-organizan para dar lugar a este orden?

El problema del crecimiento. Somos más grandes que el cigoto, pero ¿cómo es que las células supieron cuando dejar de dividirse? Si cada célula de nuestro rostro hubiera llevado a cabo un ciclo más de división celular, seríamos considerados como deformes.

El problema de la reproducción. El óvulo y el espermatozoide son células muy diferenciadas. Solo ellas pueden transmitir las instrucciones para crear un organismo de generación en generación. ¿Cómo es que estas células forman la siguiente generación y cuáles son las instrucciones en el núcleo y el citoplasma que les permiten funcionar de esta manera?

Recientemente se ha enfatizado un quinto problema:

El problema de la evolución. La evolución implica cambios heredados en el desarrollo. Cuando se dice que la extremidad de un solo dedo del caballo actual tiene un ancestro de cinco dedos, se dice que los cambios en el desarrollo del cartilago y los músculos ocurrieron a través de muchas generaciones en los embriones de los ancestros del caballo. ¿Cómo es que los cambios en el desarrollo crearon nuevas formas del cuerpo?, ¿Cuáles cambios heredables son posibles dadas las restricciones impuestas por la necesidad del organismo de sobrevivir mientras se desarrolla? (Gilbert, 1997).

3.1.2 Las etapas del desarrollo animal

Los organismos multicelulares se originan mediante un proceso relativamente lento de cambios progresivos que se denomina desarrollo. En la mayoría de los casos, el desarrollo de un organismo multicelular comienza con una sola célula, el huevo o cigoto, el cual se divide por mitosis para producir todas las células del cuerpo. El estudio del desarrollo animal se conoce tradicionalmente como embriología, haciendo referencia que entre la fertilización y el nacimiento, el organismo en desarrollo se conoce como embrión. Pero el desarrollo no se detiene al nacer ni en la vida adulta. La mayoría de los organismos nunca dejan de desarrollarse. Por eso se dice que la biología del desarrollo estudia los procesos embrionarios y otros tipos de desarrollo.

La vida de un nuevo individuo comienza con la fusión del material genético de los gametos (óvulo y espermatozoide). Esta fusión, llamada fertilización, estimula al cigoto a comenzar su desarrollo. Las siguientes etapas del desarrollo, en conjunto se denominan embriogénesis. A través de todo el reino animal existe una increíble variedad de tipos embrionarios, pero la mayoría de los patrones de embriogénesis abarcan variaciones en cuatro temas:



1.-Inmediatamente después de la fertilización ocurre la división. La división es una serie de divisiones mitóticas extremadamente rápidas, en las cuales el enorme volumen del citoplasma del cigoto es dividido en muchas células pequeñas. Estas células se llaman blastómeros, y al final de la división generalmente forman una esfera llamada blástula.

2.- Una vez que el grado de divisiones mitóticas ha disminuido, los blastómeros sufren movimientos dramáticos en los cuales cambian posiciones relativas unos con otros. Esta serie de re-arreglos celulares se denominan gastrulación. Como resultado de la gastrulación, el embrión típico contiene tres regiones celulares, llamadas capas germinales. La capa mas externa, el ectodermo, da lugar a las células de la epidermis y del sistema nervioso; la capa mas interna, el endodermo, da lugar a la parte del tubo digestivo y sus órganos asociados (páncreas, hígado, pulmones, etc.); y la capa del centro, el mesodermo, da lugar a varios órganos (corazón, riñones, etc.), tejidos conectivos y células sanguíneas.

3.- Una vez que estas tres capas germinales están establecidas, las células interactúan entre sí y se reacomodan para producir tejidos y órganos. Este proceso se llama organogénesis. Muchos órganos contienen células de más de una capa germinal. Además durante la organogénesis, ciertas células realizan largas migraciones desde su lugar de origen hasta su localización final, por ejemplo las células precursoras de la sangre y de los linfocitos.

4.- En muchas especies, una parte especializada del citoplasma del cigoto da lugar a los precursores de los gametos. Estas células se denominan células germinales y se consideran a parte por su función reproductiva. El resto de las células del cuerpo se llaman células somáticas. La separación de las células somáticas de las células germinales es a menudo una de las primeras diferenciaciones que ocurren durante el desarrollo animal. Las células germinales eventualmente migran a las gónadas, donde se diferencian en gametos. El desarrollo de los gametos, llamado gametogénesis, usualmente no se completa hasta que el organismo alcanza la madurez física.

3.1.3 Modelos de estudio en biología del desarrollo

Los organismos usados como modelos por los biólogos del desarrollo son:

- Cordados
 - *Branchiostoma lanceolatum*
 - *Danio ferio*
 - *Xenopus laevis*
 - *Gallus gallus*



- *Mus musculus*
- Invertebrados
 - *Caenorhabditis elegans*
 - *Drosophila melanogaster*
- Plantas
 - *Arabidopsis thaliana*
 - *Snapdragon*

3.2 *Drosophila melanogaster* como modelo de estudio

Drosophila melanogaster, cuyo nombre literalmente significa “amante del rocío de vientre oscuro”, fue adoptada como animal de experimentación genética (Fig. 1) por Thomas Morgan a principios del siglo XX y hasta la fecha es uno de los principales modelos de estudio en biología del desarrollo y en toxicología genética. Existen varias razones por las cuales es considerada un buen modelo genético: a) La mosca tiene un tamaño muy pequeño, así que ocupa poco espacio, b) Es fácil de manejar y su dieta es económica, c) Los machos no presentan recombinación génica y esto facilita los estudios, d) Tienen un ciclo de vida corto, e) Una hembra ovoposita alrededor de 1000 huevos a lo largo de su vida, f) Es factible tener una gran población en poco tiempo y esto hace más confiables los análisis estadísticos, g) El embrión se deposita fuera de la hembra, así que pueden estudiarse las diferentes etapas, h) La etapa de blastodermo es un sincitio (muchos núcleos embebidos en un mismo citoplasma) por lo que el DNA que se inyecta tiene fácil acceso a todo el núcleo, y finalmente i) Su genoma está totalmente secuenciado (13 601 genes).

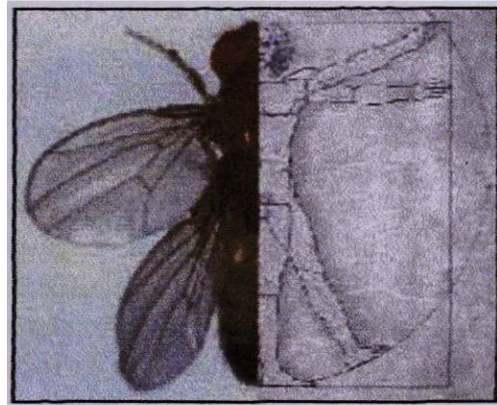


Figura 1. *Drosophila* como modelo de estudio

3.2.1 Generalidades de la mosca de la fruta

Drosophila melanogaster es un insecto, que pertenece al orden de los dípteros, es decir, posee solo dos alas y mide entre 3 y 5 mm de largo. A 25°C y 60% de humedad tarda de 10 a 14 días en desarrollarse. Durante este tiempo pasa por embrión, tres estadios larvarios, se convierte en pupa hasta que finalmente se transforma en adulto. La duración aproximada de cada etapa a 25 °C es:

Desarrollo embrionario	1 día
Larva de primer estadio	1 día
Larva de segundo estadio	1 día
Larva de tercer estadio	2 días



Formación del pupario
Pupa

4 horas
4.5 días

Un adulto puede vivir poco más de 20 días bajo las mismas condiciones (25 °C y 60% de humedad). La temperatura es un factor que influye directamente en la velocidad de su desarrollo, a temperaturas altas se acelera y a temperaturas bajas se retrasa.

3.2.2 Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*

El huevo es de forma ovoide con una cubierta denominada corión, del cual sobresalen dos finas proyecciones aplanadas en sus extremos, las cuales previenen que el huevo se hunda en un medio semilíquido. En el extremo contrario se encuentra un poro pequeño, por donde entra el esperma al huevo y pasa por el oviducto al útero (llamada vagina en *Drosophila*). El desarrollo empieza inmediatamente después de la fertilización y esta dividido en dos períodos: el período embrionario transcurre dentro del huevo, hasta la eclosión de la larva, y el período post-embrionario que consiste en la larva, la pupa y el adulto (Fig. 2).

La larva es un organismo blanco vermiforme, segmentado y con piezas bucales más oscuras. Estas dejan surcos en el medio semisólido

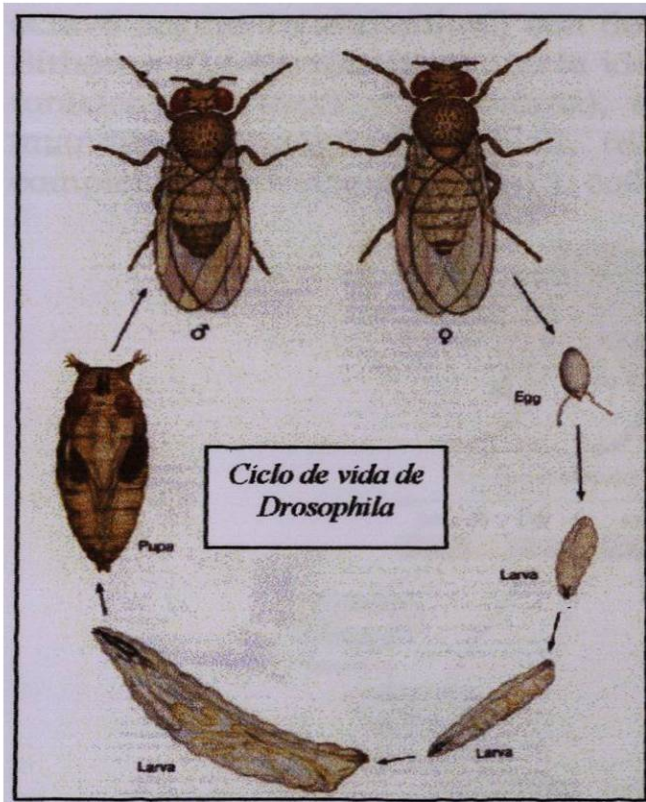


Figura 2. Ciclo de Vida de *Drosophila melanogaster*

donde se mueven y comen. Debido a que la piel no es elástica, la pequeña larva debe mudar periódicamente su cutícula para alcanzar un tamaño adulto. El período entre dos mudas sucesivas se llama instar. Tanto el tamaño de la larva como el número de dientes en sus piezas bucales son un indicativo del instar en que se encuentra. La larva de tercer instar se alimenta y se desplaza hacia un lugar más seco para transformarse en pupa. El cuerpo de la larva se reduce y su cutícula se transforma en una pared pigmentada, dura y rígida, que constituye el pupario, dentro del cual la larva se transforma en adulto. Poco después de que los adultos machos eclosionan del pupario, éstos son fértiles y maduros sexualmente, mientras que las hembras tardan un poco más. Una vez que la hembra es sexualmente madura, se aparea



repetidamente con diferentes machos. Ellas almacenan el semen en los receptáculos ventrales y lo utilizan para fecundar los huevos más tarde.

3.3 Mutaciones homeóticas

En 1894 William Bateson acuñó el término “homeosis” para describir la transformación parcial o completa de un segmento del cuerpo por otro homólogo. Estas transformaciones fueron denominadas en general mutaciones homeóticas en base al término homeosis previamente descrito.

Tiempo después, en 1919 Clavin Bridges observó una mosca mutante en la que los halterios o balacines (estructuras necesarias para la estabilización del vuelo) se transformaron en alas, dando la apariencia de una mosca con dos pares de alas. Estas mutaciones fueron consideradas “reversiones a un estado de evolución temprana” ya que se piensa que el ancestro común de lepidópteros, dípteros y coleópteros tenía cuatro alas.

No fue sino hasta 1978 que Edward Lewis, un genetista americano galadornado con el premio Nobel en 1995, propuso la existencia de ocho genes maestros que controlan el desarrollo embrionario de *Drosophila*. Sus experimentos mostraron que la identidad de los segmentos que componen la porción posterior del cuerpo de la mosca (metatórax hasta el octavo segmento abdominal) son determinados por los genes del complejo Bithórax (BX-C), mientras que la identidad de los dos primeros segmentos torácicos (protórax y mesotórax), así como los segmentos de la cabeza (mandibular, maxilar y labial), resultan de la expresión de genes del complejo Antennapedia (ANT-C), como se muestra en la figura 3.

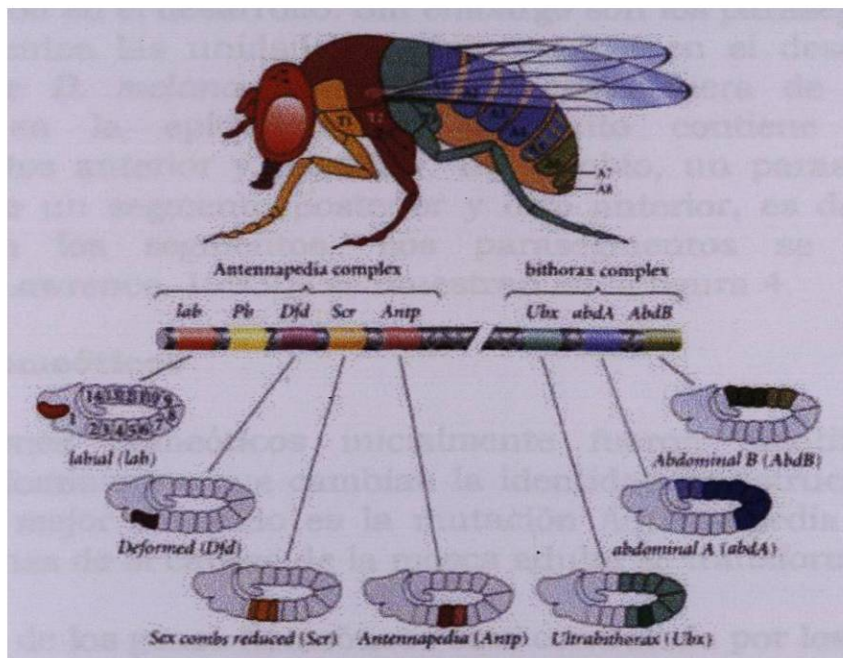


Figura 3. Expresión de los genes homeóticos en *Drosophila*



3.4 Control de la identidad en *Drosophila melanogaster*

Los insectos están compuestos de una serie de segmentos. Algunos de los ancestros evolutivos de los insectos están compuestos de segmentos indistinguibles uno de otro. Los segmentos de los insectos actuales son más avanzados y se han especializado para cumplir funciones específicas. Por ejemplo los segmentos torácicos, en general, se especializaron en la locomoción y por lo tanto desarrollaron patas y alas.

La organización del plan corporal a lo largo del axis antero-posterior (AP) en el embrión de *D. melanogaster* comienza con los genes de efecto materno que actúan como morfógenos generando gradientes proteicos. Posteriormente, los gradientes activan el establecimiento del patrón de expresión de los genes gap que generan ciertos dominios (anchos). Mas adelante, los genes de la regla del par y luego los genes de polaridad segmental afinan estos dominios en segmentos de expresión mas delgados que se denominan parasegmentos.

Posteriormente, los genes homeóticos, se encargan de asignar la identidad a cada parasegmento. Los genes homeóticos se caracterizan porque no se necesitan para formar estructuras, sino que actúan como interruptores que prenden o apagan diferentes cascadas de diferenciación celular.

3.4.1 Segmentos y parasegmentos

Tradicionalmente los segmentos han sido considerados como las unidades de construcción en el desarrollo. Sin embargo son los parasegmentos (ps) y no los segmentos las unidades de importancia en el desarrollo de los embriones de *D. melanogaster*. Los ps están fuera de fase con los segmentos; en la epidermis un segmento contiene un par de compartimentos anterior y posterior. En cambio, un parasegmento esta compuesto de un segmento posterior y otro anterior, es decir los ps se traslapan en los segmentos. Los parasegmentos se extienden al mesodermo (Lawrence, 1993) y se muestran en la figura 4.

3.5 Genes homeóticos

Los genes homeóticos inicialmente fueron identificados como mutaciones dominantes que cambian la identidad de estructuras. Uno de los ejemplos mejor conocido es la mutación Antennapedia (Antp), en la cual las antenas de la cabeza de la mosca adulta se transforman en patas.

La activación de los genes homeóticos esta controlada por los genes gap, la regla del par y polaridad de segmentos. Se sabe que mutaciones en los



genes de la regla del par, alteran la expresión de los genes homeóticos, cuyos dominios de expresión de son parasegmentales.

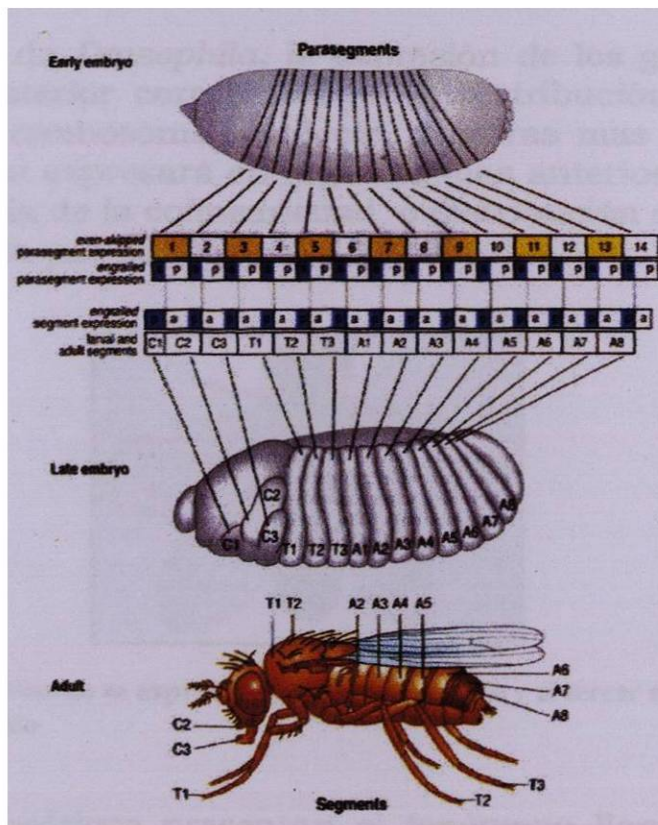


Figura 4. Segmentos y parasegmentos en el embrión de *Drosophila melanogaster*

La función de un gen homeótico es epistática respecto a su vecino anterior, es decir, los genes que se expresan más posteriormente enmascaran la función de los genes que se expresan más anteriormente. Sin embargo, es posible forzar la expresión de los genes en regiones fuera de su lugar normal de expresión (expresión endógena) mediante mutaciones o introduciendo transgenes que logren este fin. Esto último se utiliza en biología del desarrollo para determinar las posibles funciones de los genes homeóticos. Los genes selectores homeóticos de *Drosophila* se encuentran en dos complejos en el cromosoma 3. En el complejo Antennapedia se encuentran los genes homeóticos *Labial* (*lb*), *Proboscipedia* (*pb*), *Deformed* (*dfd*),

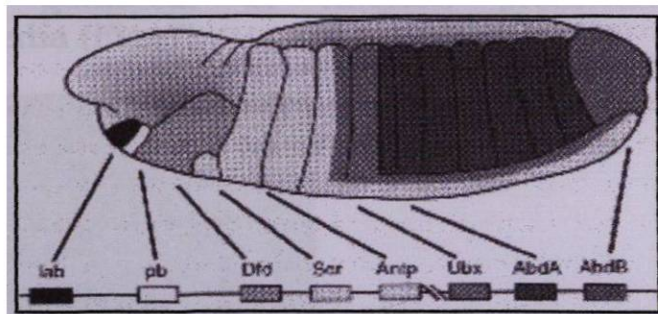


Figura 5. Expresión colineal de los genes homeóticos en el embrión de *Drosophila melanogaster*



***Sex Comb Reduced (Scr)* y *Antp*.** El complejo Bithorax esta integrado por los genes homeóticos: *Ultrabithorax (Ubx)*, *Abdominal-A (Abd-A)* y *Abdominal-B (Abd-B)*.

En el embrión de *Drosophila*, la expresión de los genes homeóticos en su eje antero-posterior corresponde a la distribución física de estos genes a lo largo del cromosoma, es decir, mientras mas cercano este un gen del extremo 3', se expresará en regiones mas anteriores del embrión. A esto se le llama regla de la colinearidad o distribución colinear (Fig. 5) y también fue propuesta por Lewis (Lewis, 1978).



Figura 6. Mutante Bithorax, Ubx no se expresa de manera adecuada y el tercer segmento se transforma en el segundo segmento torácico

Los genes homeóticos presentan el fenómeno llamado prevalencia posterior, mediante la cual los genes homeóticos posteriores reprimen la función de los que son expresados más anteriormente (Duboule y Morata, 1994).

Una característica propia de los genes homeóticos es que las mutaciones con pérdida de función producen la transformación de una parte más posterior del cuerpo en una anterior como se muestra en la figura 6, y las mutantes con ganancia de función presentan transformaciones como en Antennapedia (Fig. 7).

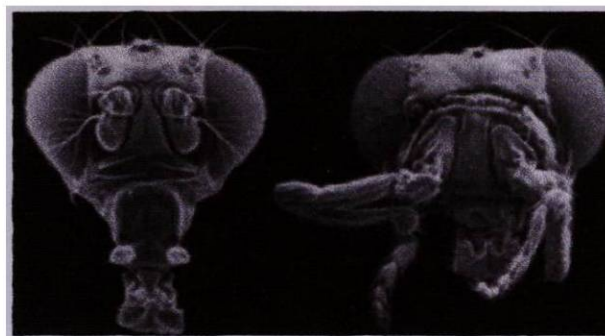


Figura 7. Mutante Antennapedia, Antp se expresa en las antenas ocasionando la transformación de antena por pata



Esto indica que los genes homeóticos controlan la identidad de los segmentos y la especificación del plan maestro del cuerpo desde la embriogénesis hasta el desarrollo larvario, de pupa y adulto.

Hasta la fecha, se sabe que los genes homeóticos establecen la identidad de los parasegmentos en el embrión de *D. melanogaster*. Este grupo de genes no es exclusivo de la mosca de la fruta, ya que se han encontrado en todo el reino animal y en plantas; las secuencias de unión al ADN son muy similares entre genes homeóticos y entre grupos ortólogos de genes, además las secuencias de ADN a las que se unen los genes homeóticos son también muy similares. Por esto es difícil entender como es que actúan *in vivo*.

En mamíferos, los genes homeóticos se denominan genes Hox, y existen 39 que están organizados en cuatro grupos cromosómicos: HoxA, HoxB, HoxC y HoxD. Se piensa que este arreglo surgió evolutivamente por duplicación y divergencia génica de un grupo Hox ancestral, que condujo a la generación de subgrupos de genes parálogos.

Los genes ortólogos son aquellos que tienen la misma función en diferentes especies, los genes parálogos son aquellos que tienen más de una copia en el genoma, con posibles modificaciones y por lo mismo tienen funciones redundantes y los genes homólogos son aquellos que tienen un mismo origen pero diferente función (Fig. 8).

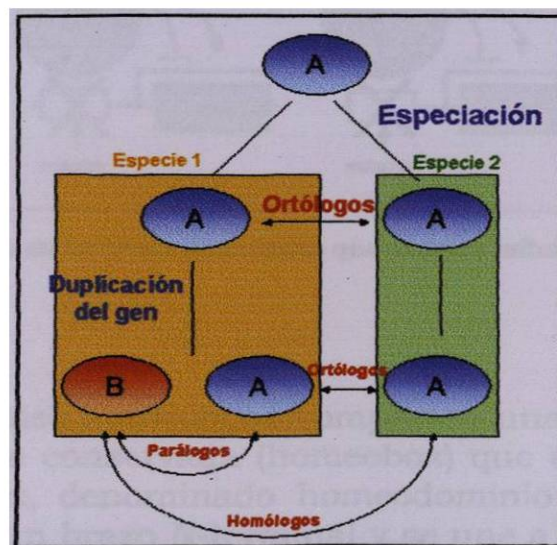


Figura 8. Los genes ortólogos, parálogos y homólogos

3.5.1 Genes homeóticos y evolución

Como ya se mencionó los genes homeóticos se encuentran distribuidos en todo el reino animal y se piensa que cambios en estos



genes podrían influir en la evolución morfológica de los animales mediante cuatro mecanismos como se muestra en la figura 9. Estas modificaciones podrían ser: a) alteraciones en el número de genes Hox, ya sea una disminución o un aumento, puede llevar a modificaciones en la escala de *phylum*; b) cambios amplios en los patrones de expresión de los genes Hox, pueden provocar un aumento en el número de segmentos, con implicaciones en la escala de clase; c) cambios sutiles al interior de los dominios de expresión de los genes Hox, lo cual causa la modificación de algunas características de los segmentos y d) cambios en la regulación o función de los genes blanco, los cuales pueden modificar la morfología en la escala de orden.

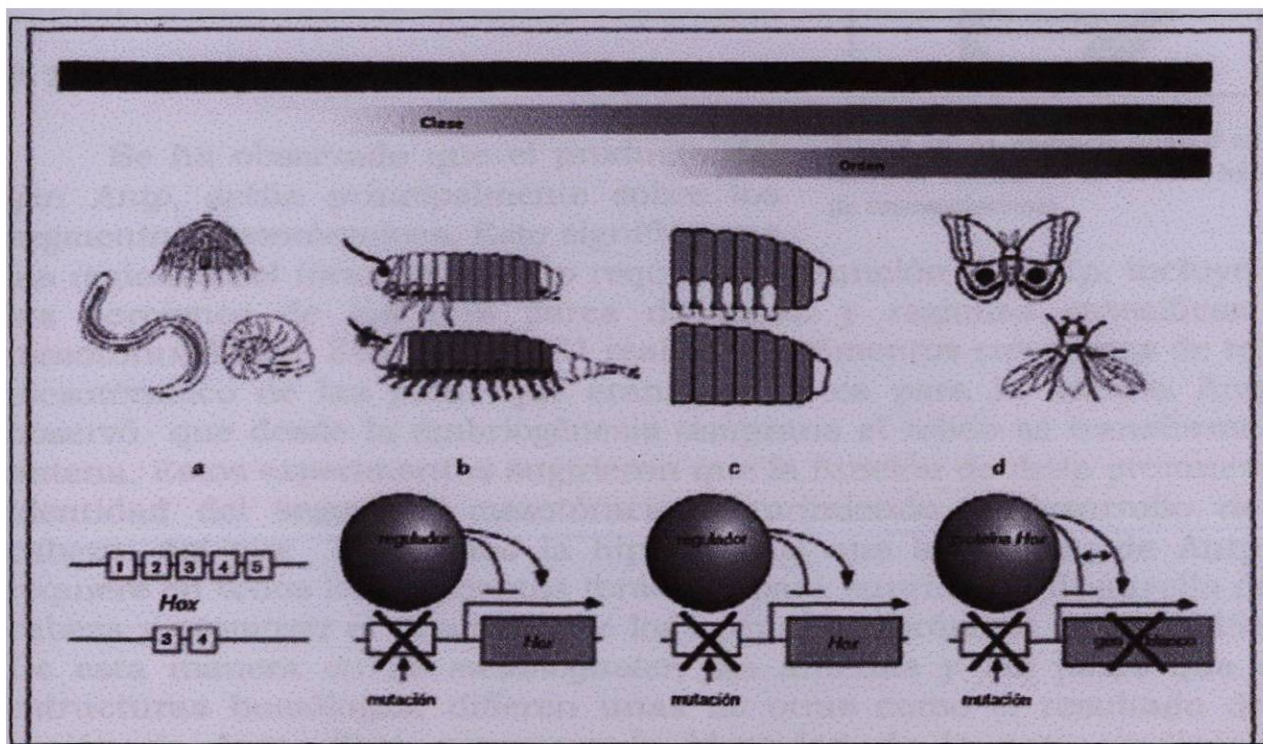


Figura 9. Modificaciones en los genes homeóticos que podrían influir en la evolución morfológica

3.6 El homeobox

Todos los genes homeóticos comparten una secuencia de 180 pares de bases altamente conservada (homeobox) que codifica para un dominio de 60 aminoácidos, denominado homeodominio (HD). El HD consta de tres alfa-hélices y un brazo N-terminal y se une a una secuencia específica de ADN en el surco mayor, mientras que el brazo N-terminal interacciona con el surco menor (Fig. 10).

El homeobox de *antennapedia* se utilizó como sonda para rastrear los ocho genes maestros propuestos por Lewis. Tiempo después se descubrió que estos genes no son exclusivos de la mosca de la fruta, sino



que se encuentran en todos los organismos del reino animal, desde levaduras hasta vertebrados superiores incluyendo al hombre.

El homeobox también se ha encontrado en genes de efecto materno y de segmentación, los cuales delimitan la expresión de los genes homeóticos; así como también en posibles cofactores como extradenticle y su ortólogo en vertebrados: Pbx (Sprules *et al.*, 2003).

3.7 Antennapedia

Se ha observado que el producto del gen *Antp*, actúa principalmente sobre los segmentos mesotórax. Esto significa que las regiones del tórax del adulto requieren la función de *Antp*, incluyendo las porciones de los tres pares de patas y regiones específicas de mesotórax dorsal. Struhl en 1981 realizó experimentos con clonas de tejido mesotóraxico de las patas que eran deficientes para la función *Antp* y observó que desde la embriogénesis temprana el tejido se transformó en antena. Estos experimentos sugirieron que la función de *Antp* promueve la identidad del segmento mesotóraxico suprimiendo el desarrollo de la cabeza. Así que se planteó la hipótesis de que la función de *Antp* se requiere en todos los segmentos torácicos para suprimir el desarrollo de la cabeza y promover el desarrollo de los apéndices torácicos (Struhl, 1981). De esta manera en *D. melanogaster*, las antenas y las patas que son estructuras homólogas, difieren unas de otras como el resultado de la acción de *Antp*. Esta promueve la identidad de la pata mediante la represión de los genes determinantes de la antena. En los discos de las pata, *Antp* previene el desarrollo de la antena reprimiendo al gen *homothorax* (*hth*), esto es regresando la ruta del desarrollo al estado basal, el cual es pata. Sin embargo, *Antp* no forma parte en la generación de este estado basal, solo contribuye al desarrollo normal de la pata mediante la modificación del estado basal (Casares y Mann, 1998). Adicionalmente, *Antp* se requiere en el mesodermo del intestino medio para dirigir la formación de una constricción transversal en el tubo digestivo, para el desarrollo apropiado del sistema nervioso periférico (Zeng *et al.*, 1993). En embriones mutantes los cuales carecen del gen *Antp* los segmentos mesotorácicos se desarrollan como el primer segmento: prothórax y en clonas mutantes de adultos (sin *Antp*) las células de la pata se diferencian como estructuras de antena (Wakimoto y Kaufman, 1981).

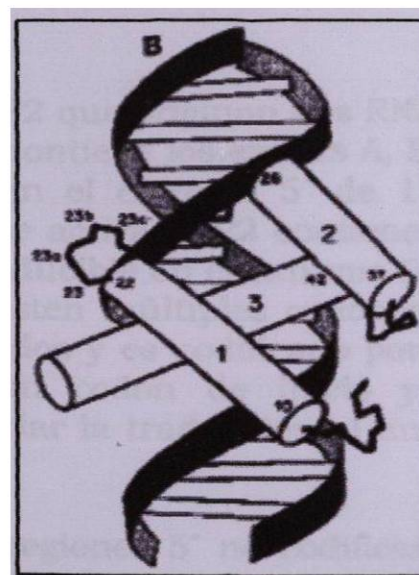


Figura 10. El contacto del HD en el ADN se realiza en la tercera hélice de reconocimiento



3.7.1 Estructura del gen de Antennapedia

Antennapedia tiene dos promotores P1 y P2 que originan dos RNAm. El RNAm que se origina cuando se activa el P1 contiene los exones A, B, D y E, así como una secuencia no traducible en el extremo 5' de 1512 nucleótidos. El RNAm que se origina cuando se activa el P2 contiene los exones C, D y E, así como una secuencia no traducible en el extremo 5' de 1727 nucleótidos. En los exones A, B y C existen múltiples codones de inicio (AUG). El exon D consta de 252 nucleótidos y es codificado por los dos promotores, además no presenta ningún codón de inicio y se caracteriza porque en cultivo celular puede iniciar la traducción al unirse de manera interna al ribosoma.

Muchos RNAm en *Drosophila* contienen regiones 5' no codificantes con muchos codones de inicio aparentemente obsoletos, esto sugiere que la unión interna al ribosoma puede ser un mecanismo común para que se inicie la traducción y posiblemente se lleve a cabo su regulación.

3.7.2 Unión de Antennapedia al ADN

La estructura tridimensional de Antennapedia (Fig. 11) analizada por espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (NMR) en solución, mostró tres α -hélices con una "vuelta" de 5 aminoácidos entre la hélice I y la hélice II, y una "vuelta" de 4 aminoácidos entre la hélice II y hélice III (Gehring *et al.*, 1992). La estructura tridimensional del motivo "hélice-vuelta-hélice" también se encuentra altamente conservada en los homeodominios de las homeoproteínas de diferentes especies (Qian *et al.*, 1989).

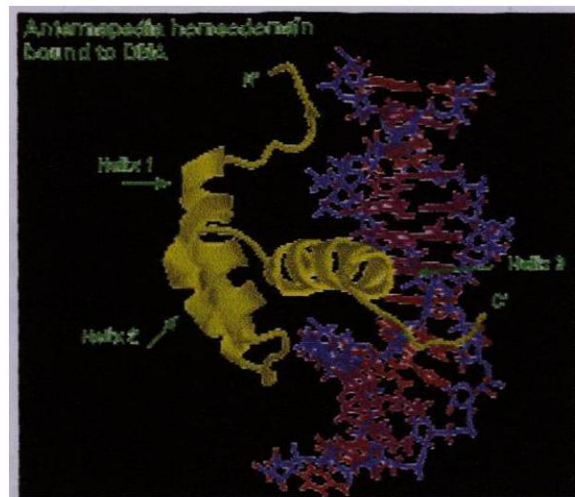


Figura 11. El contacto del HD de Antp en el ADN se realiza en la tercera hélice de reconocimiento

El análisis de los complejos Antp-ADN mostró que los contactos más importantes se localizan en la hélice de reconocimiento (III/IV) que se une al surco mayor del ADN mientras que el extremo N-terminal se une a bases específicas del surco menor del ADN (Otting *et al.*, 1990).

3.8 Genes blanco

Las homeoproteínas determinan el destino celular al actuar como factores de transcripción que regulan la expresión de otros genes, que en conjunto se denominan genes blanco. Los genes blanco de Antennapedia



son *connectin*, *apterous*, *spalt major* y *teashirt* (Manak *et al.*, 1995). Algunos genes blanco codifican para factores de transcripción, otros para proteínas estructurales, moléculas de superficie celular y factores de crecimiento. Dentro de los genes blanco mejor caracterizados a la fecha se encuentran *decapentaplegic* (*dpp*) y *teashirt* (*tsh*).

3.8.1 *Teashirt*

tsh es uno de los genes blanco de *Antennapedia* mas estudiado hasta la fecha (Manfroid *et al.*, 2003), es un gen homeótico específico de región que codifica para un factor de transcripción que tiene tres motivos atípicos de dedos de zinc. *tsh* se requiere para que los tres segmentos torácicos y los ocho segmentos abdominales en el embrión de *D. melanogaster* se desarrollen correctamente (Fasano *et al.*, 1991; Roder *et al.*, 1992; de Zulueta *et al.*, 1994) También se requiere en la morfogénesis de intestino medio (Mathies *et al.*, 1994), para el desarrollo de las partes proximales de los apéndices en el adulto (Erkner *et al.*, 1999; Wu y Cohen, 2000; Soanes *et al.*, 2001) y para moldear el ojo en la mosca adulta (Pan y Rubin, 1998; Bessa *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2002).

3.8.2 *Decapentaplegic*

El producto del gen *decapentaplegic* (*dpp*) pertenece a la familia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). Este gen fue el primer miembro de la familia de genes TGF- β que se encontró en organismos no mamíferos, sugiriendo que uno o mas miembros de esta familia existieron antes de que los linajes de los artrópodos y los vertebrados divergieran (Padgett *et al.*, 1987).

En embriones de *D. melanogaster*, es necesario para la gastrulación normal, para el establecimiento de la polaridad dorso-ventral y para la formación de la segunda constricción del intestino medio en el mesodermo visceral.

3.8.2.1 Mesodermo visceral

El intestino de *Drosophila melanogaster* esta compuesto de dos capas de células: el mesodermo visceral y las células endodermales. El mesodermo visceral es un buen modelo de estudio de los genes homeóticos dado que se expresan de manera tal que no se traslapan en diferentes bloques de células. La regulación de su desarrollo esta mediada por cuatro genes homeóticos: *Scr*, *Antp*, *Ubx* y *Abd-A*.

Durante la embriogénesis se forman tres constricciones en posiciones específicas del intestino medio de *Drosophila melanogaster*. La constricción del centro se forma entre los dominios de expresión de *Ubx* y



Abd-A, mediante la activación de *dpp* en el PS7 y *wg* en el PS8 respectivamente. Se ha visto que en ausencia de cualquiera de estos dos genes blanco, no se forma la constricción del centro correctamente (Capovilla y Botas, 1994). Se sabe que *exd* interactúa con Ubx en el PS7 para activar a *dpp*, ya que en ausencia de *exd*, *dpp* no se expresa correctamente y la segunda constricción no se forma (Rauskolb y Wieschaus, 1994).

3.8.2.2 Potenciadores del gen *dpp*

Capovilla y Botas en 1994 identificaron una secuencia de 674 pares de bases del potenciador del gen *dpp* (dpp674LacZ) capaz de dirigir la expresión del gen reportero lacZ en células del mesodermo visceral donde normalmente se expresa *dpp*. Al expresar ectópicamente ultrabithorax usando un promotor de choque térmico en embriones que contienen dpp674LacZ, se observó que dicho potenciador dirige la expresión de *dpp* en las células del mesodermo visceral que no expresan Abd-A del ps 2 al 7.

Por otro lado, Manak y cols en 1995 identificaron una secuencia de 813 pb en el potenciador del gen *dpp* que dirige la expresión de LacZ de forma similar al potenciador descrito por Capovilla.

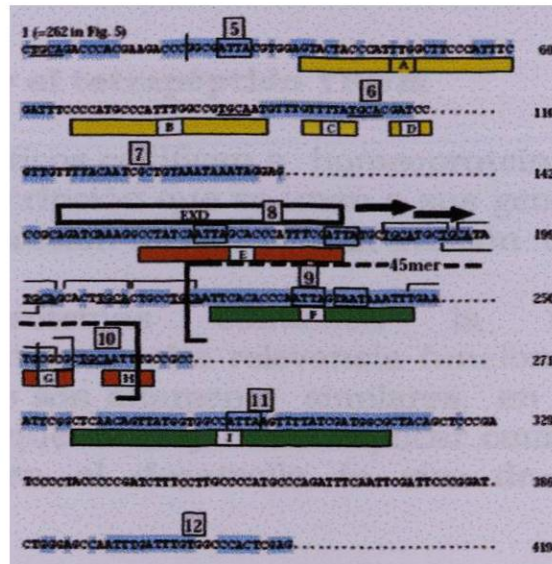


Fig 12. Sitios de unión de Ubx y Abd-A en el potenciador y dpp813LacZ. Tomada de Manak y cols., 1995

En ambos potenciadores se describieron los sitios de unión de Ubx y Abd-A y se observó que sus secuencias se traslapaban ya que el extremo 3' de dpp674LacZ corresponde a la región 5' de dpp813LacZ (Manak *et al.*, 1995). Un estudio mas detallado del potenciador dpp674LacZ demostró que la región 3' es necesaria para el correcto funcionamiento de este potenciador en la represión de la homeoproteína Abd-A (Capovilla y Botas,



1998). Se sabe que la expresión de *dpp* en el ps7 no depende totalmente de Ubx ya que en embriones donde no se expresa Ubx, se detectan pequeñas cantidades de *dpp* en el ps7 del mesodermo visceral (Rauskolb y Wieschaus 1994) lo que indica que es probable que existan otros elementos que activen su expresión.

En la figura 12 se muestra parte de la secuencia del potenciador dpp813LacZ, con los sitios de unión de Ubx y Abd-A en las cajas que se ubican en la parte inferior de la secuencia. Las cajas A, B, E, F e I de este potenciador corresponden a los sitios de unión de Ubx y Abd-A en el extremo 5' del potenciador dpp674LacZ (Manak *et al.*, 1995). En consecuencia, *dpp* responde a Ubx y Abd-A, ya que es gen blanco de ambas homeoproteínas. A pesar de que *dpp* no es gen blanco de Antp (Manak *et al.*, 1995), es decir, no tiene efecto alguno en su expresión, Rasulko y cols en 1994 describieron que en embriones donde no se expresaba Antp se observaba una ligera alteración en la expresión de *dpp* en el ps4 y 7 de mesodermo visceral. Además, Manak y cols en 1995 describieron el potenciador dpp813LacZ del gen *dpp* que reproduce su expresión en el ps7. También observaron que al sobre-expresar la homeoproteína Antp con un promotor de choque térmico se obtuvo una activación ectópica del potenciador dpp813LacZ en regiones anteriores al ps7.

3.9 Homeoproteínas y el tetrapéptido YPWM

Los genes homeóticos codifican a homeoproteínas; las cuales actúan como factores de transcripción que se unen a sus genes blanco específicos controlando así su expresión mediante la activación o represión génica.

Estas homeoproteínas contienen la región conservada (homeodominio) que presenta alta relevancia funcional ya que se unen a secuencias de ADN que son altamente similares, en algunos casos en las mismas células por lo que es muy difícil explicar como es que realizan las diferentes funciones en el desarrollo *in vivo* de la mayoría de los organismos.

Por otro lado, como se muestra en la tabla 1, al comparar la secuencia de aminoácidos de las diferentes homeoproteínas, se encontró que la mayoría presenta otra secuencia altamente conservada en el extremo N-terminal: el tetrapéptido YPWM, (Tirosina-Prolina-Triptofano-Metionina), también conocido como hexapéptido o pentapéptido (Phelan *et al.*, 1995).

El tetrapéptido YPWM es un motivo de carácter hidrofóbico y una cantidad variable de aminoácidos lo separan del homeodominio, la cual varía en las diferentes homeoproteínas y en sus isoformas.



El análisis de estructura mediante Resonancia Magnética Nuclear en solución del YPWM de Antennapedia muestran que este motivo no tiene una estructura definida en solución (Qian *et al.*, 1989). Estudios *in vitro* en los cuales se deleta o sustituye el tetrapéptido, se observa que no se altera la interacción ADN-proteína, de esto se concluye que este motivo no influye en la unión al ADN (Knoepfler y Mark, 1995).

3.9.1 Análisis de la función del tetrapéptido YPWM *in vitro*

Uno de los mecanismos mas estudiados de cómo los genes homeóticos realizan su actividad tejido-específico, es mediante la interacción con cofactores. En *Drosophila* uno de los cofactores mas estudiados es el producto del gen *extradenticle* (*exd*), ya que su ausencia tanto cigótica como materna origina mutaciones homeóticas, pero no altera la expresión de los genes homeóticos (Mann *et al.*, 1999). Exd, también tiene su ortólogo en vertebrados: Pbx que es un oncogen que transforma las células pre-B normales en cancerosas; existen tres tipos diferentes: Pbx1, Pbx2 y Pbx3, el primero es el más estudiado.

TABLA 1
Conservación del tetrapéptido en varias clases de homeoproteínas

Antennapedia		Sex combs reduced	
<i>D. melanogaster</i> Antp	LYPWNR	<i>D. melanogaster</i> Scr	IYPWNR
<i>D. melanogaster</i> Ubx	FYPWNA	<i>M. musculus</i> Hoxa-5	IYPWNR
<i>D. melanogaster</i> abd-A	RYPWNT	<i>X. laevis</i> Hoxb-5	IFPWNR
<i>Xenopus laevis</i> Hoxc-6	IYPWNR	<i>M. musculus</i> Hoxb-5	IFPWNR
<i>Mus musculus</i> Hoxc-6	IYPWNR	<i>Homo sapiens</i> Hoxc-5	IYPWNT
<i>M. musculus</i> Hoxb-6	VYPWNR	Proboscipedia	
<i>M. musculus</i> Hoxb-7	IYPWNR	<i>D. melanogaster</i> pb	EYPWNR
<i>M. musculus</i> Hoxb-8	LFPWNR	<i>M. musculus</i> Hoxb-3	IFPWNR
<i>X. laevis</i> Hoxb-8	LFPWNR	<i>H. sapiens</i> Hoxb-2	EFPWNR
<i>M. musculus</i> Hoxd-8	MPFWNR	<i>H. sapiens</i> Hoxd-3	IFPWNR
<i>M. musculus</i> Hoxc-8	MPFWNR	Empty spiracles	
Deformed		<i>D. melanogaster</i> ems	LYPWLL
<i>D. melanogaster</i> Dfd	IYPWNR	<i>H. sapiens</i> EMX1	FYPWVL
<i>M. musculus</i> Hoxd-4	VYPWNR	<i>H. sapiens</i> EMX2	FYPWLI
<i>M. musculus</i> Hoxa-4	VYPWNR		
<i>X. laevis</i> Hoxb-4	VYPWNR		
<i>M. musculus</i> Hoxb-4	VYPWNR		
<i>M. musculus</i> Hoxc-4	VYPWNR		

Tomada de Saskia *et al.*, 1995

El análisis de interacción con ADN *in vitro* ha demostrado que tanto *exd* como Pbx forman heterodímeros con las homeoproteínas uniéndose a secuencias de ADN específicas, siendo dicha interacción a través del tetrapéptido YPWM (Sprules *et al.*, 2003). Esto último, fue demostrado en el sistema de dos híbridos de levaduras donde se requería la interacción de ultrabithorax con *exd* para activar al gen reportero *LacZ*, y al sustituir los tres últimos aminoácidos del YPWM de ultrabithorax por un bloque de



alaninas, se perdió la capacidad de activar a *LacZ* (Johnson *et al.*, 1995). Estos resultados demostraron que el tetrapéptido es necesario para la interacción Ubx-exd.

En 1999 Passner y cols., analizaron este complejo mediante Cristalografía de Rayos X que les permitió proponer un modelo de unión a ADN de Ultrabithorax-Extradenticle, en donde el YPWM de Ubx se une a un sitio hidrofóbico del homeodominio de extradenticle (Fig. 13).

Así mismo, en el caso del cofactor Pbx se ha determinado que la sustitución de los últimos dos residuos del YPWM (triptófano y metionina) por alaninas o la delección completa del motivo, elimina la unión de Pbx1a con Hoxd-4, Hoxb6 y Hoxb7 (Phelan, 1995 y Chang, 1996). Experimentos de EMSA (del inglés: Electrophoretic mobility shift assay) y competencia de péptidos han demostrado que el tetrapéptido YPWM incrementa la capacidad de unirse a Pbx y que el heterodímero formado posee una mayor afinidad por el ADN (Koepfler y Mark, 1995). Además, el análisis de la estructura del complejo Hox/Pbx/ADN mediante Cristalografía de Rayos X, mostró que en el homeodominio de Pbx se forma un sitio hidrofóbico donde se une el YPWM, a manera de interacción llave-cerradura (Qiang y Kamps, 1996 y Sprules *et al.*, 2003).

Aunque el tetrapéptido es en muchos casos indispensable para la interacción proteína-cofactor, también se requiere el homeodominio y en algunos casos el enlazador o linker: región que une al homeodominio y al tetrapéptido (Shen *et al.*, 1997).

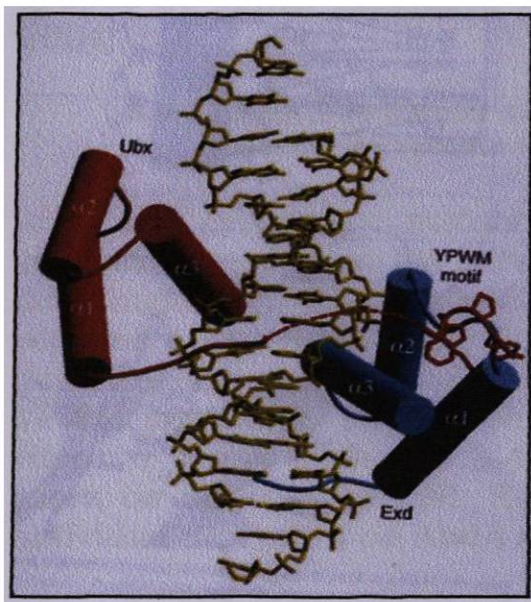


Figura 13 . Complejo Ubx-Exd-ADN

Ocho de los nueve genes homeóticos del locus Hox-B codifican para proteínas que contienen un hexapéptido conservado. Las ocho proteínas (HoxB-1 a HoxB-8) se unen al ADN en presencia de Pbx1a, esto no ocurre si se encuentran solo las proteínas Hox sin Pbx1a (Shen *et al.*, 1996).

En el caso de HoxB-8 el hexapéptido, así como su distancia relativa al homeodominio son importantes para la unión cooperativa entre ADN, HoxB-8 y Pbx (Neuteboom *et al.*, 1995).

Abd-B y sus ortólogos en vertebrados, como Hoxa9, Hoxa10 y Hoxb9, presentan un tetrapéptido muy diferente al de las homeoproteínas de la clase Antennapedia. Sin



embargo, conserva el triptofano (W) y cuando se realiza la mutación de este residuo, Abd-B es incapaz de unirse a Pbx (La-Ronde y Wolberger, 2003).

3.9.2 Análisis funcional de YPWM utilizando al ratón como modelo de estudio

Hasta la fecha, pocos estudios se han centrado en el análisis funcional del tetrapéptido YPWM *in vivo*. En el caso de HoxB-8, la mutación del hexapéptido en los ratones, muestra el mismo fenotipo que se observa cuando los genes Hox HoxA-7, HoxB-7 y HoxB-9 han perdido su función. Así mismo, examinaron sus respectivos patrones de expresión, y no se observó ninguna variación. Estos resultados sugirieron que la mutación de HoxB-8 en el hexapéptido alteraba la función de HoxA-7, HoxB-7 y HoxB-9 al unirse a sus secuencias blanco (Medina-Martinez *et al.*, 2003).

En otro estudio realizado con Hox-1, se observó que al mutar la secuencia de su hexapéptido se eliminó la interacción con Pbx, así como su actividad en potenciadores blancos en modelos celulares. Por otro lado, la mutación del hexapéptido de HoxA-1 presentó defectos en ratones similares a los que se presentan cuando HoxA-1 pierde su función (Remacle *et al.*, 2004). Lo anterior, sugiere que la actividad de HoxA-1 depende de su interacción con Pbx y que ocurre a través del hexapéptido.

Se ha propuesto que la interacción Hox-Pbx es importante en los grupos de genes parálogos de 3' como HoxA-1 y HoxB-1 (Remacle *et al.*, 2004).

3.9.3 Análisis funcional de YPWM utilizando a la mosca de la fruta como modelo de estudio

En *Drosophila melanogaster* la homeoproteína Abd-A reprime la expresión de *dpp* en los parasegmentos (ps) 8 al 12, y activa la expresión de *wingless* (wg) en el ps8. Cuando se expresa ectópicamente, Abd-A reprime a *dpp* en el ps 3, 4 y 7 y activa a wg en segmentos anteriores al ps8. En embriones donde se expresa ectópicamente Abd-A con el motivo YPWM sustituido por un bloque de alaninas, se pierde la capacidad de reprimir a *dpp* en los ps 3, 4 y 7, pero es capaz de seguir activando a wg fuera de su sitio normal. En resumen, la mutación de YPWM cambió la actividad represora de AbdA a activadora (Graba *et al.*, 2003).

En la homeoproteína labial, el motivo YPWM también juega un papel represor. El tetrapéptido impide la interacción de esta homeoproteína con el ADN, ya que es incapaz de activar a sus genes blanco y de esta manera los reprime. Labial necesita a extradenticle para unirse al ADN y actuar como factor de transcripción, es decir, activar sus genes blanco. Cuando



se muta el tetrapéptido, labial puede unirse al ADN sin necesidad de exd (Chan *et al.*, 1996). En base a este y otros estudios se ha establecido que el hexapéptido de labial inhibe la unión de esta homeoproteína al ADN y que EXD induce un cambio conformacional en labial que aumenta su especificidad. Además, se ha observado que al sobre-expresar de manera ectópica la homeoproteína labial silvestre y mutante en el hexapéptido se observa el mismo efecto, sin embargo la letalidad aumenta en un 50% cuando se sobre-expresa la homeoproteína labial mutante en el hexapéptido (Chan *et al.*, 1996).

Debido a que HoxA-5 es el ortólogo en mamíferos de Scr y también contiene el motivo YPWM, solo que se le denomina hexapéptido, se evaluó la función del hexapéptido de HoxA-5 en moscas transgénicas. Una línea contenía la secuencia completa de HoxA-5 unida a un promotor de choque térmico, mientras que otra contenía la secuencia de HoxA-5 con el hexapéptido deletado unida también a un promotor de choque térmico. Al sobre-expresar ambas proteínas se encontró que solo la homeoproteína con la secuencia completa de HoxA-5 fue capaz de reproducir las funciones de la homeoproteína Scr, mientras que ningún efecto se presentó cuando se sobre-expresó la proteína que tenía el hexapéptido deletado (Zhao *et al.*, 1996).

La homeoproteína Ultrabithorax (Ubx) define la identidad del primer segmento abdominal (A1) en larvas de tercer estadio de *D. melanogaster*. Al expresar ectópicamente Ubx, se transforma el tercer segmento torácico (T3) en A1. La sustitución en los tres últimos aminoácidos del YPWM por alaninas y su expresión ectópica, originó que los segmentos torácicos se transformaron en el segundo segmento abdominal (A2) (Galant *et al.*, 2002). En el embrión de *D. melanogaster* Ubx juega un papel tanto represor como activador. En el mesodermo visceral, Ubx activa la transcripción del gen *dpp* en el parasegmento 7, donde *dpp* es necesario para que se forme la segunda contricción del intestino medio. En la epidermis del tórax embrionario, Ubx activa y mantiene la activación del gen *teashirt* (*tsh*). En la epidermis ventral del abdomen embrionario, las homeoproteínas Ubx y Abd-A previenen la formación de extremidades al reprimir directamente la transcripción de gen *Distal-less* (*Dll*) que promueve la formación de apéndices (Vachon *et al.*, 1992). Al sobre-expresar la isoforma la de Ubx en embriones de *D. melanogaster*, se obtiene una activación ectópica de *dpp* en mesodermo visceral y de *tsh* en epidermis, así como una represión de *Dll*. Interesantemente, al deletar el motivo YPWM, Ubx perdió la capacidad de reprimir a *Dll*, pero conserva la capacidad de activar *dpp* y *tsh*. (Tour *et al.*, 2005). Esto quiere decir que el tetrapéptido YPWM puede o no ser indispensable, dependiendo de la homeoproteína así como de su gen blanco.



Actualmente, extradenticle se considera cofactor de ultrabithorax y de abdominal-A necesario para activar a *dpp* y a *wg* respectivamente (Graba *et al.*, 2003). Sin embargo, *exd* no es necesario para que Abd-A reprima a *dpp*, ni para que Ubx regule la formación de halterios o balancines y suprima la formación del ala (Galant *et al.*, 2002). Existen otros cofactores que interaccionan con YPWM en Antp (Prince *et al.*, 1996) y probablemente otros no identificados hasta la fecha y/o las homeoproteínas no siempre requieren de cofactores para realizar su función.

En nuestro laboratorio Canales-del Castillo (2005) demostró que la expresión de Antp ectópica activó a los genes blanco *tsh* y las secuencias reguladoras de *Scr*. Interesantemente, la proteína mutante en YPWM (Antp^{AAAA}) no fue capaz de activar a *tsh* y al elemento *fkh* ni de reprimir la expresión de *Scr*. Es decir, el tetrapéptido YPWM es necesario para la activación y represión de los genes blanco en Antp. Lo anterior es altamente relevante ya que la actividad funcional de los diferentes genes blanco puede ser regulada por interacciones proteína-proteína a través del tetrapéptido YPWM modulando la selección de los genes blanco de Antp que permiten el desarrollo del tórax reprimiendo los genes de la cabeza en *D. melanogaster*.

En base a todo lo anteriormente descrito, el tetrapéptido YPWM ha mostrado ser necesario para que diferentes homeoproteínas activen o repriman sus genes blanco y/o sus secuencias reguladoras (potenciadores). En el caso de la homeoproteína Antp este motivo mostró ser indispensable para su actividad funcional en los genes blanco *tsh*, *Scr* y *fkh[con]*, por lo que decidimos analizar si este tetrapéptido es necesario en la activación del potenciador dpp674LacZ.



4. IMPORTANCIA DEL TRABAJO

Las regiones altamente conservadas en las homeoproteínas, como el homeodominio y el motivo YPWM, de los diversos organismos permiten la actividad funcional de estas homeoproteínas. Los homeodominios están ampliamente estudiados mediante su reconocimiento a las secuencias nucleotídicas en el ADN. Sin embargo, se cuenta con muy poca información acerca de la actividad funcional del tetrapéptido YPWM en sistemas *in vivo*. Interesantemente, los resultados obtenidos en nuestro laboratorio por Canales-del Castillo en el 2005 permiten concluir que el tetrapéptido "YPWM" de Antp es indispensable y crucial para la activación y represión de los genes blanco *tsh*, *fkh* y *scr*. El mecanismo molecular de activación-represión de los genes blanco explica la interacción con diferentes cofactores en una forma dinámica en los diferentes genes blanco para permitir la especificidad funcional de las diferentes homeoproteínas durante el desarrollo embrionario de *D. melanogaster*. Debido a lo anterior, en este trabajo analizaremos el requerimiento del motivo YPWM en la proteína homeótica Antennapedia para la activación del potenciador dpp674LacZ de *decapentaplegic* (dpp).

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar si el motivo YPWM de la homeoproteína Antennapedia es necesario para la activación del potenciador dpp674LacZ del gen blanco *dpp* en el mesodermo visceral.

5.1 Objetivos particulares

1) Amplificar las líneas de moscas wild type y transgénicas: Oregón (wild type), HS-Gal4, ptch-Gal4, dpp674LacZ, HS-Antp, UAS-Antp silvestre y UAS-Antp AAAA

2) Caracterizar el patrón de expresión endógena del potenciador dpp674LacZ.

3) Diseñar y realizar de las siguientes cruas genéticas con las moscas transgénicas

HS-Antp	x	dpp674LacZ
HS-GAL4/ dpp674LacZ	x	UAS-Antp wt
HS-GAL4/ dpp674LacZ	x	UAS-Antp ^{AAAA}
ptc-GAL4	x	dpp674LacZ
ptc-GAL4/dpp674LacZ	x	UAS-Antp wt
ptc-GAL4/ dpp674LacZ	x	UAS- Antp ^{AAAA}

4) Estandarizar la activación del potenciador dpp674LacZ mediante la expresión ectópica de la homeoproteína Antp silvestre.



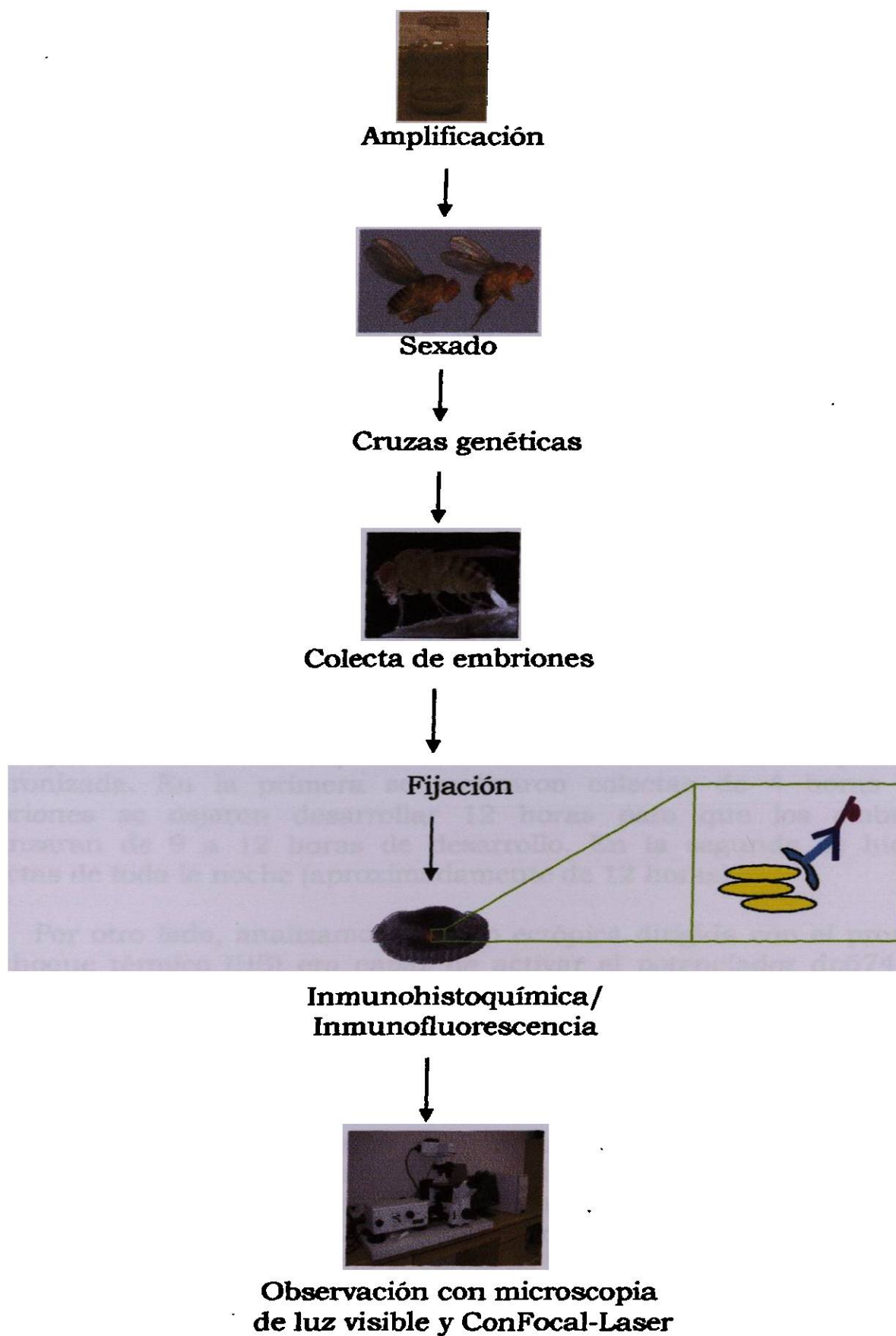
5) Determinar la activación ectópica del potenciador dpp674LacZ mediante la expresión ectópica de la homeoproteína Antp mutante con el tetrapéptido sustituido por un bloque de alaninas.

6. HIPOTESIS

El motivo YPWM de la homeoproteína Antennapedia que se encuentra hacia el extremo N-terminal es necesario para que esta homeoproteína reconozca y active el potenciador dpp674LacZ de *dpp* en el mesodermo visceral del embrión de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*.



7. ESTRATEGIA GENERAL





8. MATERIALES Y MÉTODOS

Para confirmar que las moscas presentaran el patrón expresión del potenciador dpp674LacZ, se amplificaron las líneas que contienen la construcción 674dppLacZ (152 y 153). Una vez que se obtuvieron suficientes adultos (alrededor de 250) se realizaron colectas de 4 horas y los embriones se dejaron desarrollar 12 horas para que tuvieran de 9 a 12 horas de desarrollo y parte de la población estuviera en el estadio 13, que ocurre de las 10h30 a las 11h30.

Posteriormente, realizamos la detección del patrón de Antp endógena. Para ello, se amplificó la línea Oregon y una vez que se obtuvieron suficientes adultos, se realizaron colectas de 4 horas y los embriones se dejaron desarrollar 12 horas. Después analizamos el patrón de expresión de Antp ectópica dirigida con el potenciador de choque térmico (HS) se amplificó la línea HS-Antp. Una vez que se obtuvieron suficientes adultos (alrededor de 250) se indujo la sobre-expresión de Antp siguiendo el protocolo establecido por M. Capovilla en 1994, el cual consiste en colectar embriones durante seis horas, dejar que se desarrollen seis horas, darles un choque térmico de 37°C durante 30 minutos y dejar que se desarrollen cuatro horas más.

Además, determinamos el patrón de expresión de Antp ectópica dirigida con el potenciador *patched* (*ptc*). Para ello, se amplificaron las líneas *ptc*-Gal4 y UAS-Antp, se colectaron hembras vírgenes de la línea *ptc*-Gal4 y se cruzaron con machos de la línea UAS-Antp. Después se realizó la cruce y se hicieron dos tipos de colectas: una sincronizada y otra no sincronizada. En la primera se realizaron colectas de 4 horas y los embriones se dejaron desarrollar 12 horas para que los embriones alcanzaran de 9 a 12 horas de desarrollo. En la segunda se hicieron colectas de toda la noche (aproximadamente de 12 horas).

Por otro lado, analizamos si Antp ectópica dirigida con el promotor de choque térmico (HS) era capaz de activar el potenciador dp674LacZ. Para ello, se amplificaron las líneas HS-Antp y dpp674LacZ (152), se colectaron hembras vírgenes de la línea HS-Antp y se cruzaron con machos de la línea dpp674LacZ (152). Para inducir Antp ectópica se siguió el protocolo establecido por M. Capovilla en 1994 previamente descrito.

Posteriormente, determinamos si Antp ectópica dirigida con el potenciador *patched* (*ptc*) era capaz de activar la expresión ectópica del potenciador dpp674LacZ. Para esto, se amplificaron las líneas *ptc*-Gal4, UAS-Antp y dpp674LacZ (153) y se realizaron dos cruces genéticas. En la primera, se colectaron hembras vírgenes de la línea *ptc*-Gal4 y se cruzaron con machos de la línea dpp674LacZ (153). En la segunda se colectaron



hembras vírgenes de la primera cruce (*ptc*-Gal4/*dpp674LacZ*) y se cruzaron con machos de la línea UAS-Antp.

Finalmente, analizamos si las dos líneas (A010-7 y A010-11) de Antp mutantes en el tetrapéptido YPWM (Antp^{AAAA}) dirigidas con el potenciador *patched* (*ptc*) eran capaz de activar la expresión ectópica del potenciador *dpp674LacZ*. Lo anterior se realizó mediante amplificación de las líneas *ptc*-Gal4, UAS-Antp A010-7, UAS-Antp A010-11 y *dpp674LacZ* (153) y se realizaron dos cruces genéticas. En la primera, se colectaron hembras vírgenes de la línea *ptc*-Gal4 y se cruzaron con machos de la línea *dpp674LacZ* (153). En la segunda se colectaron hembras vírgenes de la primera cruce (*ptc*-Gal4/*dpp674LacZ*) y se cruzaron con machos de la línea UAS-Antp A010-7 y machos de la línea UAS-Antp A010-11.

Para inducir la expresión de Antp ectópica con el potenciador *ptc* en las cruces de Antp y sus mutantes, se realizaron colectas de 4 horas y los embriones se dejaron desarrollar 12 horas, debido a que el potenciador *ptc* se expresa desde etapas tempranas durante el desarrollo del embrión y no es necesario ningún tipo de estímulo externo, como es el caso del promotor de choque térmico.

En todos los casos, una vez que los embriones alcanzaron el tiempo de desarrollo deseado, se les removió el córion (decorionización), fueron fijados y posteriormente se les removió la membrana vitelina (devitelinización). Los embriones se almacenaron a -20°C y cuando se tenían suficientes se realizó la inmunofluorescencia o la inmunohistoquímica para detectar el patrón de expresión de Antp y del potenciador *dpp674LacZ*. Este último se visualizó al detectar β -galactosidasa, que es codificada por el gen reportero *LacZ*.

A continuación se describe con más detalle cada paso de la metodología: la amplificación, sexado, realización de cruces genéticas, colecta de embriones, decorionización, fijación, devitelinización, inmunofluorescencia e inmunohistoquímica.

8.1 Descripción de líneas de moscas transgénicas

Las líneas de moscas transgénicas utilizadas en este trabajo fueron las siguientes:

Oregon (wild type o silvestre): Esta línea es *Drosophila melanogaster* silvestre o wildtype, es decir, no tiene ninguna construcción.

HS-Antp: Esta línea productora contiene un promotor de choque térmico fusionado río arriba de la secuencia que codifica para la homeoproteína Antennapedia silvestre. La inserción se encuentra en el tercer cromosoma.



ptc-Gal4/Cyo;FICI/MKRS: Esta línea productora contiene el potenciador *patched* fusionado río arriba de la secuencia que codifica para el factor transactivador de levadura Gal4. La inserción se localiza en el segundo cromosoma y tienen como marcador fenotípico el balanceador Curly, es decir alas rizadas.

dpp674LacZ F7 (II) 13.378 (152): Esta línea reportera contiene el potenciador de 674 pares de bases del gen *decapentaplegic* (*dpp*) fusionado río arriba con el gen reportero *LacZ*. La inserción se localiza en el segundo cromosoma.

dpp674LacZ 719 (III) 13.379 (153): Esta línea reportera contiene el potenciador de 674 pares de bases del gen *decapentaplegic* (*dpp*) fusionado río arriba con el gen reportero *LacZ*. La inserción se localiza en el tercer cromosoma.

yw; UAS-Antp: Esta línea reportera contiene las secuencias UAS fusionadas río arriba de la secuencia que codifica para la homeoproteína Antp silvestre.

yw; UAS-Antp ΔHD 6.1. Esta línea reportera contiene las secuencias UAS fusionadas río arriba a la secuencia que codifica para la homeoproteína Antp con delección del homeodominio. Esta delección incluye los aminoácidos 246 al 463 de la proteína Antp y abarca toda la región del homeodominio, el extremo N-amino terminal de este, la región del tetrapéptido YPWM y parte de la región central de la homeoproteína. La inserción se localiza en el tercer cromosoma.

yw; UAS-Antp A010-7: Esta línea reportera contiene las secuencias UAS fusionadas río arriba de la homeoproteína Antp mutante en el tetrapéptido YPWM, el cual está substituido por un bloque de alaninas. La inserción se localiza en el segundo cromosoma.

yw; UAS-Antp A010-11: Esta línea reportera contiene las secuencias UAS fusionadas río arriba de la homeoproteína Antp mutante en el tetrapéptido YPWM, el cual está substituido por un bloque de alaninas. La inserción se localiza en el tercer cromosoma.

8.2 Amplificación y mantenimiento de las líneas de moscas transgénicas

Todas las líneas de *Drosophila melanogaster* se mantuvieron como homocigotas viables o líneas balanceadas a 18°C en tubos con comida estándar (agar, harina de maíz, azúcar, levadura y propionato de sodio) suplementada con levadura seca activa. Las líneas se amplificaron depositando alrededor de 200 moscas en frascos con comida estándar



durante 2 a 5 días o hasta que se observó la presencia de embriones a 25°C y 60% de humedad. Dependiendo de la línea los adultos tardaron de 10 a 14 días en eclosionar.

8.3 Sexado y realización de cruzas genéticas

Una vez que las moscas empiezan a nacer, se vacía el frasco y después de no mas de 8 horas transcurridas a 25°C o 12 horas a 18°C, los adultos se anestesian con bióxido de carbono y con ayuda del estereoscopio, se realiza el sexado en base a su dimorfismo sexual: a) El tamaño de las hembras por lo general es mayor que el de los machos, b) Las hembras tienen los últimos tres segmentos abdominales separados y la coloración de éstos es uniforme, mientras que los machos presentan los últimos tres segmentos abdominales fusionados y melanizados, c) La punta del abdomen es redondeada en machos y puntiaguda en hembras, y d) los machos presentan peines sexuales: una hilera de aproximadamente 10 cerdas cortas y gruesas, de color oscuro y con apariencia de peine que se localizan en la región basal del tarso de las patas del primer segmento torácico.

En las cruzas génicas se utilizaron machos de una línea o cruza y hembras vírgenes de otra. Las hembras vírgenes son aquellas que tienen menos de ocho horas de desarrollo a 25°C o menos de 12 horas a 18°C.

Las cruzas de moscas se realizaron en la proporción 3:1 (hembra:macho), se dejaron aparear por 12 horas a 25°C y se mantuvieron viables en frascos con comida estándar suplementada con levadura activa seca.

8.4 Colecta, decorionización, fijación y devitelinización de los embriones de *D. melanogaster*

A) Colecta. Las moscas producto de las cruzas, se colocaron en un matraz de plástico con perforaciones en la base y en el cuello se colocó una caja de petri pequeña que se conoce como caja de puesta (agar, azúcar, jugo de frutas y ácido propiónico). A esta caja se le realizaron estrías con unas pinzas y se les agregó un poco de levadura en polvo. El matraz se invirtió de tal manera que la caja de puesta quedó en la base y las moscas se pusieron a ovopositar a 25°C.

B) Decorionización. Los embriones están protegidos del medio ambiente por una cubierta gruesa llamada corión, de la cual salen dos proyecciones que le sirven al embrión para fijarse al alimento. Para eliminar esta cubierta, los embriones se lavaron durante tres minutos con cloro al 4%, se pasaron a una malla a través de un filtro/ embudo, se lavaron con agua destilada, se enjuagaron con Tritón X-100 0.03%/ NaCl



0.04% y finalmente se lavaron otra vez con agua destilada. Se observaron los embriones al estereoscopio y la ausencia de las proyecciones del embrión, indica que la decorionización se ha realizado de forma correcta.

C) Fijación. En un tubo eppendorf de 1.5mL, se mezclaronn 500 μ L de heptano, 100 μ L de formaldehído y 400 μ L del buffer PIPES, después se agregaron los embriones y se colocaron en el brazo de agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente.

D) Deviltelinización. Se eliminó la mitad del sobrenadante, dejando la fase de fondo (los 500 μ L de heptano) y se agregaron 500 μ L de metanol. Se colocaron en el brazo de agitación a temperatura amiente durante 5 minutos. Después se eliminó todo el sobrenadante y se hicieron tres lavados con metanol al 100% agitando por inversión. Los embriones se almacenaron a -20°C toda la noche o se durante meses.

8.5 Detección de β -galactosidasa y Antennapedia en embriones de *D. melanogaster*

Este procedimiento se realizó a temperatura ambiente, a menos que se especifique lo contrario. Los embriones se rehidrataron reemplazando sucesivamente el metanol con 30%, 50%, 70% y 100% de PBS/metanol (v/v). Se agitaron por inversión y se dejaron 5 minutos en cada solución; se permeabilizaron eliminando el sobrenadante y agregando 500 μ L de PBS + Tritón X-100 0.1% (PBT), se agitaron por rotación durante una hora. Para bloquear se eliminó el sobrenadante y se agregaron 500 μ L de PBT + albúmina sérica bovina (BSA) 10%, preparada al momento. Se colocaron en el brazo de agitación durante una hora.

Se agregaron 20 μ L de la dilución con el anticuerpo primario diluido en PBT/BSA 0.1%, preparada al momento, o el volumen suficiente para cubrir los embriones, se agitaron con una micropipeta y se dejaron incubando toda la noche a -4°C. Como anticuerpos primarios se utilizaron anti- β -gal de conejo y anti- β -gal de ratón con diluciones de 1:100 y 1:500 respectivamente y anti-Antp 4C3 de ratón diluido 1:250. Después de no mas de 24 horas de haber colocado el anticuerpo primario se hizo un lavado rápido por inversión y tres de 30 minutos con PBT agitando por rotación. Se eliminó el sobrenadante y se agregó el segundo anticuerpo un anti-ratón o un anti-conejo, dependiendo del anticuerpo primario utilizado, diluido en PBT/BSA 0.1% preparada al momento. Para anti-Antp de ratón, se utilizó el anti-ratón acoplado al fluorocromo FITC diluido a 1:200; para anti- β -gal de ratón se utilizó el anti-ratón acoplado a la enzima peroxidasa de rábano (HRP) diluido a 1:250; y para anti- β -gal de conejo se utilizó el anti-conejo acoplado al fluorocromo Alexa diluido a 1:50 Se agregaron 20 μ L de la dilución o el volumen suficiente para cubrir los embriones. Se agitaron con una micropipeta y se incubó de 3 a 4 horas a temperatura



ambiente. Si se utilizaron anticuerpos acoplados a un fluorocromo, el tubo eppendorf se envolvió con papel aluminio evitando así la exposición a la luz. Una vez transcurridas las horas de incubación, se eliminó el sobrenadante, se realizó un lavado rápido por inversión y 2 de 30 minutos con PBT agitando por rotación, seguidos de dos lavados rápidos por inversión con PBS 1x + Tween 20 0.05%.

Para la detección cuando se utiliza el anticuerpo conjugado con HRP, se agregaron 1 mL de 3-3 diaminobenzidina 0.3mg/mL y 2µl de peróxido de hidrógeno al 3% y se dejaron incubando por 5 a 10 minutos o hasta la aparición de la reacción colorimétrica en los embriones. Se detuvo la reacción con varios lavados con PBS 1X + Tween 20 0.05%. Posteriormente se deshidrataron reemplazando el PBS 1X + Tween 20 al 0.05%. sucesivamente el con 30%, 50%, 70% y 100% de etanol /PBS (v/v) durante 2 minutos cada uno y finalmente se agregan 60 µl de glicerol 40%/ PBS60% (v/v) y se montaron en un portaobjetos colocándoles un cubreobjetos.

Para la detección cuando se utiliza anticuerpo conjugado con FITC, después de los lavados con PBS + Tween 20 0.05% se deshidrataron los embriones agregando sucesivamente etanol /PBS (v/v) al 30%, 50%, 70% y 100% durante 2 minutos cada uno y finalmente se agregaron 60 µL de glicerol 40%/ PBS60% y se montaron en un portaobjetos colocándoles un cubreobjetos.

La detección de las señales específicas en los embriones se realizó mediante observación en Microscopia visible de las reacciones enzimáticas (HRP). Para la detección de las señales fluorescentes se utilizó microscopia confocal-láser con un Microscopio Olympus IX70, usando el canal de detección BA510IF y BA550RIF, con 556 nm (rojo) y 494 nm (verde) de longitud de onda de excitación respectivamente y una apertura confocal mínima para obtener la máxima resolución de las imágenes.



9. RESULTADOS

Para determinar si el tetrapéptido YPWM de la homeoproteína Antp era necesario para activar el potenciador dpp674LacZ en embriones de *Drosophila melanogaster* de estadio 13, primeramente se confirmó el patrón de expresión del potenciador dpp674LacZ. Posteriormente se analizó la expresión endógena y ectópica de Antp dirigida con dos sistemas: un promotor de choque térmico (HS) y el potenciador *patched* (*ptc*). Finalmente, se evaluó el efecto de la expresión ectópica de Antp mutante en el tetrapéptido YPWM (UAS-Antp^{AAAA}) dirigida con *ptc* en la expresión del potenciador dpp674LacZ, en comparación con la expresión ectópica de Antp silvestre. Cada punto se describe a continuación.

9.1 Visualización del patrón de expresión de dpp674LacZ

El primer punto de la estrategia a seguir para determinar si el tetrapéptido YPWM de la homeoproteína Antp era necesario para activar el potenciador dpp674LacZ en embriones de *D. melanogaster*, consistió en visualizar el patrón de expresión del potenciador dpp674LacZ que mas adelante se utilizará para evaluar el efecto de Antp silvestre y mutante sobre dicho potenciador. Así que se analizaron dos líneas transgénicas de *D. melanogaster* que contenían la construcción dpp674LacZ (líneas 152 y 153; ver materiales y métodos). Esta construcción consiste en el potenciador o “enhancer” (de aquí en adelante denominado potenciador) de 674 pb del gen dpp unido al gen reportero LacZ, el cual codifica para la proteína β -galactosidasa como se muestra en la figura 14.

Estas líneas de moscas transgénicas contienen el transgen en el segundo (línea 152) y el tercer cromosoma (línea 153). Los resultados obtenidos en las dos líneas mostraron como se esperaba que este potenciador dirige la expresión del gen reportero LacZ al parasegmento 7 (ps7) del mesodermo visceral en embriones de estadio 13 que ocurre de las 10 h 30 a las 11 h 30 de desarrollo. En la figura 15A se muestra el patrón de la línea 152 y en la figura 15B el patrón de la línea 153, los embriones procesados mediante inmunofluorescencia e inmunohistoquímica respectivamente.

9.2 Expresión ectópica de Antennapedia utilizando dos sistemas de expresión

De los ocho genes homeóticos que establecen el eje antero-posterior en el embrión de *D. melanogaster*, aquí se estudió Antennapedia. Antes de dirigir esta homeoproteína de manera ectópica, se visualizó el patrón de expresión de Antp endógena en embriones de estadio 13 de la línea silvestre Oregon (sin construcciones). Los resultados mostraron, como se



esperaba que dicha homeoproteína se expresa del parasegmento 3 al 5 y a lo largo del cordón nervioso del sistema nervioso central como se muestra en la figura 16A.

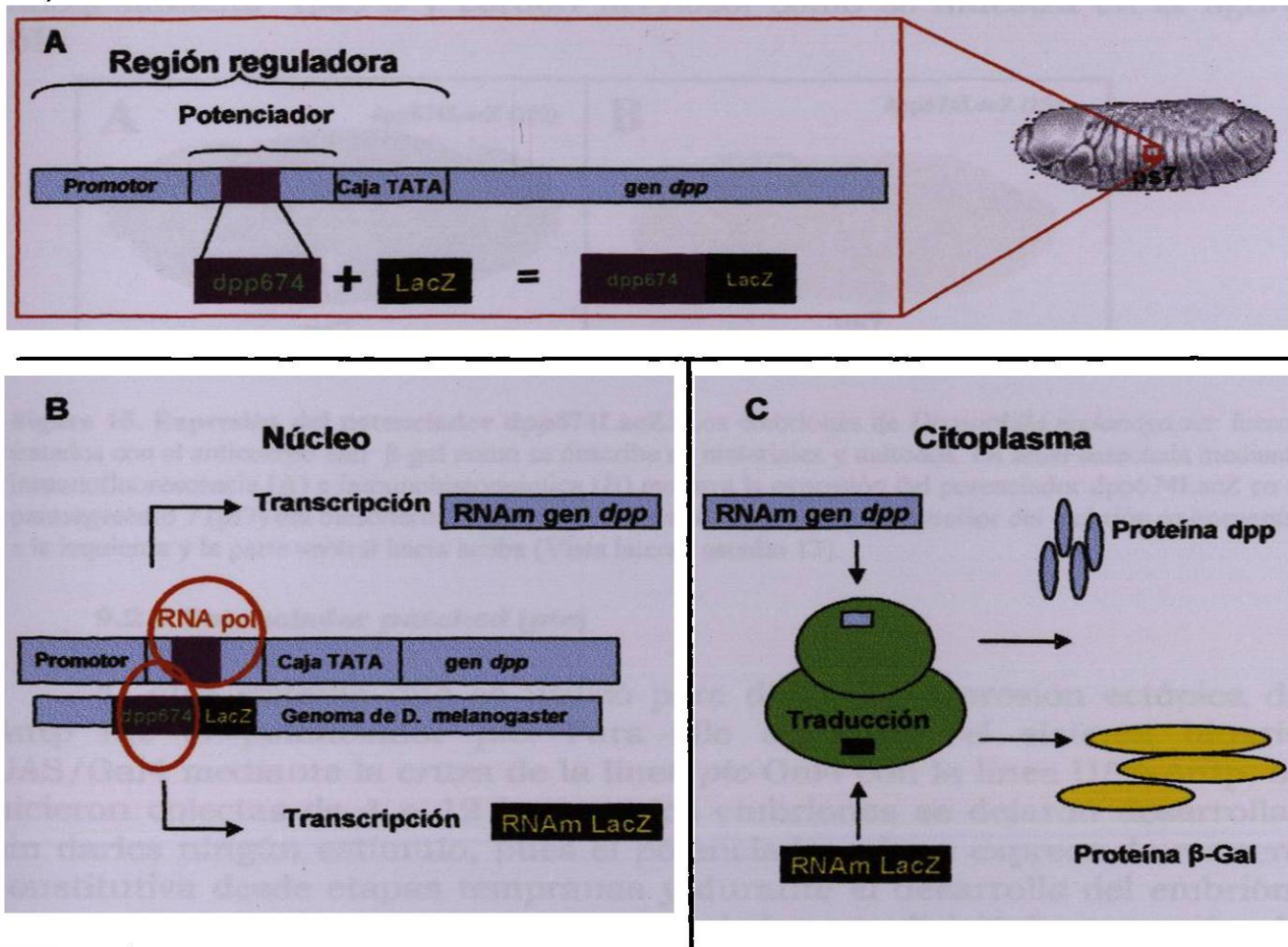


Figura 14. Línea transgénica dpp674LacZ en *Drosophila melanogaster*. A. La construcción dpp674LacZ consiste en una porción de 674 pb de todo el potenciador del gen dpp, unido mediante ingeniería genética al gen reportero LacZ que codifica para la proteína β-Gal. Así el gen LacZ queda bajo la regulación de estas 674 pb que forman parte del potenciador del gen dpp. B. Esta construcción en el genoma de la mosca transgénica es reconocida por la maquinaria transcripcional en el mismo tiempo y espacio que el potenciador del gen dpp, es así como esta línea transgénica (C) reproduce parte de la expresión endógena del gen dpp en embriones de *D. melanogaster*.

Para dirigir ectópicamente la expresión de Antp, se utilizaron dos sistemas de expresión: un promotor de choque térmico (HS) y el potenciador patched (ptc).

9.2.1 Promotor de choque térmico (HS)

La expresión ectópica de Antp con el promotor de choque térmico se realizó en embriones colectados de la línea que tiene el promotor HS unido a la secuencia codificante de la homeoproteína Antp (HS-Antp) y se les dió un choque térmico de 37°C durante 30 minutos (Capovilla, 1994). Los



resultados mostraron que el promotor HS activó Antp de manera ubicuota, es decir, a lo largo de todo el embrión observándose una mayor expresión de Antp en la región en la que esta homeoproteína se expresa endógenamente (ps3-5 y cordón nervioso) como se muestra en la figura 16B.

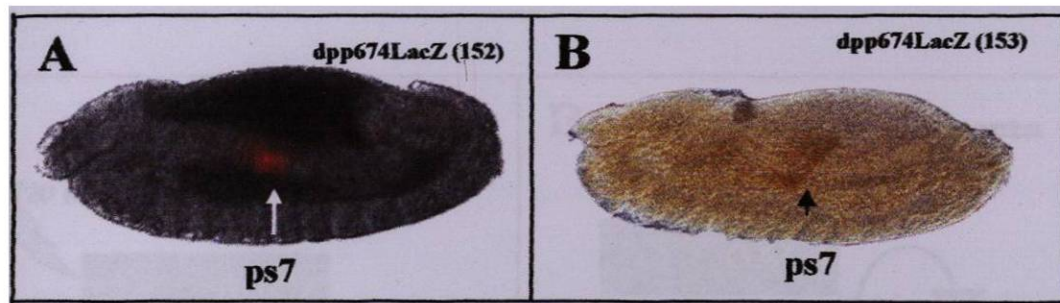


Figura 15. Expresión del potenciador dpp674LacZ. Los embriones de *Drosophila melanogaster* fueron tratados con el anticuerpo anti β -gal como se describe en materiales y métodos. La señal detectada mediante inmunofluorescencia (A) e inmunohistoquímica (B) muestra la expresión del potenciador dpp674LacZ en el parasegmento 7 (ps7) del mesodermo visceral de los embriones. La región anterior del embrión se encuentra a la izquierda y la parte ventral hacia arriba (Vista lateral, estadio 13).

9.2.2 Potenciador *patched* (*ptc*)

El otro sistema que se utilizó para dirigir la expresión ectópica de Antp fue el potenciador *ptc*. Para ello se utilizó el sistema binario UAS/Gal4 mediante la cruce de la línea *ptc*-Gal4 con la línea UAS-Antp, se hicieron colectas de 4 a 12 horas y los embriones se dejaron desarrollar sin darles ningún estímulo, pues el potenciador *ptc* se expresa de manera constitutiva desde etapas tempranas y durante el desarrollo del embrión. Los resultados mostraron que el potenciador *ptc* dirigió la expresión de Antp hacia la región anterior de los 14 parasegmentos del embrión como se muestra en la figura 16C.

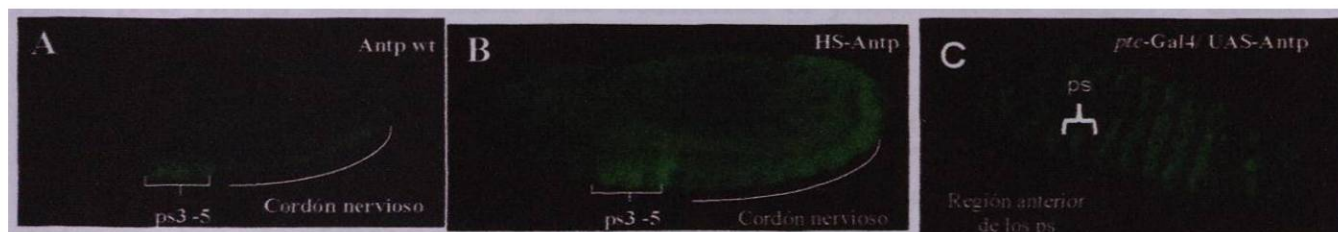


Figura 16. Patrón de expresión de Antp endógena y de Antp ectópica usando el promotor HS y el potenciador *ptc*. Los embriones fueron tratados con anti-Antp 4C3 como se describe en materiales y métodos. A. Antp endógena (verde) se expresa del ps3 al ps5 y a lo largo del cordón nervioso del embrión. B. El promotor de choque térmico dirige la expresión de Antp de manera ubicuota en todo el embrión, además de la endógena (ps 3 al 5 y cordón nervioso) (C) mientras que el potenciador *patched* (*ptc*) dirige la expresión de esta homeoproteína en la parte anterior de los parasegmentos a lo largo del embrión. La región anterior del embrión se encuentra a la izquierda y la parte ventral hacia arriba (vista lateral, estadio 13) en A y B, en C la región anterior del embrión se encuentra a la izquierda (vista dorsal).



En el caso del sistema HS se dirigió Antp ectópicamente de forma directa y fue necesario estimular al embrión mediante choque térmico (fig 17A), en cambio el sistema *ptc* se dirigió Antp ectópicamente de forma indirecta con el sistema binario UAS/Gal4 y sin necesidad de un estímulo externo como se muestra en la figura 17B.

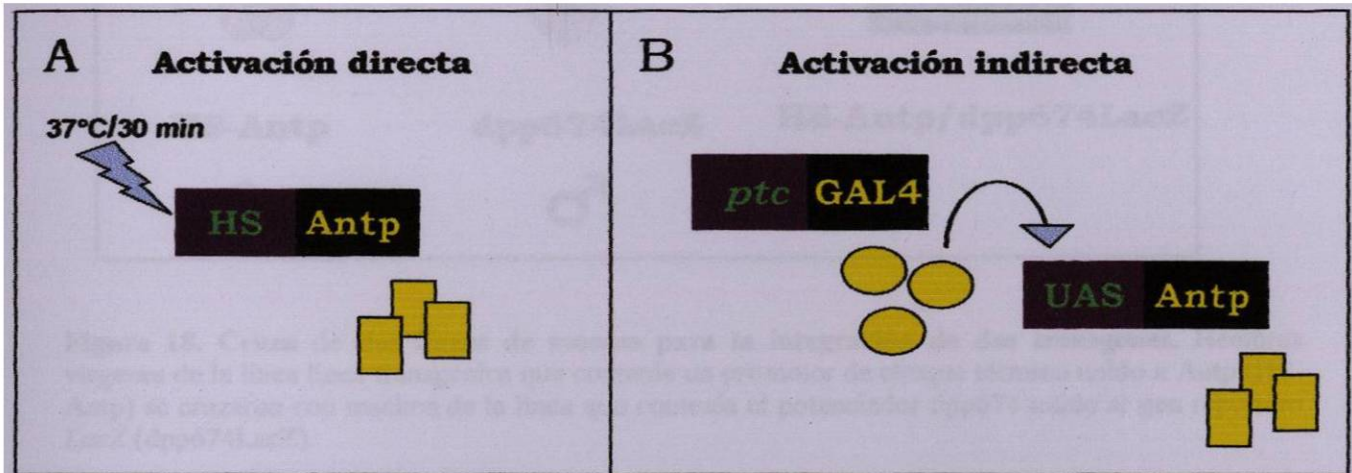


Figura 17. Sistemas de activación ectópica de Antp. A. El promotor HS dirige Antp ectópica de forma directa cuando se estimula al embrión con un choque térmico de 37°C durante 30 min. B. El potenciador *ptc* dirige Antp ectópica de manera indirecta utilizando como intermediarios la proteína Gal4 y las secuencias UAS, además no necesita de un estímulo externo.

9.3 Antp dirigida con el promotor de choque térmico no activó de manera ectópica el potenciador dpp674LacZ

Para determinar si Antp silvestre (Antp wt) dirigida con el promotor HS era capaz de activar la expresión ectópica de dpp674LacZ, se cruzó la línea transgénica que contenía un promotor de choque térmico unido a Antp (HS-Antp) con la línea que contenía el potenciador dpp674 unido al gen reportero LacZ (dpp674LacZ) como se muestra en la figura 18.

En los embriones colectados de esta cruce se realizó la inducción ectópica de Antp usando un choque térmico a 37°C durante 30 minutos (Capovilla, 1994). La figura 19A muestra el patrón de expresión del potenciador dpp674LacZ (ps7 del mesodermo visceral). La figura 19B muestra la expresión ectópica de Antp a lo largo de todo el embrión usando el promotor HS. La tinción de inmunofluorescencia doble mostró que la sobre-expresión de Antp con el promotor de choque térmico (verde) no fue capaz de activar ectópicamente la expresión del potenciador dpp674LacZ hacia las regiones anteriores del ps7 (rojo) a pesar de la presencia de Antp de manera ubicuota a lo largo de todo el embrión (Fig 19C). Dada la posibilidad de que la cantidad de esta homeoproteína no fuera la suficiente para lograr la activación ectópica del potenciador dpp674LacZ, la duración del choque térmico se extendió de 30 a 45



minutos, sin embargo, no fue posible detectar la activación ectópica del potenciador dpp674LacZ (resultados no mostrados).

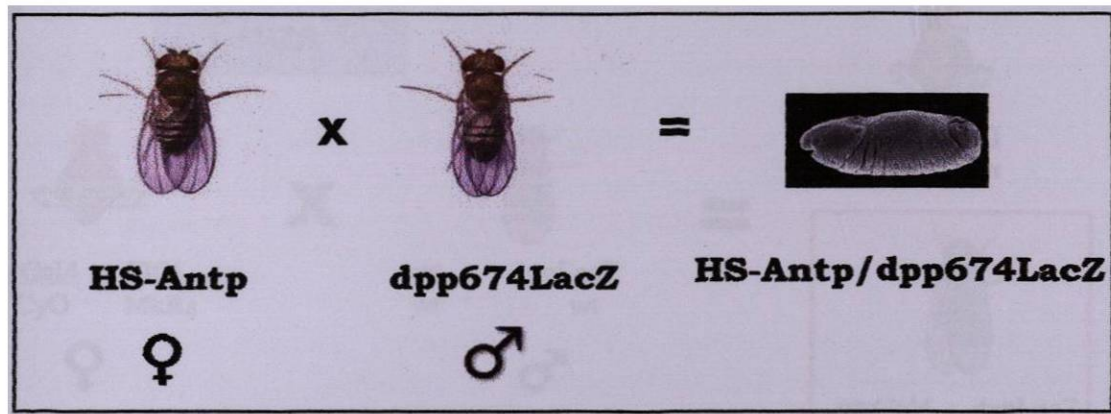


Figura 18. Cruza de dos líneas de moscas para la integración de dos transgenes. Hembras vírgenes de la línea transgénica que contenía un promotor de choque térmico unido a Antp (HS-Antp) se cruzaron con machos de la línea que contenía el potenciador dpp674 unido al gen reportero LacZ (dpp674LacZ).

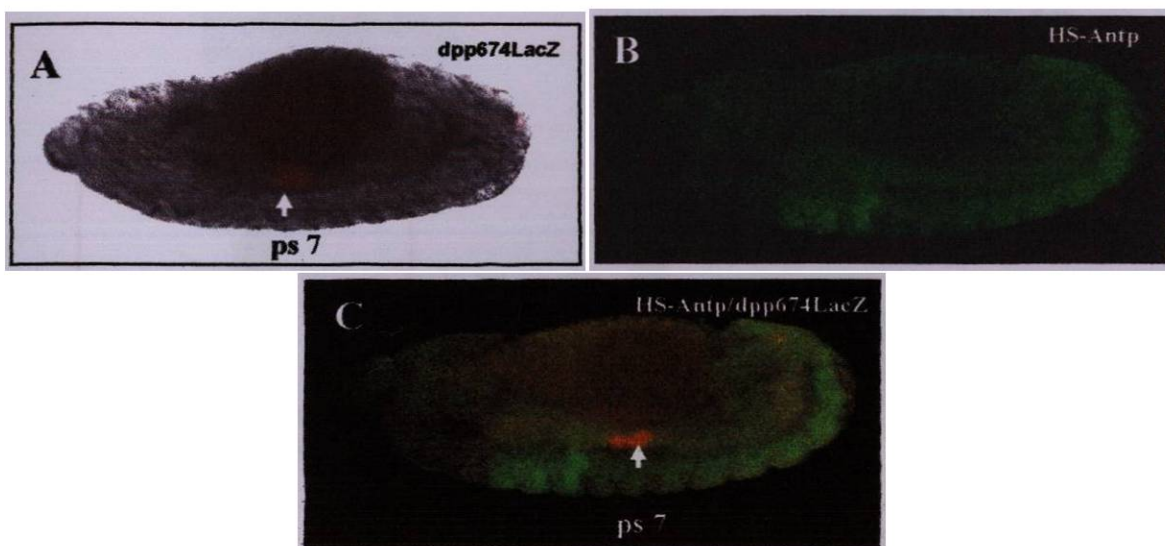


Figura 19. Activación nula del potenciador dpp674LacZ por Antp silvestre usando HS. Los embriones fueron tratados con anti-Antp (verde) y anti-β-gal (rojo) como se describe en materiales y métodos. A. Expresión endógena del potenciador dpp674LacZ en el ps7 de mesodermo visceral. B. Expresión ectópica de Antp silvestre (verde) usando el promotor de choque térmico. C. La sobre-expresión de Antp (verde) dirigida con el promotor de choque térmico no activó ectópicamente el potenciador dpp674LacZ en la región anterior del ps7.

9.4 Activación ectópica del potenciador dpp674LacZ por Antp silvestre dirigida con el potenciador *patched*

Para determinar si Antp silvestre (Antp wt) dirigida con ptc era capaz de activar ectópicamente al potenciador dpp674LacZ se analizaron los

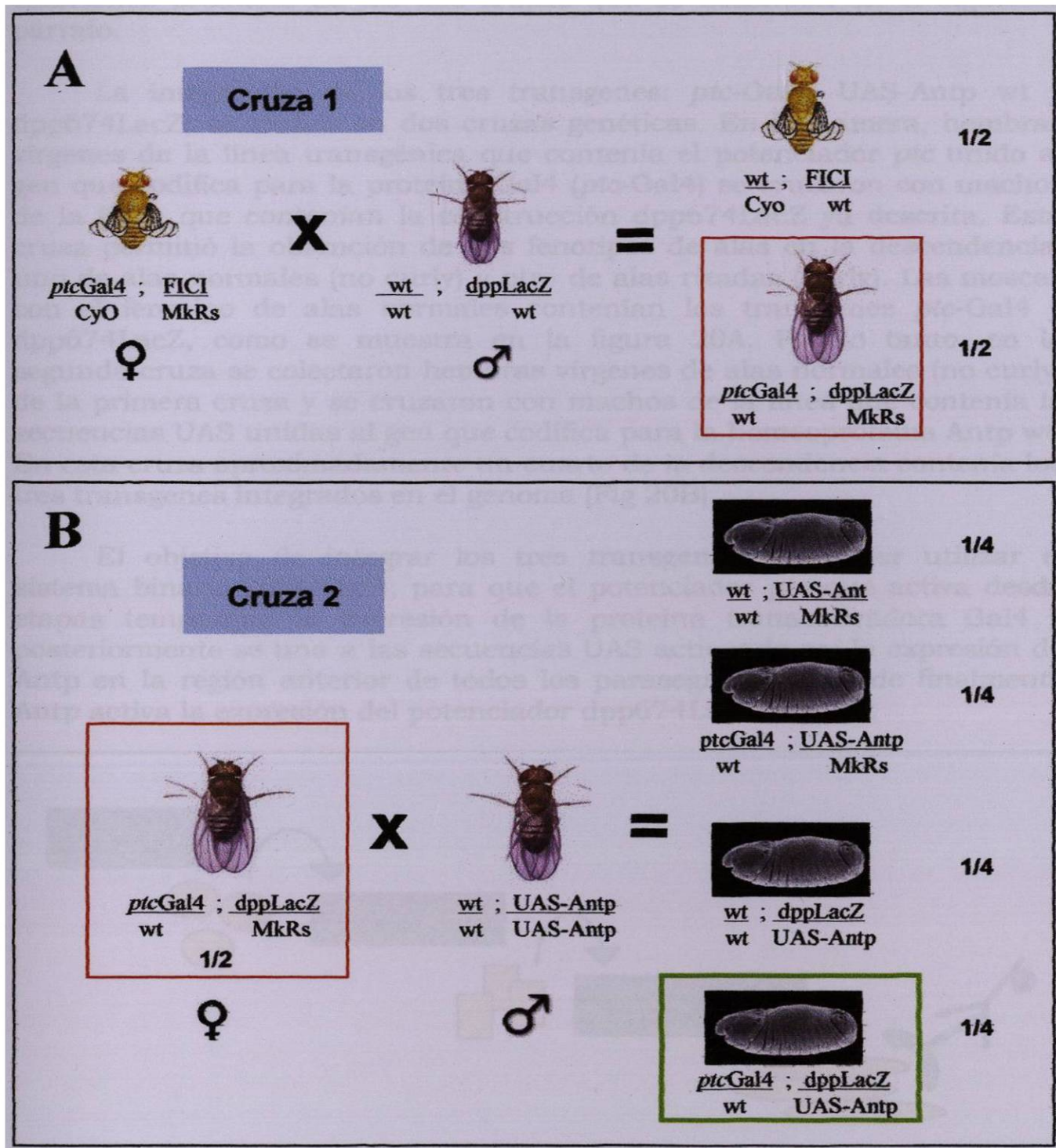


Figura 20. Esquema de cruza genéticas para la integración de los tres transgenes. A. Hembras vírgenes de la línea *ptc-Gal4* se cruzaron con machos de la línea *dpp674LacZ*, de la cruce 1 se colectaron hembras vírgenes de alas normales (no curly; recuadro rojo). B. Estas hembras se cruzaron con machos de la línea *UAS-Antp* silvestre y la mutante *UAS-Antp^{AAAA}*, obteniendo aproximadamente un cuarto de la cruce con los tres transgenes: *ptc-Gal4* / *Uas-Antp* / *dpp674LacZ* (recuadro verde).



embriones producto de las dos cruzas que se describen en el siguiente párrafo.

La integración de los tres transgenes: *ptc*-Gal4, UAS-Antp wt y dpp674LacZ, se realizó en dos cruzas genéticas. En la primera, hembras vírgenes de la línea transgénica que contenía el potenciador *ptc* unido al gen que codifica para la proteína Gal4 (*ptc*-Gal4) se cruzaron con machos de la línea que contenían la construcción dpp674LacZ ya descrita. Esta craza permitió la obtención de dos fenotipos de alas en la descendencia: uno de alas normales (no curly) y otro de alas rizadas (curly). Las moscas con el fenotipo de alas normales contenían los transgenes *ptc*-Gal4 y dpp674LacZ, como se muestra en la figura 20A. Por lo tanto, en la segunda craza se colectaron hembras vírgenes de alas normales (no curly) de la primera craza y se cruzaron con machos de la línea que contenía la secuencias UAS unidas al gen que codifica para la homeoproteína Antp wt. En esta craza aproximadamente un cuarto de la descendencia contenía los tres transgenes integrados en el genoma (Fig 20B).

El objetivo de integrar los tres transgenes era poder utilizar el sistema binario UAS/Gal4; para que el potenciador *ptc* que activa desde etapas tempranas la expresión de la proteína transactivadora Gal4 y posteriormente se una a las secuencias UAS activando así la expresión de Antp en la región anterior de todos los parasegmentos donde finalmente Antp activa la expresión del potenciador dpp674LacZ (Fig 21).

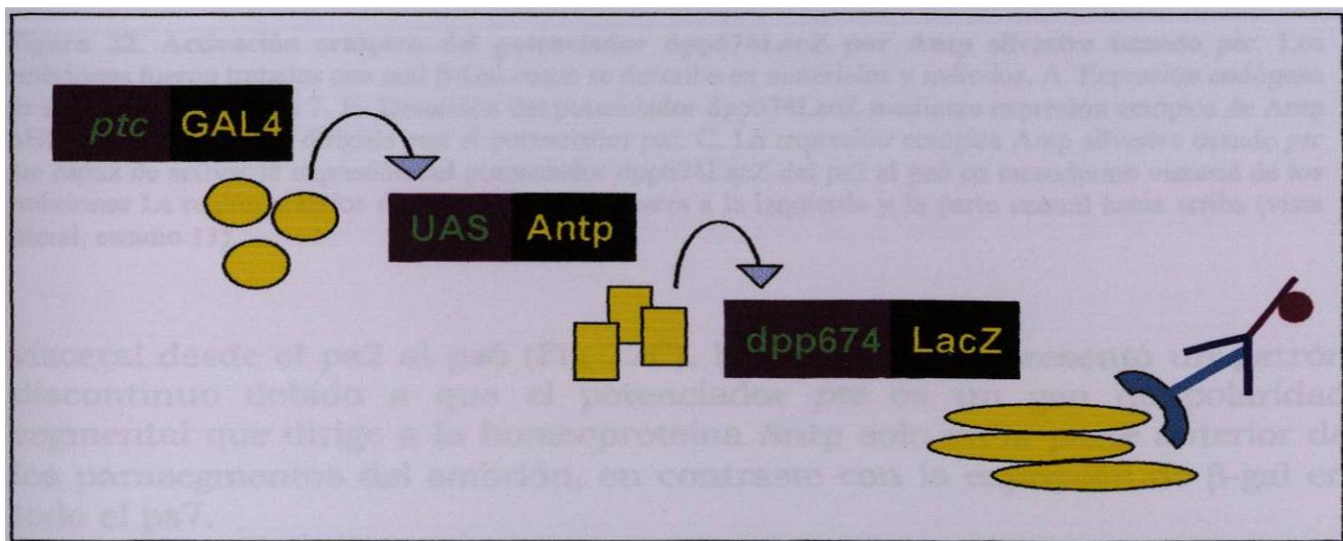


Figura 21. Uso del sistema binario UAS/Gal4 para analizar la activación de dpp674LacZ por Antp. Los tres transgenes integrados en los embriones producto de la craza 2, contienen la secuencia reguladora de la transcripción (letras verdes) y la secuencia codificante a la proteína de interés (letras amarillas). El potenciador *ptc* activa la expresión de la proteína transactivadora Gal4 que se une a las secuencias UAS y activa la expresión de Antp. Esta homeoproteína activa al potenciador dpp674LacZ que se detecta mediante la expresión del gen reportero LacZ codificante a proteína β -galactosidasa, la cual puede detectarse mediante inmunofluorescencia o inmunohistoquímica.



La figura 22A muestra el patrón de expresión del potenciador dpp674LacZ. El análisis de la expresión ectópica de Antp Δ HD utilizada como testigo negativo y dirigida con este mismo potenciador no activó al potenciador dpp674LacZ en las regiones anteriores al ps7 como se esperaba (Fig 22B). Estos embriones presentaron la expresión similar al potenciador dpp674LacZ solamente en el ps7 (comparar fig 22 A y B). La integración de los tres transgenes mostró que en embriones de estadio 13, Antp silvestre dirigida con el potenciador *ptc* fue capaz de activar ectópicamente al potenciador dpp674LacZ en el mesodermo

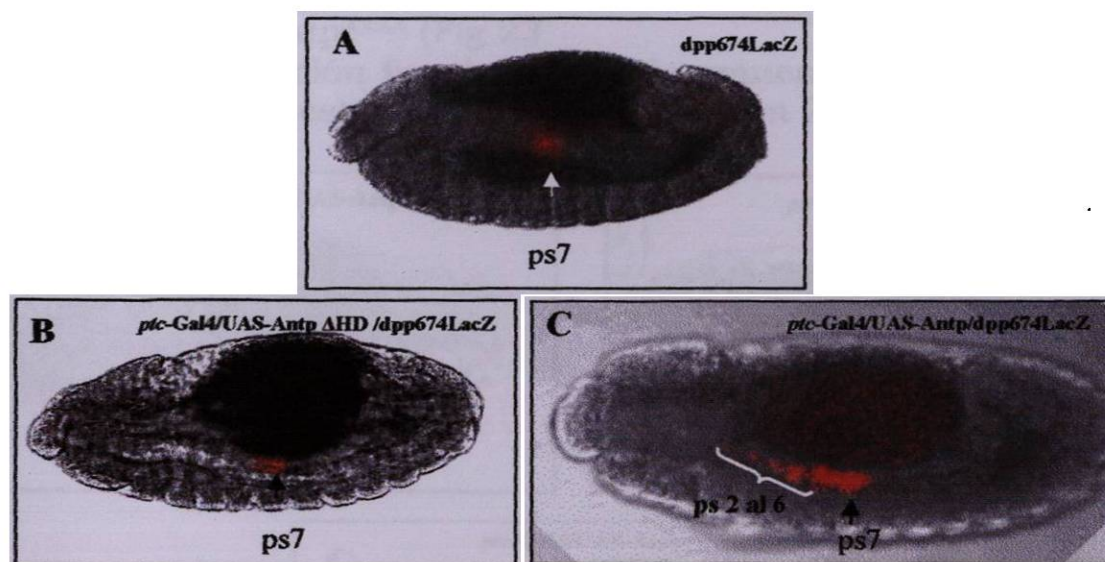


Figura 22. Activación ectópica del potenciador dpp674LacZ por Antp silvestre usando *ptc*. Los embriones fueron tratados con anti β -Gal como se describe en materiales y métodos. A. Expresión endógena de dpp674LacZ en el ps 7. B. Detección del potenciador dpp674LacZ mediante expresión ectópica de Antp Δ HD (testigo negativo) dirigida con el potenciador *ptc*. C. La expresión ectópica Antp silvestre usando *ptc* fue capaz de activar la expresión del potenciador dpp674LacZ del ps2 al ps6 en mesodermo visceral de los embriones. La región anterior del embrión se encuentra a la izquierda y la parte ventral hacia arriba (vista lateral, estadio 13).

visceral desde el ps2 al ps6 (Fig 22C). Esta activación presentó un patrón discontinuo debido a que el potenciador *ptc* es un gen de polaridad segmental que dirige a la homeoproteína Antp solo en la parte anterior de los parasegmentos del embrión, en contraste con la expresión de β -gal en todo el ps7.

9.5 El tetrapéptido YPWM de Antp no es necesario para la activación ectópica del potenciador dpp674LacZ

Con la finalidad de determinar si el tetrapéptido YPWM (Tiroso-Prolina-Triptofano-Metionina) de Antp es necesario para activar el potenciador dpp674LacZ, se realizaron dos cruza genéticas como las descritas anteriormente en la figura 20, pero en este caso utilizando las



líneas transgénicas Antp^{AAAA} (A010-7 y A010-11), que contenían las secuencias UAS unidas a Antp mutante, en las cuales, el tetrapéptido YPWM esta sustituido por un bloque de alaninas. Los embriones producto de las dos cruza con los tres transgenes integrados fueron analizados mediante inmunofluorescencia. En la figura 23A se muestra la activación del potenciador dpp674LacZ que se obtiene al dirigir Antp ectópicamente con el sistema *ptc* como se describió en el punto anterior. La expresión ectópica de la homeoproteína mutante en el tetrapéptido YPWM fue capaz de activar ectópicamente el potenciador dpp674LacZ en el mesodermo visceral en regiones anteriores al ps7, como se observa en los ps2 al ps6 en las dos líneas de Antp^{AAAA} (Fig 23

B y C). Esta activación fue detectada de manera discontinua de la misma forma que Antp silvestre (comparar fig 23A con 23B y C).

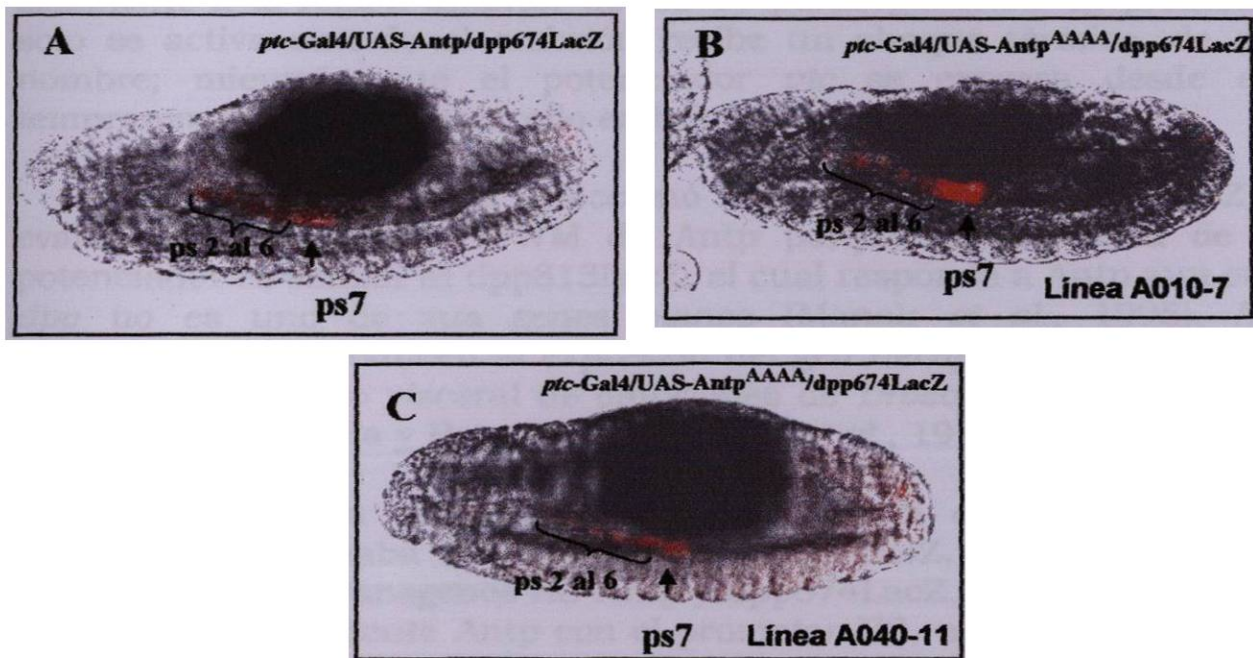


Figura 23. Activación ectópica del potenciador dpp674LacZ con Antp^{AAAA} usando *ptc*. Los embriones fueron tratados con anti β -Gal como se describe en materiales y métodos. A. La expresión ectópica de Antp silvestre con *ptc* activó al potenciador dpp674LacZ en el ps2 al ps6, así como Antp mutante en YPWM (Antp^{AAAA}) con *ptc* fue capaz de activar al potenciador dpp674LacZ en el ps2 al ps6 utilizando dos líneas de moscas transgénicas con la construcción UAS-Antp^{AAAA}. (línea A010-7 en B y línea A010-11 en C)



10. DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo es determinar si el tetrapéptido YPWM de la homeoproteína Antennapedia (Antp) es necesario para activar la expresión ectópica del potenciador dpp674LacZ.

Una forma utilizada en Biología del Desarrollo para analizar la función, ya sea de activación o represión, de las homeoproteínas es expresarlas ectópicamente en un lugar donde normalmente no lo hacen. Esta estrategia fue utilizada para dirigir Antp de manera ectópica en embriones de *Drosophila*, utilizando dos sistemas de expresión: un promotor de choque térmico (HS) y el potenciador *patched* (*ptc*). El primero dirigió Antp en todo el embrión, mientras que el segundo la dirigió solamente a la región anterior de los 14 parasegmentos. El promotor HS solo se activa cuando el embrión recibe un choque térmico, de ahí su nombre; mientras que el potenciador *ptc* se expresa desde etapas tempranas durante el desarrollo embrionario.

En este trabajo se seleccionó el potenciador dpp674LacZ para evaluar el tetrapéptido YPWM de Antp porque la secuencia de dicho potenciador es similar al dpp813LacZ, el cual responde a Antp aun cuando *dpp* no es uno de sus genes blanco (Manak *et al.*, 1995). Ambos potenciadores reproducen la expresión del gen *decapentaplegic* (*dpp*) en el ps7 del mesodermo visceral de embriones de *Drosophila melanogaster* de estadio 13 (Capovilla y Botas, 1994; Manak *et al.*, 1995).

Para analizar si Antp silvestre expresada ectópicamente con el promotor HS activaba al potenciador dpp674LacZ, se realizó una cruce para integrar los transgenes HS-Antp y dpp674LacZ. Desafortunadamente, al dirigir ectópicamente Antp con el promotor HS, no fue posible lograr la activación de dpp674LacZ, a pesar de que Manak y cols en 1995 obtuvieron la activación del potenciador dpp813LacZ al dirigir Antp ectópicamente con el promotor HS. Para descartar la posibilidad de que la cantidad de expresión de Antp no fuera la necesaria para la activación, se incrementó el tiempo del choque térmico de 30 a 45 minutos (datos no mostrados), sin embargo la expresión de Antp aumentada tampoco activó el potenciador dpp674LacZ. Debido a que Manak y cols en 1995 utilizaron tres choques térmicos en lugar de uno (Capovilla y Botas, 1994), y obtuvieron la activación ectópica de dpp813LacZ, se incrementó también el número de choques térmicos en los embriones y no se obtuvo la activación esperada (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que la cantidad de Antp dirigida con el promotor de choque térmico es suficiente para la activación de dpp813LacZ, pero no fue la necesaria para dpp674LacZ.



Debido a la falta de activación de dpp674LacZ con Antp dirigida con el promotor HS, probamos si Antp dirigida con el potenciador *ptc* era capaz de activar dpp674LacZ, utilizando el sistema binario UAS/Gal4 mediante dos cruas genéticas para integrar los transgenes *ptc*-Gal4, UAS-Antp y dpp674LacZ. La expresión ectópica de Antp con el potenciador *ptc* permitió claramente la activación del potenciador dpp674LacZ en la región anterior de los parasegmentos 2 al 6 (Fig. 22C). El patrón de activación de dpp674LacZ se observó interrumpido ya que el potenciador *ptc* dirige Antp solo en la región anterior de los parasegmentos, es decir, hay una activación discontinua.

Estos resultados demuestran que el potenciador dpp674LacZ fue activado dirigiendo la expresión ectópica de Antp con el potenciador *ptc*, lo que no ocurrió cuando se dirigió Antp con choques térmicos. Resultados similares fueron obtenidos por Canales-del Castillo (2005) en nuestro laboratorio con la homeoproteína Scr. Esta homeoproteína, en embriones de *D. melanogaster* se expresa endógenamente en el segmento *lb* y en el segmento torácico 1 (T1) y Antp reprime la expresión de Scr en el segmento torácico 2 (T2). Al expresar ectópicamente Antp con el promotor HS no se observó represión en los segmentos *lb* ni en T1. Sin embargo, al expresar Antp ectópicamente con el potenciador *ptc*, se observó una represión parcial de Scr en T1 y *lb*, así como una ganancia de expresión en la región anterior de los parasegmentos (Canales-del Castillo, 2005). Esto indica que se pueden obtener diferentes efectos en la sobre-expresión de una misma homeoproteína al utilizar diferentes sistemas para dirigirla ectópicamente, debido probablemente a que las homeoproteínas se dirigen en concentración y tiempo y espacio diferentes en las células del embrión.

Ya que se obtuvo claramente la activación de dpp674LacZ por Antp silvestre dirigida con el potenciador *ptc*, se probaron dos líneas de Antp mutante en el tetrapéptido YPWM en las que este motivo estaba sustituido por un bloque de alaninas (Antp^{AAAA}): A010-7 y A010-11. En este experimento se utilizó Antp Δ HD como testigo negativo. Esta homeoproteína tiene la secuencia de Antp con delección del HD y el YPWM (Fig. 22B). Antp Δ HD no mostró activación ectópica de dpp674LacZ, como se esperaba ya que el homeodominio (HD) de las homeoproteínas es necesario para realizar su función *in vivo* mediante unión al ADN (Bello *et al.*, 1998). Interesantemente, las dos líneas mutantes de Antp (A010-7 y A010-11) utilizadas, fueron capaces de activar el potenciador dpp674LacZ del ps2 al 6 en forma discontinua de forma similar a Antp silvestre (Fig. 23 B y C respectivamente). Estos resultados demuestran que el tetrapéptido YPWM de Antp no es necesario para la activación de dpp674LacZ.

La activación del potenciador dpp674LacZ por Antp no depende del el motivo YPWM. Sin embargo, se ha demostrado que el motivo YPWM si es necesario para la activación/represión de algunos genes blanco de Antp:



tsh, *Scr* respectivamente (Canales-del Castillo, 2005). Por lo tanto, se sugiere que la homeoproteína Antp no siempre requiere del motivo YPWM para realizar sus funciones de regulación. Esto mismo ocurre en otras homeoproteínas (Ubx y Abd-A) como se vera mas adelante.

La mayoría de las homeoproteínas presentan dos regiones altamente conservadas: el homeodominio y el tetrapéptido YPWM, las regiones conservadas como el homeodominio no son razón suficiente para explicar la especificidad funcional de todas las diferentes homeoproteínas. Así que se ha propuesto que las homeoproteínas interactúan con diversos cofactores como exd o su ortólogo en mamíferos Pbx (Pelan, 1995; Chang, 1996 y Sprules, 2003) para aumentar su especificidad funcional. Además, se ha demostrado que dicha interacción con cofactores se lleva a cabo mediante el tetrapéptido YPWM de las homeoproteínas (Johnson *et al.*, 1995; Khnoepfler y Kamps, 1995; Chang *et al.*, 1996).

Estudios *in vivo* en embriones de *Drosophila melanogaster* han demostrado que en algunos casos el tetrapéptido YPWM es necesario para que una homeoproteína realice su función, por ejemplo: labial lo necesita para mantener su función represora (Chan *et al.*, 1996); HoxA5 (el ortólogo de Scr en mamíferos) para transformar T1 en T2, así como para la transformación antena por pata (Zhao *et al.*, 1996); Abd-A para activar *wg* en el ps8 (Graba *et al.*, 2003); Antp para activar *tsh* y el elemento *fkh* [250^{con}] y reprimir *Scr* (Canales-del Castillo, 2005); y Ubx para reprimir *Distal-less* (Tour *et al.*, 2006). Sin embargo, también existen reportes en los cuales la actividad de algunas homeoproteínas es independiente de YPWM: Abd-A no requiere YPWM para reprimir *dpp* en el ps8 al 12 de mesodermo visceral (Graba *et al.*, 2003); Ubx tampoco requiere YPWM para activar *dpp* en el ps7 de mesodermo visceral, ni para activar *tsh* en la epidermis de la cabeza (Tour *et al.*, 2006). Estos resultados, incluyendo el nuestro, postulan que el motivo YPWM puede o no ser necesario para la actividad funcional de las homeoproteínas dependiendo de su gen blanco.

En el caso del gen *dpp* se ha evaluado la importancia del motivo YPWM de tres homeoproteínas: Abd-A, Ubx y Antp. Se demostró que su activación por Ubx (Tour *et al.*, 2006), su represión por Abd-A (Graba *et al.*, 2003) y la activación de su secuencia reguladora por Antp es independiente del tetrapéptido YPWM. Debido a que la activación/represión de *dpp* por Ubx y Abdominal-A, así como la activación del potenciador dpp674LacZ no requieren el motivo YPWM, se sugiere que la regulación (activación o represión) del gen *dpp* por las homeoproteínas durante el desarrollo embrionario de *D. melanogaster* es independiente del motivo YPWM.

Debido a que la razón por la cual los potenciadores dpp813LacZ y dpp674LacZ responden a Antp no es clara proponemos tres posibles



explicaciones: a) que Antp mimetice Ubx. Esto es poco probable ya que difieren en solo 7 aminoácidos y estas ligeras diferencias entre los homeodominios de las homeoproteínas son las que permiten la especificidad *in vivo* (Gibson *et al.*, 1990). Sin embargo, la sobre-expresión de Antp genera altas cantidades de la homeoproteína y es probable que por competencia se unan a los sitios de unión de Ubx y de Abd-A a los que normalmente no tiene acceso (Manak *et al.*, 1995); b) que la secuencia nucleotídica de la región reguladora completa del gen *dpp* al reducirse en tamaño permite la unión de la homeoproteína Antp; y c) que Antp active otro gen que a su vez regule la activación de los potenciadores, pues se ha visto que existen genes no identificados que pueden activar *dpp* en mesodermo visceral (Rauskolb y Wieschaus 1994).

11. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el desarrollo de esta tesis demuestran que:

- Antp silvestre dirigida con el potenciador *ptc* fue capaz de activar el potenciador dpp674LacZ, mientras que dirigida con el promotor de choque térmico no fue capaz de activar este elemento.
- El tetrapéptido YPWM de Antp no es necesario para que Antp active la expresión del potenciador dpp674LacZ.

12. PERSPECTIVAS

La activación del potenciador dpp674LacZ por Antp silvestre y Antp mutante en el tetrapéptido deberá ser verificada directamente sobre la expresión del gen *dpp*. Esto último es importante ya que Canales-del Castillo en el 2005 encontró que la activación ectópica por Antp silvestre y Antp^{AAAA} del potenciador del gen *tsh* unido aun gen reportero no mostró el mismo comportamiento que el gen *tsh in vivo* en los embriones de *Drosophila*.

Además como *dpp* no es un gen blanco de Antp, también es importante analizar otros genes blanco, tanto de Antp como de otras homeoproteínas para determinar si el tetrapéptido YPWM es o no necesario y tener así una perspectiva más amplia de la importancia real de este motivo en Antp.



13. BIBLIOGRAFÍA

- Akam M** (1998) Hox genes, homeosis and the evolution of segment identity: no need for hopeless monsters. *Int. J. Dev. Biol.* 42: 445-451
- Bello B, Resendez-Perez D y Gehring W** (1998) Spatial and temporal targeting of gene expresión in *Drosophila* by means of tetracycline-dependent transactivador system. *Development* 125, 2193-2201
- Bessa J, Gebelein B, Pichaud F, Casares F, y Mann RS.** (2002) Combinatorial control of *Drosophila* eye development by eyeless, homothorax, and teashirt. *Genes and Development.* 16(18):2415-27
- Brand A H. y Perrimon N** (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-415
- Canales-del Castillo R** (2002) Análisis molecular y funcional del tetrapéptido YPWM en el estadio larvario de *Drosophila melanogaster*. Tesis de licenciatura. F.C.B. U.A.N.L.
- Cárdenas-Chávez D** (2003) Análisis de la repression transcripcional *in vitro* del tetrapéptido YPWM de Antennapedia. Tesis de licenciatura. F.C.B. U.A.N.L.
- Casares, F. and R.S. Mann** (1998) Control of antennal versus leg development in *Drosophila*. *Nature* 392: 723-726.
- Capovilla M y Botas J** (1994) Direct regulation of decapentaplegic by Ultrabithorax and its role in *Drosophila* midgut morphogenesis. *Cell.* Vol. 76(3) 461-75.
- Capovilla M y Botas J** (1998) Functional dominance among Hox genes: repression dominates activation in the regulation of dpp. *Development* 125, 4949-4957.
- Chan SK y Mann R S** (1996) A structural model for a homeotic protein-extradenticle-DNA complex accounts for the choice of HOX protein in the heterodimer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 93, 5223-5228.
- Chan SK, Popperl H, Krumlauf R, Mann RS** (1996) An extradenticle-induced conformational change in a HOX protein overcomes an inhibitory function of the conserved hexapeptide motif. *EMBO J.* 15 :2476-87



Chang CP, Brocchieri L, Shen WF, Largman C y Cleary M (1996) Pbx modulation of Hox homeodomain amino-terminal arms establishes different DNA-binding specificities across the *Hox* locus. *Molecular and Cellular Biology*, Vol 16, 1734–1745.

Chauvet S, Merabet S, Bilder D, Scott M P., Pradel J y Graba Y (2000) Distinct Hox protein sequences determine specificity in different tissues. *Developmental Biology* Vol 97 4064–4069.

de Zulueta P, Alexandre E, Jacq B, Kerridge S (1994) Homeotic complex and teashirt genes co-operate to establish trunk segmental identities in *Drosophila*. *Development* (120) 8: 2287-96

Duboule D, Morata G (1994) Colinearity and functional hierarchy among genes of the homeotic complexes. *Trends Genet.* 10(10):358-64.

Duffy Joseph B (1993) GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's swiss army knife. *Genesis* 34:1–15

Erkner A, Gallet A, Angelats C, Fasano L, Kerridge S. (1999) The role of Teashirt in proximal leg development in *Drosophila*: ectopic Teashirt expression reveals different cell behaviours in ventral and dorsal domains. *Developmental Biology.* 215(2):221-32

Fasano L, Roder L, Core N, Alexandre E, Vola C, Jacq B y Kerridge S (1991). The gene teashirt is required for the development of *Drosophila* embryonic trunk segments and encodes a protein with widely spaced zinc finger motifs. *Cell* 64 (1):63-79

Gilbert S F (1997) *Developmental Biology*. 5a Edición Editorial Sinauer Associates Inc. Publishers

Hursh D A, Padgett R W y Gelbart W M (1993) Cross regulation of *decapentaplegic* and *Ultrabithorax* transcription in the embryonic visceral mesoderm of *Drosophila*. *Development* 117, 1211-1222.

Johnson F B, Parker E y Krasnow M A (1995) Extradenticle protein is a selective cofactor for the *Drosophila* homeotics: role of the homeodomain and YPWM amino acid motif in the interaction. *Proc Natl Acad Sci.* 92(3):739-43.

Knoepfler P S and P. K Mark (1995) The pentapeptide motif of Hox proteins is required for cooperative DNA binding with Pbx1, physically contacts Pbx1, and enhances DNA binding by Pbx1. *Molecular and Cellular Biology*, Vol 15 5811–5819.



LaRonde-LeBlanc N A y Wolberger C (2003) Structure of HoxA9 and Pbx1 bound to DNA: Hox hexapeptide and DNA recognition anterior to posterior. *Genes & Development* 17:2060–2072.

Lewis, E B (1978) A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276, 565-570.

Manak J R, Mathies L D y Scott M P (1995) Regulation of a decapentaplegic midgut enhancer by homeotic proteins. *Development* 120, 3605-3619.

Manfroid I, Caubit X, Kerridge S y Fasano L (2003) Three putative murine Teashirt orthologues specify trunk structures in *Drosophila* in the same way as the *Drosophila* teashirt gene. *Development* 131 1065-1073.

Mathies L D, Kerridge S y Scott M P (1994) Role of the *teashirt* gene in *Drosophila* midgut morphogenesis: secreted proteins mediate the action of homeotic genes. *Development* 120, 2799-2809

Mead J, Zhong H, Acton T B y Vershon A K (1996) The yeast $\alpha 2$ and Mcm1 proteins interact through a region similar to a motif found in homeodomain proteins of higher eukaryotes. *Molecular and Cellular Biology*. Vol, 16 2135–2143.

Merabet S, Kambis Z, Capovilla M, Hélène B, Pradel J y Graba Y (2003) The hexapeptide and linker regions of the AbdA Hox protein regulate its activating and repressive functions. *Developmental Cell*, Vol. 4, 761–768,

Neuteboom STC, Peltenburg L, van Duck M A y Murre C (1995) The hexapeptide LFPWMR in Hoxb-8 is required for cooperative DNA binding with Pbx1 and Pbx2 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 92 9166-9170.

O'Connor MB, Binari R, Perkins LA, Bender W (1988) Alternative RNA products from the Ultrabithorax domain of the bithorax complex. *EMBO J.* 7(2):435-45.

Otting G, Qian YQ, Billeter M, Muller M, Affolter M, Gehring WJ, Wuthrich K (1990) Protein-DNA contacts in the structure of a homeodomain-DNA complex determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy in solution. *EMBO J.* 9(10):3085-92.

Padgett RW, St Johnson RD, Gelbart WM (1987) A transcript from a *Drosophila* pattern gene predicts a protein homologous to the transforming growth factor-beta family. *Nature*. 325(6099):81-4.



Pan D y Rubin GM. (1998) Targeted expression of *teashirt* induces ectopic eyes in *Drosophila*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 95(26):15508-12.

Panganiban GE, Reuter R, Scott MP, Hoffmann FM (1990) A *Drosophila* growth factor homolog, decapentaplegic, regulates homeotic gene expression within and across germ layers during midgut morphogenesis. Development. 110 (4):1041-50.

Passner JM, Ryoo H D, Shen L, Mann R S, Aggarwal A K (1999) Structure of a DNA-bound Ultrabithorax-Extradenticle homeodomain complex. Nature. 397 (6721) 649-651.

Phelan M, Ramaldi I y Featherstone MS (1995) Cooperative interactions between HOX and PBX proteins mediated by a conserved peptide motif. Molecular and Cellular Biology. Vol, 15 3989-3997.

Pinsonneault J, Florence B, Vaessin H y McGinnis W (1997) A model for extradenticle function as a switch that changes HOX proteins from repressors to activators. The EMBO Journal Vol.16 No.8 pp.2032-2042.

Qian YQ, Billeter M, Otting G, Muller M, Gehring WJ, Wuthrich K (1989) The structure of the Antennapedia homeodomain determined by NMR spectroscopy in solution: comparison with prokaryotic repressors. Cell. 59(3):573-80

Qian YQ, Otting G, Furukubo-Tokunaga K, Affolter M, Gehring WJ, Wuthrich K (1992) NMR structure determination reveals that the homeodomain is connected through a flexible linker to the main body in the *Drosophila* Antennapedia protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 89(22):10738-42.

Qian YQ, Resendez-Perez D, Gehring WJ, Wuthrich K (1994) The des(1-6) antennapedia homeodomain: comparison of the NMR solution structure and the DNA-binding affinity with the intact Antennapedia homeodomain. Proc Natl Acad Sci U S A. 91(9):4091-5.

Quiang L y Kamps M (1996) Structural determinants within Pbx1 that mediate cooperative DNA binding with pentapeptide-containing Hox proteins: proposal for a model of a Pbx1-Hox-DNA complex. Molecular and Cellular Biology. Vol 16 1632-1640.

Rauskolb C y Wieschaus E (1994) Coordinate regulation of downstream genes by extradenticle and the homeotic selector proteins. EMBO Journal. 13(15):3561-9.



Roberts DB (1998) *Drosophila* a practical approach. 2a Edición. Editorial Oxford University Press.

Roder L, Vola C, Kerridge S (1992). The role of the teashirt gene in trunk segmental identity in *Drosophila*. *Development* 115 (4)1017-33

Saskia TC, Neuteboom LT, Peltenburg MA y Cornelis M (1995) The hexapeptide LFPWMR in Hoxb-8 is required for cooperative DNA binding with Pbx1 and Pbx2 proteins. *Developmental Biology*. Vol 92 9166-9170.

Scott MP (1994) Intimations of a creature. Minireview. *Cell*, Vol. 79, 1121-1124,

Shanmugam K, Featherstone MS y Saragovi HU (1997) Residues flanking the HOX YPWM motif contribute to cooperative interactions with PBX. *The journal of biological chemistry*. Vol. 272 19081-19087.

Shen WF, Rozenfeld S, Lawrence HJ and Largman C (1997) The Abd-B-like hox homeodomain proteins can be subdivided by the ability to form complexes with pbx1a on a novel DNA target. *The journal of biological chemistry*. 8198-8206,

Singh A, Kango-Singh M y Sun YH. (2002) Eye suppression, a novel function of teashirt, requires Wingless signaling. *Development* 129(18):4271-80.

Soanes KH, MacKay JO, Core N, Heslip T, Kerridge S y Bell JB. (2001) Identification of a regulatory allele of teashirt (tsh) in *Drosophila melanogaster* that affects wing hinge development. An adult-specific tsh enhancer in *Drosophila*. *Mechanisms of Development*. 105(1-2):145-51.

Sprules T, Green N, Featherstone M y Gehring K (2003) Lock and key binding of the HOX YPWM peptide to the PBX homeodomain. *The journal of biological chemistry*. Vol. 278, 1053-1058.

Struhl, G (1981) A homeotic mutation transforming leg to antenna in *Drosophila*. *Nature* 292, 635-638.

Subramaniam V, Bomze, HM y Lopez, AJ (1994) Functional differences between Ultrabithorax protein isoforms in *Drosophila melanogaster* - evidence from elimination, substitution and ectopic expression of specific isoforms. *Genetics* 136: 979-991.

Sullivan W, Ashburner M, Hawley R S (2000) *Drosophila* protocols. Editorial Cold Spring Harbor Laboratory Press



Tour E, Hittinger CT, McGinnis W (2006) Evolutionarily conserved domains required for activation and repression functions of the *Drosophila* Hox protein Ultrabithorax. *Development* 132(23):5271-81.

Villanueva-Segura K (2004) Modulación de la represión transcripcional de *Antennapedia* con el motivo WRPW en cultivo celular. Tesis de licenciatura. F.C.B. U.A.N.L.

Wei-Fang S, Ching-Pin C, Sofia R, Guy S, R Keith Humphries, Ming Lu, H. Jeffrey Lawrence, Michael L. Cleary and Corey Largman (1996) Hox homeodomain proteins exhibit selective complex stabilities with Pbx and DNA. *Nucleic Acids Research*, Vol. 24, 898-906.

Wakimoto BT, Kaufman TC (1981) Analysis of larval segmentation in lethal genotypes associated with the *antennapedia* gene complex in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 81(1):51-64.

Wu J y Cohen SM. (2000) Proximal distal axis formation in the *Drosophila* leg: distinct functions of *teashirt* and *homothorax* in the proximal leg. *Mechanisms of Development.* 94(1-2):47-56

Zhao JJ, Lazzarini RA y Pick L. (1996) Functional dissection of the mouse Hox-a5 gene. *The EMBO Journal.* 15(6):1313-22

Zeng, W, Andrew DJ, Mathies LD, Horner MA, y Scott MP (1993) Ectopic expression and function of the *Antp* and *Scr* homeotic genes: The N terminus of the homeodomain is critical to functional specificity. *Development* 118: 339-352.



14. APÉNDICE

Reactivo	Procedencia
Agar para <i>Drosophila</i>	Labscientific Livingstone
Azúcar morena	Comercial
BSA	Molecular Probes
Cloro	Comercial al 5 ó 6%
3-3 Diaminonecidina 0.3 mg/mL	Sigma-Aldrich
EGTA	Sigma-Aldrich
Etanol	CTR
Formaldehído	Sigma-Aldrich
Harina de maíz	Comercial
Heptano	CTR
Jugo de uva	Comercial
KCl	Merk
KH ₂ PO ₄	Merk
Levadura	Comercial
Metanol	CTR
MgSO ₄	Sigma-Aldrich
NaCl	CTR
Na ₂ HPO ₄	Merk
Peróxido de Hidrógeno	Comercial al 3%
PIPES (no ácido)	Research Organics Inc (Grado molecular)
Propionato de sodio	Comercial
Tritón X-100	Sigma-Aldrich
Tween 20	Sigma Aldrich

Preparación de comida estándar para *Drosophila melanogaster*. En un litro de agua destilada disolver 100g de levadura por 10 min mediante agitación. Añadir 13.75g de agar y esperar a que se disuelva por aproximadamente 10 min mediante agitación. Agregar 100g de azúcar morena y esperar que se disuelva por aproximadamente 10 min en agitación. Añadir 50g de harina de maíz y disolver por 10 min. Calentar a ebullición durante 15 min, esperar a que la temperatura baje entre 55 y 60 °C y disolver 10g de propionato de sodio en agitación por 10 min. Servir el alimento en frascos o viales y esperar a que se solidifique por 45 min. Espolvorear sobre la superficie levadura seca activa y almacenar a 18°C en un lapso no mayor de una semana.

Preparación de placas de puesta para *Drosophila melanogaster*. Disolver mediante agitación 8.5g de agar en 300 mL de agua destilada. Agregar 5g de azúcar morena y disolver. Calentar a ebullición. Esperar a que la temperatura baje de 55 a 60°C y agregar 100mL de jugo de uva y 2.4 mL de propionato de sodio. Homogenizar y servir en cajas petri de



plástico pequeñas. Esperar a que solidifique, tapar y almacenar a 4°C por no mas de una semana.

Soluciones utilizadas

Solución	Componentes	Cantidad
NaCl 0.4% y Tritón X-100 al 0.1%	- NaCl - Tritón X-100 - H₂O destilada	0.4g 100 µL 1 L
*Buffer PIPES pH 6.9	- EGTA 2mM - MgSO₄7H₂O 1mM - PIPES - H₂O destilada	0.4683g 0.2464 90mL 1L
Buffer de Fosfatos Salino (PBS)	- NaCl - KCl - KH₂PO₄ - NaHPO₄ - H₂O destilada	200g 5g 5g 27.8g 1L
PBS +Tritón X-100 0.1% (PBT 0.1%)	- Tritón X-100 - PBS	50 µL 50 mL
PBS + Tween 20 0.05 % (PBTween)	- Tween 20 - PBS	25 µL 50 mL
PBT 0.1% + BSA 0.1%	- BSA - PBT + 0.1%	0.010g 1 mL
PBT 0.1 % + BSA 10%	- BSA - PBT + 0.1%	0.100g 1 mL

*Una vez que se agregaron todos los componentes, se ajusta el pH a 6.9 con HCl y NaOH, después se debe esterilizar y almacenar una parte a -4°C.

**Todas las soluciones deben homogenizarse bien.

Solución (V final 50 mL)	V de PBS en mL	V de alcohol en mL
Metanol 30%/PBS 70%	15	35
Metanol 50%/PBS 50%	25	25
Metanol 70%/PBS 30%	35	15
Metanol 100%	50	-
Etanol 30%/PBS 70%	15	35
Etanol 50%/PBS 50%	25	25
Etanol 70%/PBS 30%	35	15
Etanol 100%	50	-

