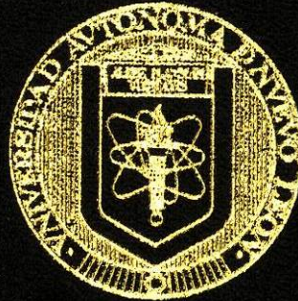


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



"ANÁLISIS MOLECULAR Y FUNCIONAL DEL
TETRAPEPTIDO YPWM EN ANTENNAPEDIA EN
EL ESTADIO LARVARIO DE *Drosophila melanogaster*"

PRESENTADO POR

RICARDO CANALES DEL CASTILLO

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR
AL TÍTULO DE
QUÍMICO BACTERIOLOGO PARASITOLOGO

MONTERREY, N. L.

MAYO DEL 2002

TL
QH453
.C3
2002
c.1

ANÁLISIS MOLECULAR Y FUNCIONAL DEL TETRAPÉPTIDO YPAWMA EN
FEMINIA PEDDIA EN EL ESTADIO LARVARIO DE *Drosophila melanogaster*,
RCC

2000



1080124440

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



"ANÁLISIS MOLECULAR Y FUNCIONAL DEL
TETRAPEPTIDO YPWM EN ANTENNAPEDIA EN
EL ESTADIO LARVARIO DE *Drosophila melanogaster*"

PRESENTADO POR

RICARDO CANALES DEL CASTILLO

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR
AL TÍTULO DE
QUÍMICO BACTERIOLOGO PARASITOLOGO

MONTERREY, N. L.

MAYO DEL 2002



TL
QH453
.C3
2002



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



“ANÁLISIS MOLECULAR Y FUNCIONAL DEL TETRAPÉPTIDO YPWM EN ANTENNAPEDIA EN EL ESTADIO LARVARIO DE *Drosophila melanogaster*”

PRESENTADO POR

RICARDO CANALES DEL CASTILLO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR
AL TÍTULO DE
QUÍMICO BACTERIÓLOGO PARASITÓLOGO**

MONTERREY, N.L

MAYO DEL 2002

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



COMISIÓN DE TESIS



DRA. DIANA RESÉNDEZ PÉREZ

Director de Tesis



M.C. JORGE A. VERDUZCO MARTINEZ

Secretario



DR. MARIO MORALES VALLARTA

Vocal

**“ANÁLISIS MOLECULAR Y FUNCIONAL DEL TETRAPÉPTIDO
YPWM EN ANTENNAPEDIA EN EL ESTADIO LARVARIO DE
Drosophila melanogaster”**

PRESENTA

RICARDO CANALES DEL CASTILLO

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Autónoma de Nuevo León en San Nicolás de los Garza; bajo la dirección de la Dra. Diana Reséndez Pérez.

Al físico Jesús Canales Y Psicóloga Ana del Castillo, mis padres, quienes me introdujeron en los placeres de la comprensión del mundo, con gratitud, admiración y amor.

Por supuesto a mi hermanita Itzel Canales del Castillo

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|--|----|
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | 1 |
| LISTA DE FIGURAS Y TABLAS..... | 2 |
| AGRADECIMIENTOS..... | 4 |
| RESUMEN..... | 5 |
| I. INTRODUCCIÓN..... | 6 |
| 1 Antecedentes..... | 7 |
| a) Genes homeóticos..... | 7 |
| b) Homeobox..... | 9 |
| c) Antennapedia..... | 10 |
| d) El motivo “YPWM”..... | 13 |
| e) Genes blanco de Antennapedia..... | 15 |
| f) Sistema binario GAL4/UAS..... | 16 |
| 2 Importancia..... | 18 |
| II. HIPÓTESIS Y OBJETIVO..... | 18 |
| 1 Estrategia general..... | 19 |
| III. MATERIALES Y METODOS..... | 19 |
| IV. 1 Amplificación y mantenimiento de las moscas transgénicas..... | 19 |
| 2 Sexado y realización de cruzas..... | 21 |
| 3 Inducción ectópica de Antp y sus mutantes..... | 21 |
| a) Colecta de embriones de <i>D. melanogaster</i> | 22 |
| b) Preparación de cutículas embrionarias de <i>Drosophila</i> | 22 |
| 4 Activación del elemento <i>fkh[250^{on}]</i> por Antp..... | 23 |
| a) Colecta de embriones de <i>Drosophila</i> | 23 |
| b) Detección de β -galactosidasa en embriones de <i>D. melanogaster</i> | 23 |
| IV. RESULTADOS..... | 25 |
| 1 Análisis funcional del tetrapéptido “YPWM”..... | 25 |
| a) Inducción ectópica de Antennapedia..... | 25 |
| b) Inducción ectópica de Antennapedia y sus mutantes..... | 28 |
| 2 Activación del elemento <i>fkh[250^{on}]-lacZ</i> por Antennapedia y sus mutantes..... | 30 |
| DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES..... | 34 |
| V. APÉNDICE..... | 39 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 42 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------------|---|
| <i>Abd A</i> | <i>Abdominal A</i> |
| ADB | Cinturón de denticulas |
| <i>Antp</i> | <i>Antennapedia</i> |
| Antp | Proteína Antennapedia |
| Antp-C | Complejo Antennapedia |
| ASO | Órgano sensorial de la antena |
| AP | Fosfatasa Alcalina |
| BCIP/NBT | 5-Bromo-4-Cloro-Indol/Tetrazolium nitro azul |
| β-Gal | β-Galactosidasa |
| BSA | Albumina Sérica Bovina |
| BX-C | Complejo Bithorax |
| ci | Cirri |
| CPS | Esqueleto cefalofaríngeo |
| CyO | Curly of Oster |
| °C | Grados Celsius |
| d | Denticula dorsal |
| ΔHD | Delección en el homeodominio |
| <i>Dfd</i> | <i>Deformed</i> |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico |
| eps | Esclerito epistomal |
| Exd | Cofactor extradenticle |
| <i>fh</i> | <i>forkhead</i> |
| Fkh | Proteína forkhead |
| g | Gramos |
| g | Gravedad |
| h | Horas |
| H | Pieza H |
| HD | Homedominio |
| Hth | Homothorax |
| Hys | Esclerito hyposomal |
| kb | Mil pares de bases |
| <i>Lab</i> | <i>labial</i> |
| LG | Lateralgräten |
| Lr | Labrum |
| RMN | Resonancia Magnética Nuclear |
| M | Concentración molar |
| mH | Ganchos de la boca |
| min | Minutos |
| μl | Microlitros |
| ml | Mililitros |
| MxSO | Organo sensorial maxiliar |
| pb | Pares de bases |
| PBS | Buffer fosfato salino |
| PBT | Buffer fosfato salino + Tritón X-100 |
| PDB | Cinturón de denticulas posterior |
| pH | Logaritmo negativo de la concentración de iones hidrógeno |
| <i>ptc</i> | <i>Potenciador patched</i> |
| PS | Parasegmento |
| <i>Scr</i> | <i>Sex combs reduced</i> |
| T1 | Segmento torácico 1 |
| T2 | Segmento torácico 2 |
| T3 | Segmento torácico 3 |
| <i>Ubx</i> | <i>Ultrabithorax</i> |
| v | Denticula ventral |
| VP | Placas verticales |
| YPWM | Tirosina-Prolina-Triptofano-Metionina |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 1 | Colinearidad en la expresión de los genes Hox en <i>D. melanogaster</i> y en ratón..... | 8 |
| Figura 2 | Organización estructural del gen <i>Antp</i> y la proteína Antennapedia..... | 9 |
| Figura 3 | Interacción del homeodominio Antennapedia con el DNA..... | 11 |
| Figura 4 | Pérdida en la involución de la cabeza causada por expresión ectópica de <i>Antp</i> | 12 |
| Figura 5 | Transformación del segmento protorácico (T1) a mesotorácico (T2)..... | 13 |
| Figura 6 | Localización del tetrapéptido “YPWM” en <i>Antp</i> | 14 |
| Figura 7 | El elemento <i>fkh</i> [250 ^{con}] es activado por <i>Antp</i> <i>in vivo</i> | 16 |
| Figura 8 | Regulación de la expresión génica mediante el sistema binario GAL4/UAS..... | 17 |
| Figura 9 | Pérdida de la involución de la cabeza por la expresión ectópica de <i>Antp</i> | 26 |
| Figura 10 | Representación esquemática de las mutantes de Antennapedia y su efecto en el desarrollo de <i>D. melanogaster</i> | 29 |
| Figura 11 | Expresión ectópica de <i>Antp</i> en los segmentos torácicos..... | 30 |
| Figura 12 | Determinación del patrón de expresión del potenciador <i>patched</i> en el estadio embrionario de <i>D. melanogaster</i> | 31 |
| Figura 13 | Esquema de las cruzas para determinar el mecanismo de activación del tetrapéptido “YPWM” en el gen <i>fkh</i> [250 ^{con}]- <i>lacZ</i> | 32 |
| Figura 14 | Activación ectópica del elemento <i>fkh</i> -[250 ^{con}] mediante expresión de <i>Antp</i> en el dominio <i>ptc</i> | 32 |
| Figura 15 | Efecto de la expresión ectópica de <i>Antp</i> y sus mutantes en el elemento <i>fkh</i> [250 ^{con}]- <i>lacZ</i> | 33 |
| Figura 16 | Modelo propuesto para la activación del elemento <i>fkh</i> [250 ^{con}] por <i>Antp</i> | 37 |

LISTA DE TABLAS

| | | |
|-----------|---|----|
| Tabla I | Cinética de inducción de Antp en la pérdida de la involución de la cabeza..... | 27 |
| Tabla II | Cinética de inducción de Antp en la transformación homeótica del segmento T1 a T2.. | 27 |
| Tabla III | Efecto de la expresión ectópica de Antp y sus mutantes..... | 30 |

AGRADECIMIENTOS

Al M.C. Claudio Moreno Rocha. Por su constante apoyo y buena charla.

Al Biol.. Jorge Armando Verduzco “El ultimo de los naturalistas”. Por su agradable charla y excelente disposición para escuchar cualquier cosa.

A la Dra. Diana Resendéz Pérez. Por haber apoyado a un estudiante de mente disipada.

A Nancy Villarreal. Por su excelente charla y apoyo constante.

A mis compañeros de laboratorio: Magda, Argentina, Jannet, Edith, Diana, Maribel y Efrén.

A la *Drosophila melanogaster*. Por su incondicional entrega y sacrificio para lograr el entendimiento de los mecanismo^Sde regulación de la expresión génica durante el desarrollo.

A todos los sospechadores de la ciencia, que conocí y que no conocí, de cuyos conocimientos e inventos me he valido durante el desarrollo de esta tesis.

A mis amigos: De los que he aprendido mucho. Siempre buenos conversadores y algunos buenos bebedores. Gracias!!!

Al “Gran Homeótico”. Que se niega a ser pero que sin embargo se manifiesta.

Al Dr. Richard S. Mann del Departamento de Bioquímica y Biofísica Molecular de la Universidad de Columbia por la generosa donación de las moscas transgénicas *fkh* y *patched*.

Al personal del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas por las facilidades prestadas para la elaboración de este proyecto.

Este trabajo recibió apoyo económico a partir de los proyectos del CONACYT # 31390-N y PAICYT # CN501-01.

RESUMEN

Inglés OK Aminoácido
Castellano OK Aminoácida

Comparaciones en la secuencia aminoacídica de diferentes homeoproteínas muestra que además del homeodominio existe el motivo de cuatro aminoácidos "YPWM" altamente conservado (Qian *et al.*, 1992). Una de las preguntas fundamentales en Biología del Desarrollo es cómo homeoproteínas tan similares adquieren distintas funciones durante el desarrollo. En este trabajo nos enfocamos a la determinación de la actividad funcional de Antp y mutantes en "YPWM" en embriones así como ^{al} el análisis de la activación sobre el gen blanco *fkh* para estudiar el mecanismo molecular de acción del tetrapéptido "YPWM" en *Antennapedia* (Antp).

Para inducir la expresión ectópica de Antp en el estadio embrionario de *Drosophila* utilizamos el sistema binario UAS/GAL4. (Brand y Perrimon, 1993). El fenotipo mostrado por el testigo positivo, en el cual se expresó ectópicamente la proteína Antp silvestre, mostró una pérdida completa en el proceso normal de involución de la cabeza y la transformación homeótica del primer segmento torácico al segundo segmento (T1 a T2). Sorprendentemente, la sustitución de alanina en el motivo "YPWM" mostró un efecto dramático sobre la actividad funcional de Antp en *Drosophila*. Estas mutantes mostraron solamente una pérdida leve o nula en la involución de la cabeza y en la transformación de T1 a T2, así como una reducción y/o pérdida total de la identidad torácica en comparación con el testigo positivo.

drástico
??
drama?

Usando el mismo sistema UAS/GAL-4 utilizamos el potenciador específico de tejido *patched* para dirigir la expresión de Antp y analizar la activación de *fkh[250^{con}]*, mediante la detección inmunohistoquímica del gen reportero *lacZ*. El análisis de activación de Antp sobre el elemento *fkh[250^{con}]-lacZ* mostró que Antp silvestre expresada ectópicamente en embriones de *Drosophila* fué capaz de activar ectópicamente a este elemento. Interesantemente, el testigo negativo y las mutantes en el tetrapéptido "YPWM" fueron incapaces de activarlo mostrando solamente el patrón de expresión endógeno.

Nuestros resultados sugieren fuertemente que el motivo "YPWM" es crucial para la actividad funcional de la proteína Antp en el estadio larvario así como para la activación del elemento *fkh[250^{con}]-lacZ*. El análisis molecular del tetrapéptido "YPWM" de Antp en la regulación de otros genes blanco de Antp como *teashirt* y *apterus* confirmarán el papel funcional del motivo "YPWM" en Antp *in vivo* en *D. melanogaster*.

I. INTRODUCCION

Durante el desarrollo embrionario de los diferentes organismos, las homeoproteínas son las responsables de especificar posiciones la identidad celular a lo largo de los ejes antero posterior y dorso ventral. Estas homeoproteínas son factores de transcripción que regulan la expresión de los genes necesarios para establecer la identidad segmental mediante un motivo estructural altamente conservado denominado homeodominio. El contacto específico con el DNA para llevar a cabo sus diversas funciones en el desarrollo se establece precisamente mediante ^{la unión} unión con el homeodominio. Los homeodominios se encuentran en numerosas proteínas regulatorias de especies tan diversas como son las levaduras, esponjas y mamíferos superiores incluyendo al hombre, esto implica que existe un mecanismo altamente conservado para la regulación de la expresión genética durante el desarrollo. El extraordinario grado de conservación encontrado en las secuencias de los homeodominios sugiere que evolucionaron a partir de un antecesor común mediante duplicación genética. Presumiblemente las variaciones acumuladas en el homeodominio y en las regiones adyacentes en la proteínas durante esta duplicación genética permitió que adquirieran nuevas funciones de regulación durante el desarrollo, sin embargo la divergencia debió ser restringida mediante las interacciones moleculares necesarias para su función.

Estudios *in vitro* han demostrado que las propiedades de unión al DNA de las homeoproteínas son muy similares. Por lo que una pregunta fundamental en Biología del Desarrollo es ¿Cómo proteínas tan similares producen *in vivo* diferentes efectos para la determinación de los distintos programas de regulación? Las homeoproteínas adquieren la especificidad de activación/represión en un tejido mediante interacción con factores activadores ó represores, por lo que otras regiones fuera del homeodominio podrían estar implicadas en esta regulación. El análisis de las secuencias aminoácidas adyacentes al homeodominio han mostrado que existe una región altamente conservada río arriba de éste, el tetrapéptido “YPWM” (Tirosina-Prolina-Triptofano-Metionina) que no establece contacto con el DNA y que interactúa con cofactores que modulan la especificidad de la homeoproteína.

1 Antecedentes

a) Genes homeóticos

El primer paso para el conocimiento de los genes reguladores del desarrollo se inició con el estudio de las mutaciones en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* que producen la transformación parcial o completa de un segmento del cuerpo por otro homólogo. Estas mutaciones fueron denominadas “homeóticas” basadas en el trabajo de William Bateson en 1894 que postuló el término “Homeosis” para describir a las substituciones de partes del organismo por otras estructuras homólogas.

El primer mutante homeótico en *Drosophila* fue Bithorax descrito por Calvin Bridges en 1919 con una transformación en el tercer segmento torácico donde los halterios u órganos de equilibrio son transformados en un segundo par de alas (segundo segmento torácico). Posteriormente, se describió *Antennapedia (Antp)*, otro mutante homeótico en la cual las antenas son substituídas por una par de patas. Elegantes experimentos realizados por Edward Lewis en 1978 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). Los genes homeóticos miembros del complejo ANT-C son Labial (lab), Proboscipedia (pb), Deformed (Dfd), Sex-comb-reduced (Scr) y Antennapedia (Antp). El complejo BX-C incluye los genes Ultrabithorax (Ubx), Abdominal A (AbdA) y Abdominal B (AbdB) (Lewis, 1978).

Experimentos realizados con los genes homeóticos muestran que la organización de ellos es colinear con su expresión a lo largo del eje antero-posterior del cuerpo. Estos se expresan en regiones específicas de acuerdo al orden en el que se encuentran en el cromosoma, por lo que existe una colinearidad en la expresión (Figura 1) (Duboule y Dolle., 1989). Además, presentan el fenómeno llamado supresión fenotípica o prevalencia posterior, mediante la cual los genes homeóticos posteriores reprimen la función de los que son expresados más anteriormente (Duboule y Morata, 1994).

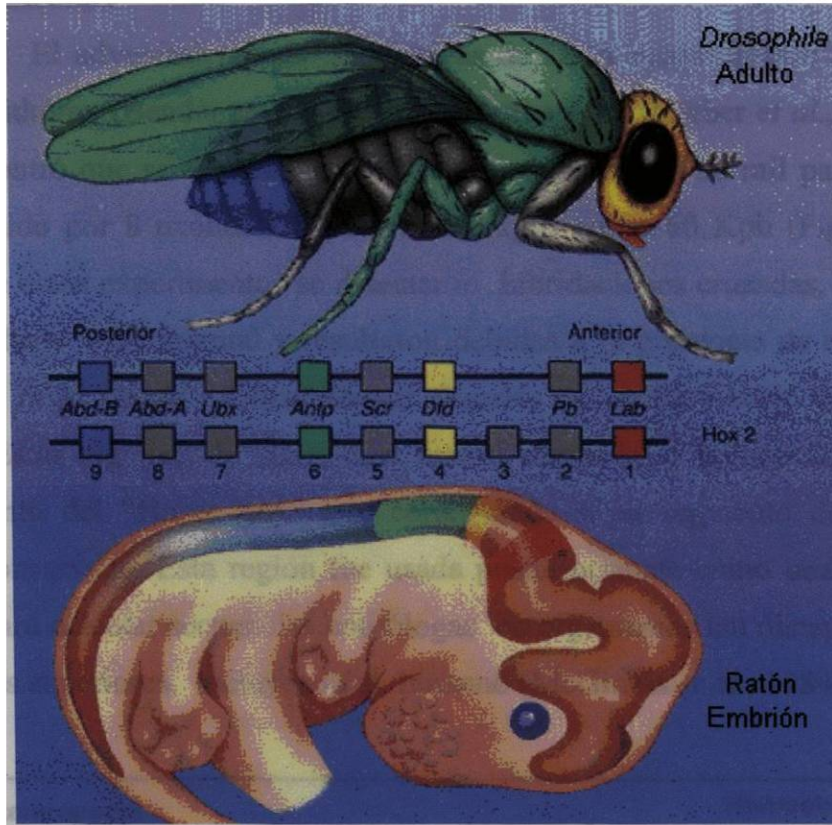


Figura 1. Colinearidad en la expresión de los genes Hox en *Drosophila melanogaster* y en ratón. La organización de los genes homeóticos es colinear con su expresión a lo largo del eje antero posterior del cuerpo (Adaptado de D. Duboule 1994).

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, y las mutantes con ganancia de función presentan la transformación opuesta. El resultado de estas mutaciones corroboran 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. En *D. melanogaster* los genes maternos, gap, pair-rule y de polaridad de segmentos son secuencialmente activados, formando una cascada genética, que subdivide al embrión en 14 parasegmentos y resulta en la segmentación característica de estos insectos. Estos genes interactúan para regular la transcripción de los genes homeóticos los cuales determinan finalmente el destino de cada par de segmentos para establecer y mantener la identidad segmental necesaria en la especificación del plan del cuerpo (Prince F., 1998).

b) Homeobox

El advenimiento de las técnicas de DNA recombinante permitió clonar los complejos Bithórax (Bender *et al.*, 1983) y Antennapedia (Garber *et al.*, 1983). El locus de *Antp* se encontró que se extiende en una región de más de 100 mil pares de bases (pb) y está constituido por 8 exones e intrones tan largos como 60 Kpb (Figura 2). Durante el desarrollo de estos experimentos se detectaron hibridaciones cruzadas, las cuales se creían eran un artefacto experimental y resultaron debidas a la presencia de regiones homólogas en los genes *fushi tarazu* y *Ultrabithorax* situados río arriba y abajo de *Antp* (Kuroiwa *et al.*, 1984). Estas regiones de homología fueron mapeadas y secuenciadas conduciendo al descubrimiento del "Homeobox" que corresponde a un segmento de ADN de 180 pb altamente conservado. Esta región fue usada posteriormente como una sonda o rastreador molecular para detectar secuencias homólogas en organismos tan distantes como levaduras y vertebrados superiores, incluyendo al humano (McGinnis *et al.*, 1984).

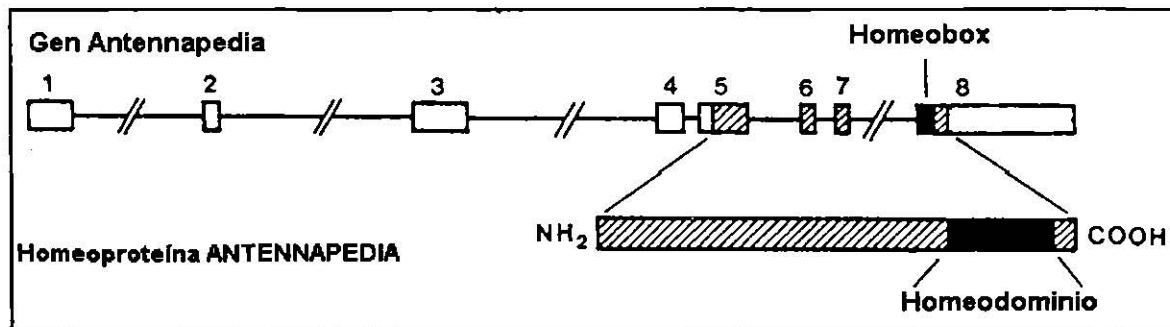


Figura 2. Organización estructural del gen *Antp* y la proteína Antennapedia. Los exones 1-8 están separados por siete intrones. El homeobox está localizado en el exón 8, por lo que el homeodominio se localiza cerca del extremo carboxiloterminal (COOH) de la proteína *Antp* (Tomado de Gehring W., 1990).

El homeobox es una región de 180 pb que codifica para un dominio estructural de 60 aminoácidos altamente conservado llamado homeodominio. El análisis y comparación del homeobox y homeodominios de diferentes especies de insectos y vertebrados mostraron que 13 de los 60 aminoácidos permanecen conservados, esta secuencia consenso es casi idéntica a la secuencia del homeodominio codificada por *Antp*, por lo que se ha propuesto que *Antp* representa la secuencia ancestral o prototipo (Gehring, 1987). El estudio de la estructura de este homeodominio se realizó mediante el análisis tridimensional de esta proteína por espectroscopía Resonancia Magnética Nuclear (RMN) en solución. Estos estudios mostraron que muy probablemente el homeodominio de *Antp* tendría un motivo

del tipo “hélice-vuelta-hélice” como en el caso de otras proteínas procarióticas que se unen al DNA.

c) Antennapedia

El análisis molecular de las mutantes de *Drosophila* con la transformación antena por pata demostró que estas se debían a una inversión cromosomal por lo que se esperaba una pérdida de función y no una ganancia de función como se observaba realmente. Sin embargo, el estudio de varias mutantes de este tipo mostró que la inversión cromosomal deja en la mayoría de los casos al gen completo bajo la regulación de otra región de control (promotor-potenciador). Schneuwly y colaboradores realizaron la inserción del DNA complementario de *Antp* en un vector de expresión regulado por un promotor sensible a choque térmicos que al ser aplicados promueven la expresión ectópica de este gen; es decir se expresó *Antp* en regiones que normalmente no lo hace. Estos estudios mostraron que la transformación de antena por pata resultante se debió a la sobre expresión-ectópica de la proteína *Antp* (Schneuwly *et al.*,1987).

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. G. Struhl en 1981 realizó experimentos con clones de tejido mesotóraxico de las patas que eran deficientes para *Antp* observando 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 las 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 y 2001). 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 clones mutantes de adultos (sin *Antp*) las células de la pata se diferencian como estructuras de antena (Wakimoto y Kaufman, 1981).

La estructura tridimensional de *Antennapedia* analizada por espectroscopía RMN, mostró tres α -hélices con una “vuelta” de 5 aminoácidos entre la hélice 1 y la hélice 2, y una “vuelta” de 4 aminoácidos entre la hélice 2 y hélice 3 (Gehring *et al.*, 1995). 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). El análisis de los complejos *Antp*-DNA mostró que los contactos principales se localizan en la hélice de reconocimiento (3/4) que se une al surco mayor del DNA y el extremo N-terminal se une a bases específicas del surco menor del DNA (Figura 3) (Otting *et al.*, 1990). La mayoría de estos ensayos de unión al DNA usaron tanto las secuencias “TAAT” en la hebra líder como las “ATTA” en la hebra complementaria como sitios de unión para el homeodominio (Kalions y O’Farrell, 1993).

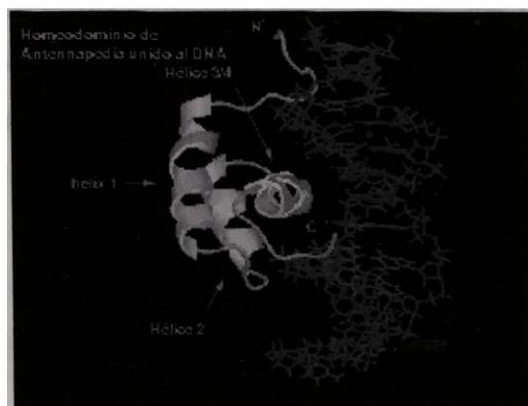


Figura 3. Interacción del homeodominio Antennapedia con el DNA. Los principales contactos proteína-DNA se realizan entre la hélice de reconocimiento 3/4 con el surco mayor del DNA y el extremo amino terminal del homeodominio con el surco menor.

Interesantemente, el análisis de la estructura tridimensional mediante RMN del homeodominio *Antp* mutado con una deleción en el brazo N-terminal mostró que la estructura de éste homeodominio truncado permanece intacta estructuralmente. Sin embargo, la afinidad de unión al DNA de éste homeodominio truncado muestra una disminución que se puede atribuir a la ausencia de contactos presentes en el extremo N-terminal del homeodominio (Qian *et al.*, 1994). Las proteínas monoméricas del

homeodominio presentan una limitada capacidad para discriminar diferentes secuencias de nucleotídicas, pero su especificidad es notablemente promovida mediante otros factores para unirse al DNA (Mann y Chan, 1996). Por otro lado, experimentos genéticos *in vivo* en *Drosophila* realizados mediante sustitución recíproca de cuatro residuos en el extremo N-terminal entre *Antp* y *Sex comb reduced* (*Scr*), cambiaron sorprendentemente la especificidad funcional de *Antp* a *Scr* y viceversa (Furukubo-Tokunaga *et al.*, 1993). Estos experimentos genéticos *in vivo* demostraron claramente la importancia funcional de estos residuos y sugirieron fuertemente que el extremo N-terminal de los homeodominios está involucrado en interacciones con otras proteínas accesorias y/o factores transcripcionales que permiten la especificidad funcional de los mismos.

La expresión ectópica de *Antp* en el estadio larvario de *Drosophila* causa la inhibición de la involución de la cabeza y afecta estructuras en la parte dorsal de la cabeza y las bandas de denticulas. Los efectos más notorios observados en las primeras nueve horas del desarrollo es la pérdida de la involución de la cabeza, en particular el esqueleto cefalofaríngeo (CPS) el cual aparece anterior al tórax, con las placas ventrales reducidas a un material endurecido disperso. También el lateralgräten el cual está situado antero-ventralmente alrededor de la circunferencia de la cabeza. Otra estructura que se modifica es el esclerito epistomal y el labrum, los cuales se encuentran en la superficie dorsal de la cabeza, mientras que los ganchos de la boca, el cirri y el complejo anteromaxilar yacen lateralmente (Figura 4).

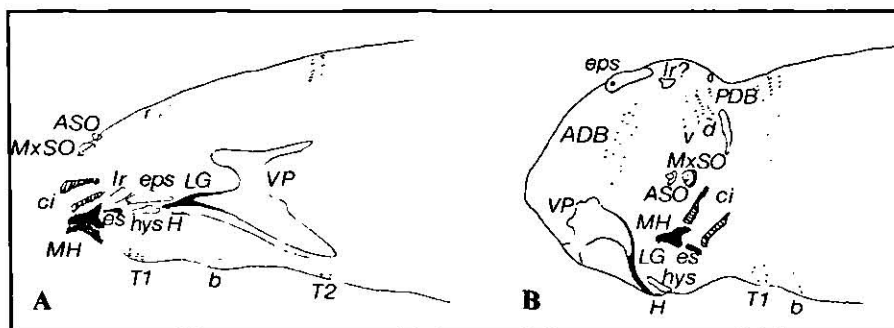


Figura 4. Pérdida en la involución de la cabeza causada por expresión ectópica de *Antp*. (A) Diagrama que muestra la cabeza en el primer estadio larvario, mostrando la localización de las estructuras de la región anterior. ASO, órganos sensorial de la antena; ci, cirri; CPS, esqueleto cefalofaríngeo; eps, esclerito epistomal; es, esclerito ectosomal; H, pieza-H; hys, esclerito hyposomal; LG, lateralgräten; lr, labrum (diente medio); MH, ganchos de la boca; MxSO, órgano sensorial maxiliar; VP, placas verticales; T1, protórax (b, bandas del protórax; T2, mesotórax. (B) Diagrama esquemático de la falta de la involución de la cabeza que muestra estructuras cuticulares inducidas por la expresión ectópica de *Antp* durante las primeras 7 h de la embriogénesis. ADB, cinturón de denticulas anterior; PDB, cinturón de denticulas posterior, incluyendo la denticula dorsal (d) y ventral (v) (Tomado de Gibson y Gehring, 1988).

región flexible de la proteína no estructurada en solución. Estos resultados permitieron postular que el tetrapéptido “YPWM” en combinación con el brazo flexible amino-terminal constituyen un puente de conexión flexible entre el HD y el resto de la homeoproteína. La importancia de este puente flexible esta relacionada con interacciones específicas proteína-proteína ya que se encuentra en una región expuesta en la superficie de ésta homeoproteína (Qian *et al.*, 1992).

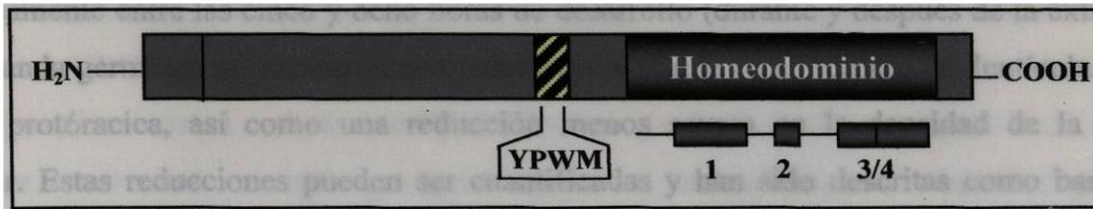


Figura 6. Localización del tetrapéptido YPWM en Antp. El motivo “YPWM” altamente conservado en las diferentes homeoproteínas se encuentra río arriba a una distancia variable del homeodominio dependiendo de la homeoproteína.

Para analizar la función *in vivo* del motivo "YPWM" en Antp, se llevó a cabo un análisis mutacional del mismo y sus regiones flanqueantes. Estos experimentos fueron realizados mediante mutagénesis dirigida con sustituciones de alanina (A) en bloques de cuatro aminoácidos cada una. Estas se dirigieron al motivo central del tetrapéptido y sus regiones flanqueantes. Cada construcción recombinante fue introducida en la línea germinal de las moscas y obteniéndose líneas independientes múltiples para Antp y cada una de sus formas mutantes. Para la expresión ectópica de Antp se diseñó el sistema de regulación de la expresión génica mediante el uso del sistema de Tetraciclina (Bello y colaboradores, 1998). La expresión ectópica de Antp silvestre a 6.5 usando el sistema *Tet* produjo la transformación homeótica esperada con una pérdida total de la involución de la cabeza y una transformación del segmento protorácico (T1) a mesotorácico (T2). La expresión de las mutantes en los cuatros aminoácidos flanqueantes a “YPWM” de Antp también bloquearon la involución de la cabeza y produjeron la transformación de T1 a T2 muy similar al testigo positivo descrito anteriormente. La sustitución del motivo “YPWM” en Antp mostró un fenotipo larvario normal como el testigo negativo el cual expresó una proteína de Antp truncada, la cual carecía del Homeodominio. La mutante en “YPWM” no mostró ninguna transformación homeótica: la cabeza presentó la involución normal y no presentó la transformación de T1 a T2 como lo demuestra la presencia del cinturón de

El ejemplo más claro del cambio en la identidad segmental del embrión es la transformación del protórax (T1) en mesotórax (T2). En los embriones silvestres, los segmentos protorácicos presentan dos bandas de dentículas y un amplio cinturón anterior de cinco o cuatro líneas, que se extiende alrededor del embrión uniéndose a los pelos dorsales y un parche posterior de dentículas delgadas. Los embriones con *Antp* expresada ectópicamente entre las cinco y ocho horas de desarrollo (durante y después de la extensión de la banda germinativa) muestran una reducción variable en el número de dentículas en la banda protorácica, así como una reducción menos severa en la densidad de la banda anterior. Estas reducciones pueden ser cuantificadas y han sido descritas como banda de dentículas “Normal” si al menos presentan cinco líneas de dentículas, “Ausente” si presentan menos de 20 dentículas, y “Reducido” si presentan un número intermedio de dentículas (Fig 5 A, B y C respectivamente) (Gibson y Gehring, 1988).

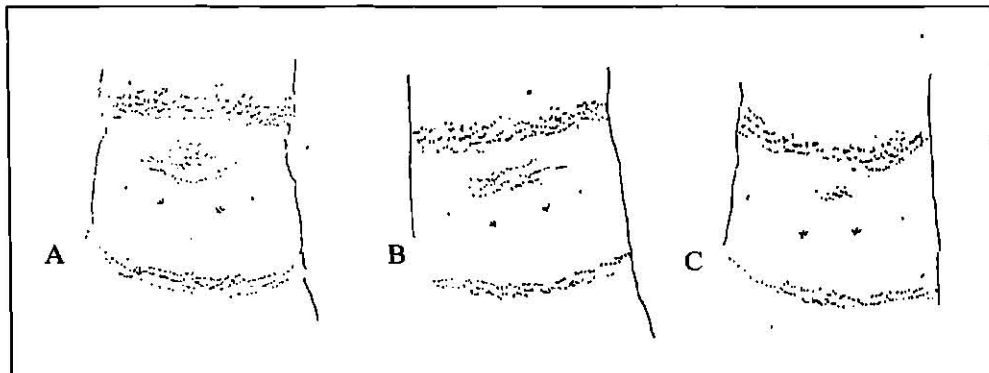


Figura 5. Transformación del segmento protorácico (T1) a mesotorácico (T2). Diagrama del protórax ventral de embriones representativos de *Drosophila* mostrando los fenotipos de las bandas de dentículas Normal (A), Reducido (B) y Ausente (C) (Tomado de Gibson y Gehring, 1988).

d) El motivo YPWM

Comparaciones de la secuencia de aminoácidos en diferentes homeoproteínas mostró que además del HD existe otra región altamente conservada, el tetrapéptido “YPWM” (Tirosina, Prolina, Triptofano y Metionina). Este motivo está localizado río arriba de la mayoría de los genes homeóticos y se conecta al HD mediante el brazo amino terminal flexible de este (Burglin, 1994). El número de aminoácidos que separan este motivo de la región N-terminal flexible es variable en las diferentes homeoproteínas (Figura 6). El análisis estructural de esta región en *Antp* mostró que el tetrapéptido “YPWM” no presenta una estructura tridimensional definida, es decir corresponde a una

denticulas en el segmento torácico T1. Estos resultados sugieren que el motivo “YPWM” es necesario e indispensable para la función *in vivo* de Antp (Resendéz-Pérez, en preparación)

Estudios en otras homeoproteínas han señalado que el tetrapéptido está involucrado en interacciones proteína-proteína como es el caso del dímero Ubx y el cofactor Exd en donde se ha demostrado que el mayor contacto se realiza mediante el tetrapéptido (Johnson *et al.*, 1995) (Passner *et al.*, 1999). Análisis *in vitro* mediante el uso de anticuerpo dirigidos contra el motivo YPWM han confirmado que este es necesario para la cooperación de las homeoproteínas con el cofactor de PBX (el ortólogo de Exd) (Shanmugam *et al.*, 1997) Estudios *in vitro* han mostrado que la formación del heterodímero entre la homeoproteína HOXB1 y el cofactor PBX1 está mediado por la interacción con el hexapéptido “-Y/F-P-W-M/R-” de HoxB1 (Pipper *et al.*, 1999).

e) Genes blanco de Antennapedia

Los productos de los genes homeóticos son factores transcripcionales que controlan la formación de segmentos específicos y tejidos mediante la regulación de la transcripción de genes blanco río abajo “downstream”. Los genes blanco pueden ser activados por algunas proteínas y reprimidos por otras. Algunos genes requieren una sola homeoproteína pero, en algunos casos combinaciones de homeoproteínas ó mediante heterodímeros, tetrámeros que activan diferencialmente los genes blanco en los diferentes tejidos (McCormick, *et al.*, 1995).

A la fecha se conocen varios genes bajo la regulación de Antp: *tsh* (McCormick *et al.*, 1995), *apterus* (Capoville *et al.*, 2001), *decapentaplegic* (Manak *et al.*, 1995), un fragmento derivado del potenciador de *forkhead* (*fkh*[250^{con} J]) (Ryoo y Mann, 1999).

Forkhead (*fkh*) se expresa en el primordio de las glándulas salivales durante el desarrollo embrionario, este se forma en el lado ventral del PS2 durante la etapa 11. Las células que expresan *fkh* eventualmente se invaginan para formar la glándula salival embrionaria. *Scr* es uno de los genes requeridos para la activación de *fkh* y la formación de las glándulas salivares.(Panzer *et al.*, 1992; Andrew 1998).

Ryoo y Mann en 1999 describieron una región de 5kb del gen *fkh* la cual dirige que dirige la expresión de un gen reportero en un patrón idéntico al de la proteína Fkh. Dentro de este potenciador esta un elemento de 37 pb denominado *fkh[250]*, que contiene la secuencia 5'-AGATTAATCG-3' con sitios de unión para la homeoproteína Scr y el cofactor *extradenticle* (Scr/Exd). Para probar la actividad de este elemento se clonaron cuatro copias de *fkh[250]* río arriba de un promotor que regula al gen reportero *lacZ*. La mutación de dos pares de bases de este elemento 5'- AGATTTATGG-3' convirtió este sitio de unión natural del heterodímero Scr/Exd a un sitio de unión consenso, denominado *fkh [250^{con}]*. Este elemento se fusionó con cuatro copias del elemento *fkh [250^{con}]* al gen reportero *LacZ* (β -galactosidasa) y se probó su actividad *in vivo*. Mientras que la expresión de *fkh[250]-lacZ* se encuentra limitada al PS2, la expresión de *fkh [250^{con}]-LacZ* se observa del PS2 hasta PS6 (Figura 7 A). En mutantes dobles que carecen de los genes *Scr* y *Antp*, no se detectó β -gal en los PS2 y PS5, pero si en PS6 y hacia la parte posterior del embrión. Por otro lado, la dirección de la expresión ectópica de *Antp* utilizando el potenciador *patched* (*ptc*) y activó *fkh[250^{con}]-lacZ* ectópicamente en la cabeza del embrión (Figura 7 B) (Ryoo y Mann, 1999).

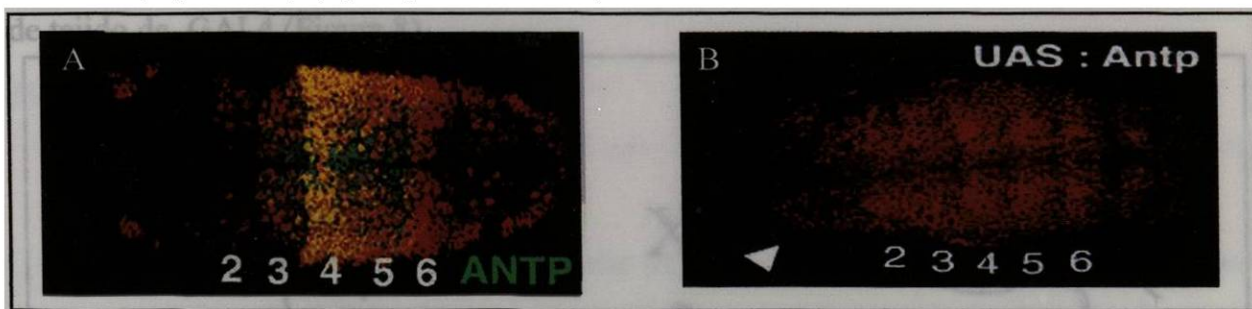


Figura 7. El elemento *fkh[250^{con}]* es activado por *Antp in vivo*. (A) Doble tinción fluorescente de embriones *fkh[250^{con}]-lacZ*; rojo para β -gal y verde para *Antp*. (B) La expresión ectópica de *Antp* usando el potenciador *ptc* activa ectópicamente *fkh[250^{con}]-lacZ* en regiones anteriores (cabeza de flecha).

f) Sistema binario GAL4/UAS

La generación de fenotipos con ganancia de función mediante la expresión ectópica de genes conocidos provee complemento en el campo de la genética, en el que los genes son identificados a través de las mutaciones que reducen o eliminan la función genética (Brand y Perrimon, 1993). El sistema de expresión GAL4 es una herramienta poderosa para la expresión génica ectópica en *Drosophila* que permite la activación selectiva de cualquier gen clonado mostrando una amplia variedad de patrones de tejido y

celulares específicos. Sistemas similares basado en la expresión de GAL4 han sido aplicados en ratón (Ornitz *et al.*, 1991), pez zebra (Scheer y Campos-Ortega 1999) y en plantas (Ma *et al.*, 1988). Modificaciones recientes al sistema han permitido en embriones el mapeo específico del destino celular (Sullivan *et al.*, 2000)

GAL4 es un factor de transactivador de levaduras que permite la activación de genes selectivamente debido a que no tiene genes blanco conocidos en *Drosophila* se puede expresar en células y tejidos del organismo sin ningún efecto detectable. La línea productora GAL-4 expresa el activador transcripcional GAL4 en diferentes células y tejidos mediante una región potenciadora fusionada al DNA complementario de GAL4 que se integra al azar dentro del genoma de *Drosophila* mediante la transposición usando el elemento P (Brand y Perrimon, 1993). Dependiendo del sitio de integración del potenciador se produce la expresión de GAL4 que puede ser dirigida en tiempo y en espacio. Para la generación de la línea reportera se usa un segundo gen el cual puede ser un gen reportero o algún otro de interés conteniendo los sitios de unión al regulador GAL4 (UAS: secuencias de activación río arriba). Mediante una crucea genética de la línea productora y reportera, el gen de interés solo se expresará en las células hacia donde se dirigió la expresión específica de tejido de GAL4 (Figura 8).

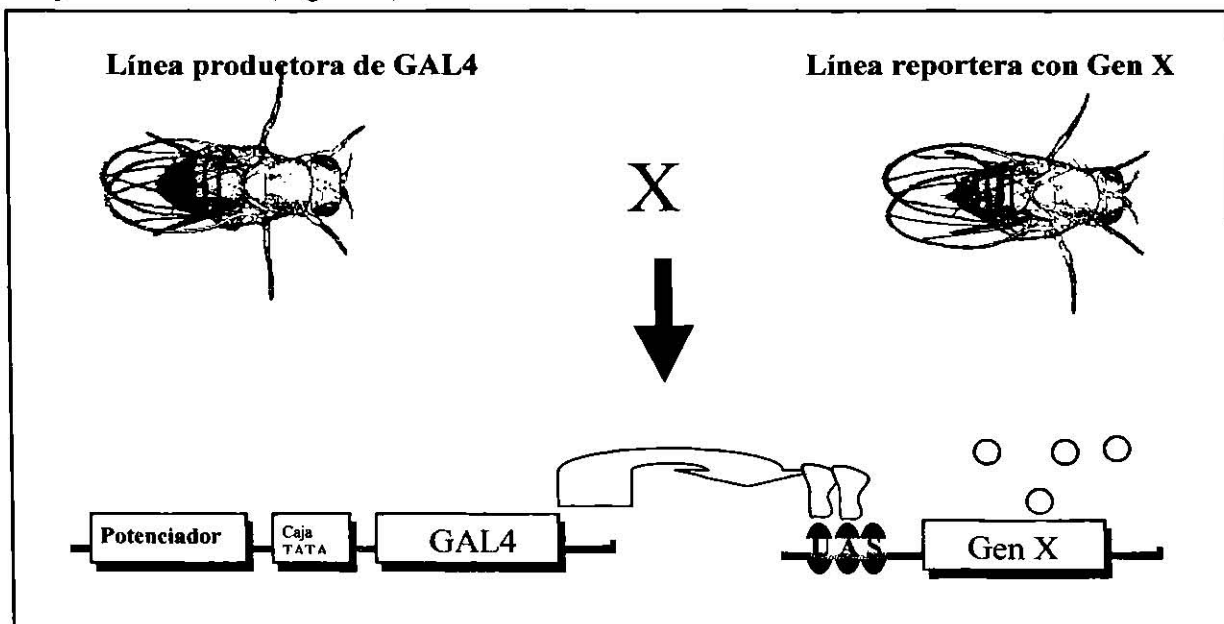


Figura 8 . Regulación de la expresión génica mediante el sistema binario GAL4-UAS. El gen de levadura GAL4 que codifica para una proteína transactivadora, es introducido al genoma de *Drosophila*, su expresión es regulada por un potenciador específico de tejido. Las líneas de *Drosophila* que expresan GAL4 en tejidos y células específicas (Línea productora) son cruzadas con líneas que contienen el gen blanco de

interés (Gen X) que está subclonado río abajo de cinco sitios de unión para GAL4 (UAS) (Línea reportera). El gen blanco se expresa en la progenie, solo en las células y tejidos en donde GAL4 está presente.

2 Importancia

Uno de los problemas centrales en Biología del Desarrollo consiste en determinar como se lleva a cabo la especificidad funcional de las diferentes homeoproteínas durante el desarrollo. Estas homeoproteínas contienen homeodominios muy similares que se expresan en la mayoría de los casos en las mismas células donde llevan a cabo sus funciones regulatorias. Este es el primer estudio *in vivo* de la determinación de la actividad funcional del tetrapéptido “YPWM” en los homeodominio de Antennapedia ya que la mayoría de los trabajos descritos anteriormente han sido realizados *in vitro*.

II. Hipótesis

La determinación de la actividad funcional de Antp y mutantes en embriones y el análisis de la activación de Antp silvestre y las mutantes en “YPWM” sobre el gen blanco *fkf* permitirá describir el mecanismo molecular de acción del tetrapéptido “YPWM” en Antp.

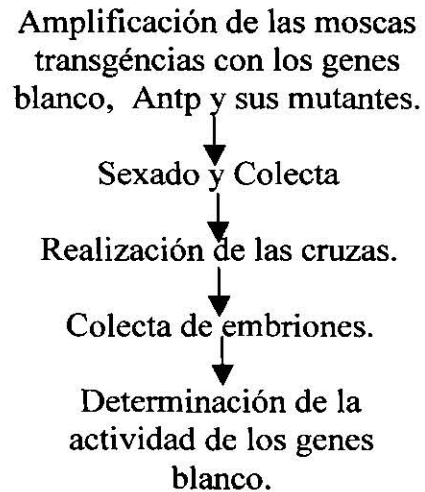
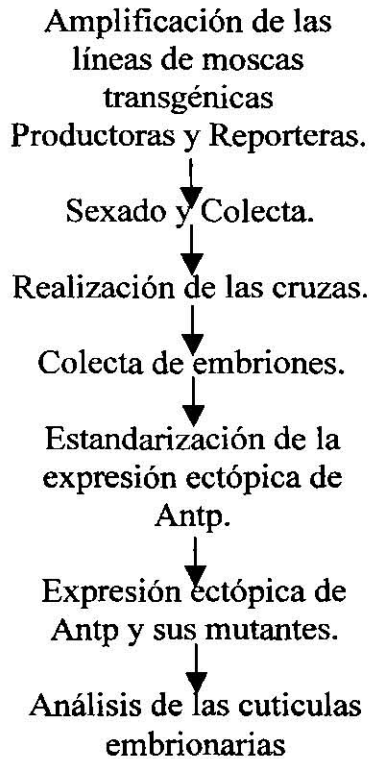
II. Objetivo

- a) Determinar la actividad funcional del tetrapéptido “YPWM” en el estadio larvario de *Drosophila melanogaster*.
- b) Determinar el mecanismo molecular de activación del tetrapéptido “YPWM” en el gene blanco de Antp *fkf*.

1 ESTRATEGIA GENERAL

Determinar la actividad funcional del tetrapéptido “YPWM” en el estadio embrionario usando el modelo UAS/
GAT 4

Determinar el mecanismo molecular de activación del tetrapéptido “YPWM” en el gene blanco de *Antp fkh*



III. Materiales y métodos

1 Amplificación y mantenimiento de las moscas transgénicas

Todas las líneas de *Drosophila* fueron mantenidas 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 activa seca. Las líneas de moscas necesarias para las cruzas fueron amplificadas mediante colectas de huevos por corto tiempo para evitar sobrepoblación y mantenidas en botellas a 25° C. En general, todas las líneas de moscas transgénicas fueron mantenidas a 18° C y transferidas a comida fresca una vez al mes.

Las líneas de moscas transgénicas productoras y reporteras usadas durante el desarrollo del presente fueron las siguientes:

Hs-GAL4: Esta línea productora posee un promotor de choque térmico fusionado río arriba de la secuencia codificante del factor transactivador de levadura GAL4 (el tercer cromosoma)

patched-GAL4/Cyo;FICI/MKRS (patched-GAL4): Esta línea productora contiene el potenciador del gen *patched* balanceado con el marcado genético *Curly (Cyo)* (fenotipo de alas rizadas), *patched* dirige la expresión ubicuota durante la etapa embrionaria 11 (el segundo cromosoma)

yw; UAS-Antp: Esta línea contiene la construcción recombinante de Antp silvestre en el tercer cromosoma, río abajo de las secuencias UAS y presentan un fenotipo con ojos blanco y cuerpo amarillo (yw; “yellow/white”).

yw;UAS-Antp HD6.1: Contiene la construcción recombinante de Antp, sin el homeodominio (La delección incluye los aminoácidos 246 al 463 de la proteína *Antp* eliminando toda la región del homeodominio, el extremo amino terminal de éste, la región del tetrapéptido “YPWM” y parte de la región central de Antp). La inserción se encuentra en el tercer cromosoma río abajo de las secuencias UAS.

yw; UAS-Antp A010-3.1: Contiene la construcción recombinante de Antp con sustitución de alanina en el motivo “YPWM”. La inserción esta localizada río abajo de las secuencias UAS en el tercer cromosoma.

yw; UAS-Antp A010-7: Contiene la construcción recombinante de Antp con sustitución de alanina en el motivo “YPWM”. La inserción esta localizada río abajo de las secuencias UAS en el tercer cromosoma.

yw; UAS-Antp A010-11: Contiene la construcción recombinante de Antp con sustitución de alanina en el motivo “YPWM”. La inserción esta localizada río abajo de las secuencias UAS en el tercer cromosoma.

fkh [250^{con}] -lacZ: Esta línea contiene un fragmento del potenciador *fkh* con 39 pb consenso que funciona como región de unión para Antp fusionado con el gen reportero de *lacZ* insertado en el tercer cromosoma.

2 Sexado y realización de cruzas

Las líneas de moscas transgénicas usadas se sexaron en base al dimorfismo sexual y el criterio de sexado se basa en las siguientes características: a) El tamaño de las hembras por lo general es mayor que el de los machos, b) El abdomen del macho tiene en su extremo terminal tres segmentos fusionados visiblemente melanizados; por su parte, el abdomen de la hembra no tiene fusionados estos segmentos y la coloración de éstos es uniforme. En las hembras, la terminación del abdomen es ligeramente puntiaguda en contraste con la del macho y c) la presencia de peines sexuales en los machos presentan 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 del primer par de patas. (Ramos y colaboradores, 1993).

Se colectaron las hembras poniendo especial atención que fuesen eclosionado durante un período no mayor de 8 horas incubadas a 25°C después de la última colecta para asegurar que sean vírgenes. De las líneas reporteras se seleccionaron machos y las hembras vírgenes de las líneas productoras.

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.

3 Inducción ectópica de Antp y sus mutantes

La expresión ectópica de Antp se realizó usando el Sistema Binario *GAL4-UAS* mediante la cruce de machos de la línea productora *Hs-GAL4* y hembras vírgenes de la línea reportera *UAS-Antp*. Para estandarizar la metodología de inducción se realizó una cinética de choques térmicos de 5, 10, 15, 20 y 25 minutos, utilizándose como testigo positivo *Antennapedia silvestre* y como negativo *Antennapedia* una delección en el homeodominio. De las cruzas de las moscas transgénicas se colectaron los embriones durante dos horas y se dejaron desarrollar hasta alcanzar 6.5 horas de desarrollo, posteriormente se colocaran sobre un papel whatman húmedo en una caja de petri pequeña (15 X 50 mm), sellándola con parafilm. Para la inducción de Antp mediante choque térmico se sumergió la caja conteniendo los embriones en un baño María a 37° C durante el tiempo requerido y se dejaron desarrollar de 16 a 32 horas.

Una vez que seleccionamos el período óptimo de inducción de Antp, aplicamos choque térmico de 15 y 20 minutos a los embriones de Antp y las mutantes A010-3.1, A010-7 y A010-11 utilizando el método descrito anteriormente.

a) Colecta de embriones de *D. melanogaster*

Se realizó una precolecta en placas de puesta de una hora a 25° C con el propósito de eliminar los huevos que estuvieran en el oviducto para permitir sincronizar la ovoposición. Los embriones ovopositados fueron colectados en una malla mediante el uso de un embudo y posteriormente se decorionaron en una solución de cloro al 3% durante tres minutos. Estos se enjuagaron con agua, se lavaron con NaCl al 0.4% y TritónX-100 al 0.1% y se enjuagaron otra vez con H₂O destilada.

b) Preparación de las cutículas embrionarias

Los embriones tratados con choques térmicos se pasaron a un tubo eppendorf con 500µl de heptanol y 500µl de metanol. Los huevos se desprendieron de la malla mediante agitación, colocándose el tubo en un brazo rotatorio por 5 minutos a máxima velocidad. Posteriormente, se retiraron ambos solventes mediante lavados que dejan los embriones en el fondo del tubo, se enjuagó tres veces con 500µl de metanol, en el último lavado se eliminó la mayor cantidad de metanol posible. Finalmente, se agregaron 100 µl de la solución Hoyer's disuelta en ácido láctico (1:1) usando una puntilla de micropipeta recortada. Se montaron los embriones en esta solución en una laminilla, y se cubrieron con un portaobjetos y se dejaron reposar durante aproximadamente una hora antes de la observación al microscopio de contraste de fases.

Las cutículas de los embriones se observaron mediante Microscopía de contraste de fases y los fenotipos obtenidos se clasificaron mediante el análisis previamente descrito por Gibson y colaboradores (1990).

4 Activación del elemento *fkf[250^{con}]* por Antp

Para el análisis del gen blanco *fkf [250^{con}]-lacZ* se cruzaron las líneas *patched-GAL4* y *fkf[250^{con}]-lacZ* y la progenie resultante se cruzó con cada una de las líneas de *UAS-Antp* descritas anteriormente (Ver Figura 9 y el esquema genético de las cruces en la

Figura 10). Se analizaron los embriones resultantes de las cruzas mediante la activación por Antp del gen reportero β -galactosidasa.

a) Colecta de embriones de *D. melanogaster*.

Los embriones producto de la crusa se colectaron durante 3 horas en placas con medio de puesta, y se dejaron desarrollar durante 5 horas y media a 25° C. Los embriones fueron decorionizados, como anteriormente se describió, y fueron pasados a un tubo eppendorf conteniendo 500 μ l de heptano, 100 μ l de formaldehído (37%) y 400 μ l de solución PIPES (0.1 M pH 6.9) para su fijación durante 20 minutos en el brazo de agitación a velocidad media. Posteriormente, se devitelinizaron y se eliminó cuidadosamente la fase del fondo, se añadieron 500 μ l de metanol, se agitaron a media velocidad en el brazo de agitación durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se lavaron tres veces con metanol. Estos embriones se almacenaron a 4° C en metanol hasta su uso ó se procesaron inmediatamente después de obtenidos.

b) Detección de β -galactosidasa en embriones de *D. melanogaster*

Los embriones fueron rehidratados reemplazando sucesivamente el metanol con 30%, 50%, 70% y 100% de PBS/metanol (v/v) y se permeabilizaron incubándose en una solución de PBT 0.1% (PBS + Tritón X 100- 0.1%) durante 30 a 90 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se agregó una solución de PBT 0.1% + Albúmina sérica bovina (BSA) al 10% que se dejó incubar durante 30 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se incubó toda la noche a 4° C con el primer anticuerpo Anti- β -galactosidasa generada en ascitos de ratón (Promega Madison, EUA) diluido 1:1000 en PBT 0.1% + BSA 1%. Se realizó un lavado rápido y tres posteriores de 30 minutos en PBT 0.1%. Previo al uso del segundo anticuerpo Anti-ratón IgG conjugado con fosfatasa alcalina (AP) (Promega. Madison, WI USA), se colectaron embriones silvestres de *D. melanogaster*, que fueron decorionizados, fijados, rehidratados, permeabilizados e incubados con el segundo anticuerpo en una dilución 1:10 en PBT + BSA 1%. durante toda la noche a 4°C. El mismo método se aplicó al segundo anticuerpo Anti-IgG de ratón acoplado al crómoforo Alexa Fluor (Molecular Probes. Eugene, OR USA) con una dilución 1:5. Usando éstos anticuerpos secundarios previamente tratados para eliminar la reacción de fondo, se

incubaron los embriones con el segundo anticuerpo en una dilución 1:10 durante 2 horas a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C. Se hizo un lavado rápido y dos de 15 minutos con PBT 0.1% y otro con PBS 1X + Tween 20 0.05%.

Para la detección cuando se utilizó el anticuerpo conjugado con AP, se agregaron 50 µl de Fosfato 5-Bromo-4-Cloro-3-Indol/Tetrazolium Nitro Azul (BCIP/NBT) (SIGMA, St. Louis MO, USA) y se dejó incubando por 20 minutos o hasta la aparición de la reacción calorimétrica en los embriones. Se paró la reacción con varios lavados con PBS 1X + Tween 20 al 0.05% y posteriormente, se deshidrataron los embriones agregando sucesivamente etanol al 30%, 50%, 70% y 100% durante 1 a 2 minutos cada uno y finalmente se agregaron 500 µl de medio para montaje (4 vol bálsamo de canada , 1 vol metilsalicilato) y se montaron en un portaobjetos cubriéndose con un cubreobjetos.

La detección de las señales específicas en los embriones se realizó mediante observación en Microscopia visible de las reacciones enzimáticas (AP). 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 un 556 nm de longitud de onda de excitación y una apertura confocal mínima para obtener la máxima resolución de las imágenes.

IV RESULTADOS

1 Análisis funcional del tetrapéptido YPWM

a) Inducción ectópica de Antennapedia

Para determinar el tiempo óptimo de la inducción ectópica de Antp se realizó una cinética de expresión con tiempos que variaron de 5 a 20 min. Para ello, cruzamos hembras vírgenes de la línea productora Hs-GAL4 con machos de las líneas productoras con Antp silvestre como testigo positivo y Antp con la delección en el homeodominio como testigo negativo. Se colectaron los embriones de la cruce, se devitelinizaron, se decorionizaron y a las 6.5 h de desarrollo se les aplicó un choque térmico de 37° C durante 5, 10, 15 ó 20 minutos. Estos embriones se dejaron desarrollar entre 16-32 h, se fijaron y montaron en la solución de Hoyer con ácido láctico y se analizaron los efectos de la expresión ectópica de Antp durante en la pérdida de la involución de la cabeza, la aparición de denticulas ectópicas en el dorso de la cabeza, y la transformación del segmento T1 a T2.

La expresión ectópica de Antp silvestre durante 5 min produjo una leve pérdida en la involución de la cabeza, a los 10 min presentó una moderada pérdida (Fig 9 A y B) mientras la inducción de Antp durante 15 y 20 min mostró el bloqueo de la involución de la cabeza de moderado a alto (Fig 9 C y D). En cambio la inducción de Antp con la delección en el homeodominio (testigo negativo) no produjo ninguna alteración en el desarrollo del embrión, y el fenotipo observado corresponde al normal como se esperaba (Fig 9 E). Como se muestra en las Tablas I y II la expresión de Antp durante 5 y 10 min no ocasionó la aparición de denticulas ectópicas en el dorso de la cabeza, mientras que a los 15 y 20 minutos algunos embriones mostraron la presencia de denticulas ectópicas. Ninguna larva mostró transformación del segmento torácico T1 a T2 a los 5 min, sin embargo algunas presentaron la transformación a los 10 min, y a los 15 y 20 minutos de choque térmico la mayoría de las larvas mostraron la reducción o la ausencia total de la banda de denticulas T1 lo que confirma la transformación homeótica del segmento protorácico T1 a mesotorácico T2. El análisis de las cutículas embrionarias se realizó basado en el sistema de clasificación descrito por Gibson y Gehring en 1990. En este experimento se analizaron aproximadamente 30 cutículas embrionarias de cada ensayo.

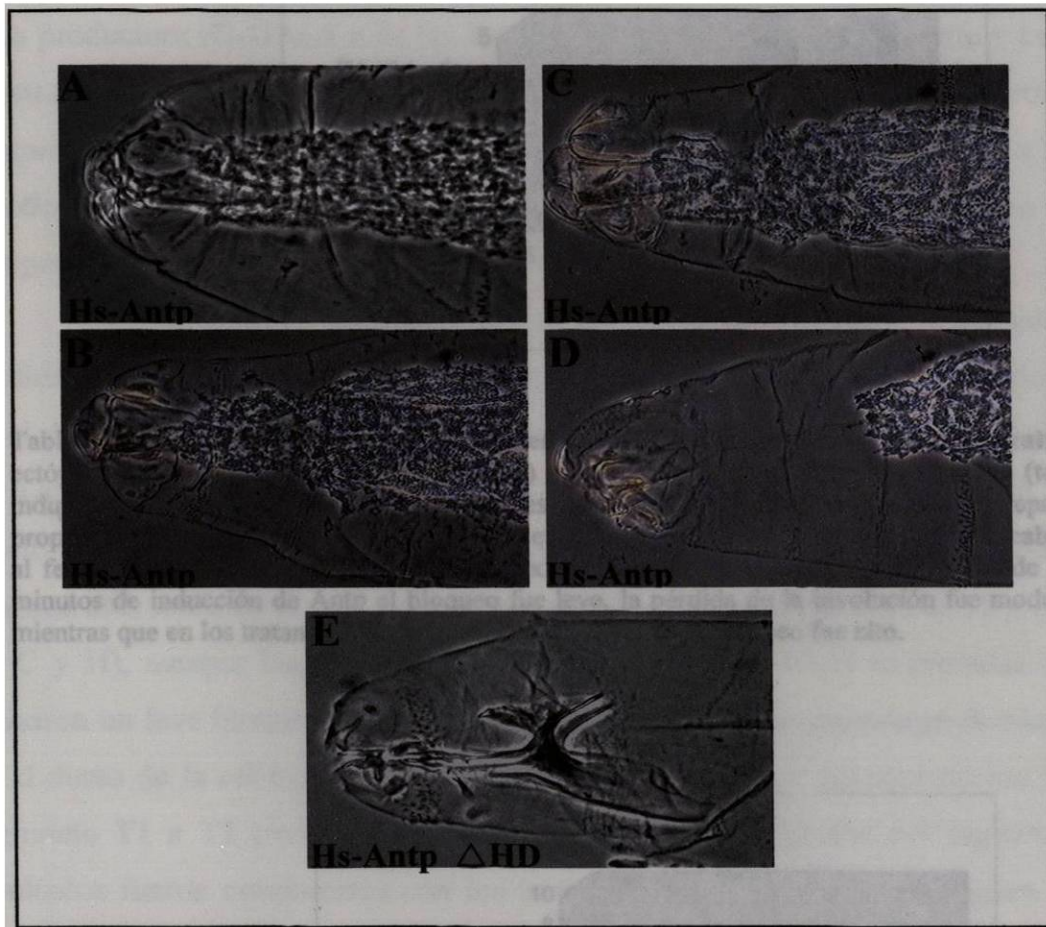


Figura 9. Pérdida de la involución de la cabeza por la expresión ectópica de Antp El bloqueo de la involución de la cabeza se incrementó gradualmente de acuerdo el tiempo de inducción de Antp por choque térmico. Los tratamientos de 5 y 10 min (A y B) produjeron una leve pérdida en la involución de la cabeza, mientras los tratamientos de 15 y 20 min mostraron el bloqueo de la cabeza de moderado a alto (C y D). Ningún efecto se observó cuando se expresó ectópicamente Antennapedia con la delección en el homeodominio (Testigo negativo) (E).

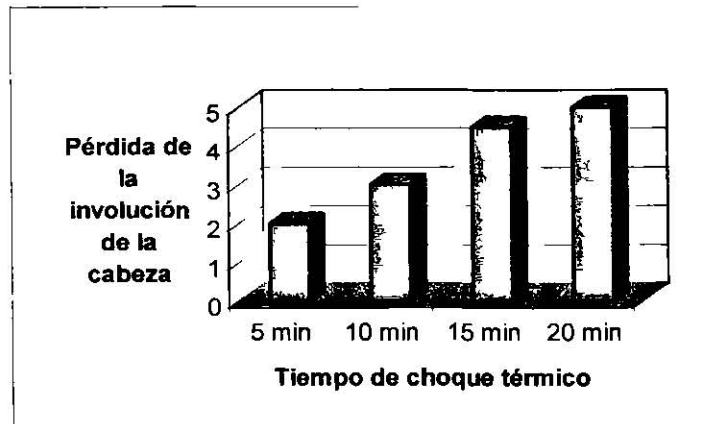


Tabla I. **Cinética de inducción de Antp en la pérdida de la involución de la cabeza.** La expresión ectópica de Antp silvestre (testigo positivo) y Antp con el homeodominio deletado (testigo negativo) se indujo en una cinética de tiempos variables de 5, 10, 15 y 20 min. La gráfica representa los valores propuestos por Gibson y Gehring 1990 para evaluar la pérdida de la involución de la cabeza; 1 corresponde al fenotipo normal mientras que 6 es el máximo nivel de bloqueo de la involución de la cabeza. A los 5 minutos de inducción de Antp el bloqueo fue leve, la pérdida de la involución fue moderada a los 10 min, mientras que en los tratamientos de 15 y 20 min el efecto de bloqueo fue alto.

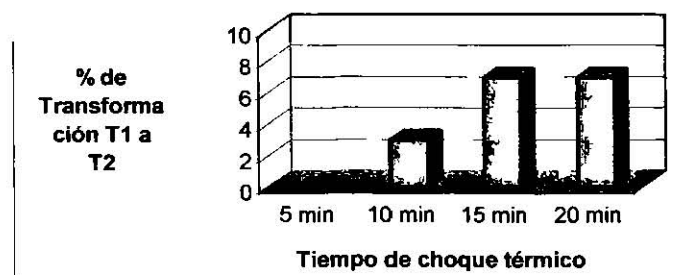


Tabla II. **Cinética de inducción de Antp en la transformación homeótica de T1 a T2.** La expresión ectópica de Antp silvestre (testigo positivo) y Antp con la delección del homeodominio (testigo negativo) se indujo en una cinética con tiempos variables de choque térmico de 5, 10, 15 y 20 min. La gráfica representa el porcentaje de embriones con transformación homeótica de T1 a T2, la pérdida de la identidad de T1 se observa por la reducción o la desaparición de la banda de dentículas de T1. La inducción por 5 minutos de Antp no es suficiente para ocasionar ningún efecto en cambio, 10 minutos presentó algunos embriones con alteración en el número de dentículas y en la inducción con 15 y 20 minutos la mayoría de los embriones mostraron reducción o ausencia de la banda de dentículas de T1.

b) Inducción ectópica de Antennapedia y sus mutantes

Una vez que estandarizamos las condiciones para la expresión ectópica de Antp procedimos a la colecta de los embriones transgénicos obtenidos de la cruce de la línea productora Hs-GAL4 y de las líneas reporteras UAS-Antp silvestre y las mutantes en el tetrapéptido YPWM (A010-3.1, A010-7, A010-11). Los embriones fueron expuestos a choques térmicos de 37° C de 15 y 20 minutos a las 6.5 h de desarrollo analizando el fenotipo de aproximadamente 30 cutículas embrionarias por línea, en tres experimentos independientes.

Los embriones en los cuales se expresó Antp silvestre ectópica mostraron una alta pérdida en la involución de la cabeza, en algunos casos la aparición de dentículas ectópicas en el dorso de la cabeza, así como la transformación del segmento T1 a T2 (Figura 10 A y F). La inducción ectópica de Antp con la delección del homeodominio no causó ningún efecto como se esperaba (Figura 10 B y G). La mutante de Antp A010-3.1 no mostró ninguna alteración en el desarrollo embrionario con los tratamientos de 15 y 20 min (Figura 10 C y H), aunque las mutantes de Antp A010-7 y A010-11 expresadas ectópicamente causaron un leve bloqueo en la involución de la cabeza, no mostraron dentículas ectópicas en el dorso de la cabeza y, en algunas larvas se presentó la transformación homeótica del segmento T1 a T2 (reducción parcial o total de las dentículas del segmento T1). Estos resultados fueron consistentes con los tratamientos de 15 y 20 min (Figura 10 D, E, I, J) como se muestra en el resumen de la Tabla III, los embriones en los cuales se expresó Antp con la mutación (A010-7 y A011-11) mostraron en algunos casos una pérdida total de la identidad torácica ya que no presentaron las tres bandas de dentículas características de los segmentos T1, T2 y T3 (ver Figura 11).

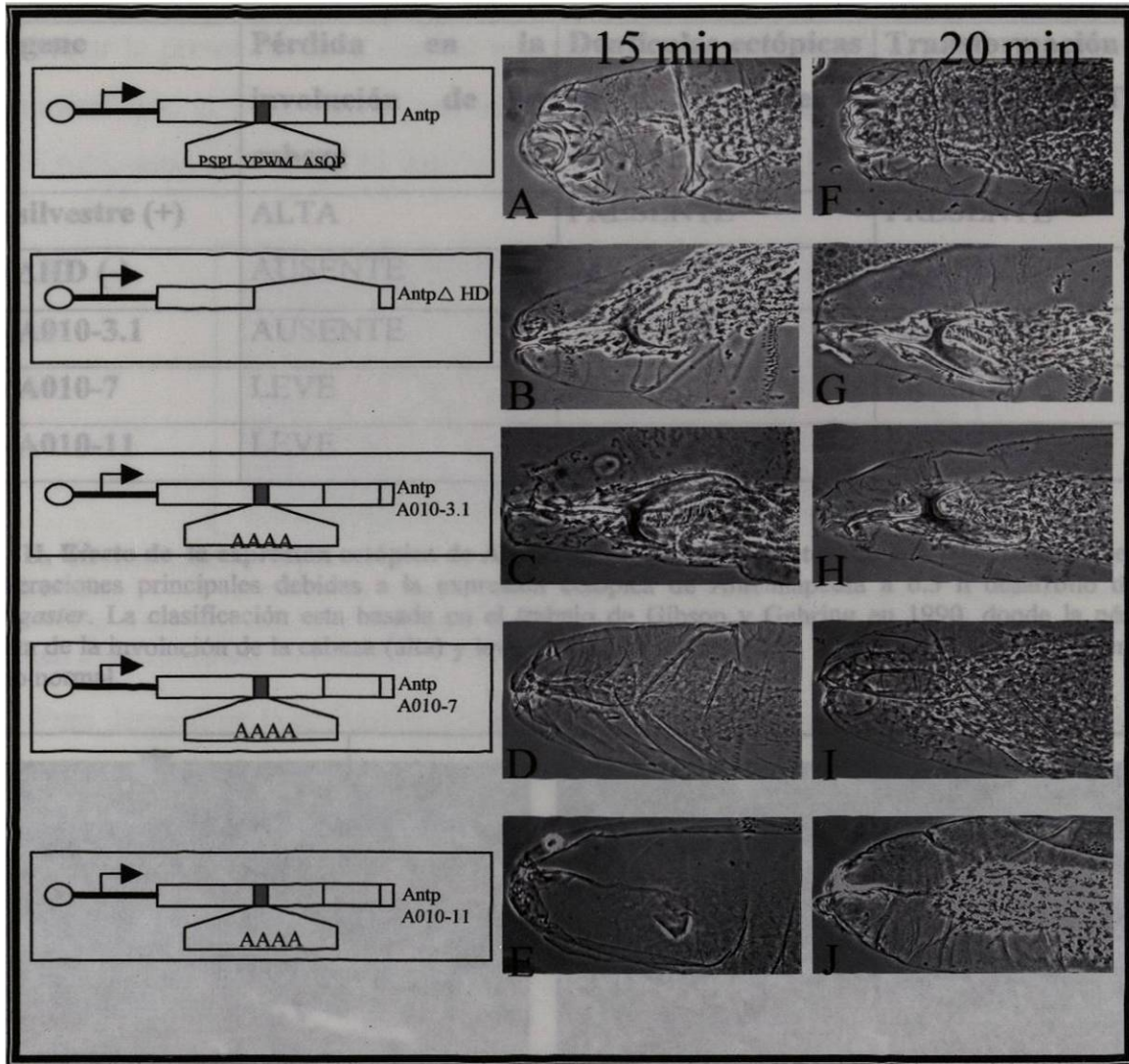


Figura 10. Representación esquemática de las mutantes de Antennapedia y su efecto en el desarrollo de *D. melanogaster*. El diagrama de la izquierda representa la estructura de la proteína Antennapedia y sus mutantes. La longitud completa de la proteína Antp y su forma truncada con la delección del homeodominio (Antp Δ HD) son los testigos positivo y negativo, respectivamente. Las tres mutantes contienen sustituciones de alanina en el tetrapéptido conservado YPWM (Antp A010- 3.1, 7 y 11). El efecto de la expresión ectópica de Antp y sus mutantes en el desarrollo con choques térmicos de 15 minutos se muestra en el centro. El testigo positivo muestra una considerable pérdida en la involución de la cabeza (A), mientras que ninguna transformación homeótica se observan en el testigo negativo (B) y en la línea transgénica Antp A010-3.1 (C). Sin embargo, las líneas Antp A010-7 (D) y Antp A010-11(E) mostraron una leve pérdida en la involución de la cabeza. El efecto de la expresión ectópica de Antp con choques térmicos de 20 min muestra que el testigo positivo mostró un incremento en la pérdida de la involución de la cabeza (F) mientras que tanto el testigo negativo y la línea transgénica A010-3.1 desarrollaron al igual que en el tratamiento de 15 min un fenotipo normal (G y H). Las líneas Antp A010-7 y A010-11 mostraron pérdida leve en la involución de la cabeza (I y J).

| Transgene | Pérdida en la involución de la cabeza | Denticulas ectópicas en el dorso de la cabeza | Transformación del segmento T1 a T2 |
|--|---------------------------------------|---|-------------------------------------|
| Antp silvestre (+) | ALTA | PRESENTE | PRESENTE |
| Antp ΔHHD (-) | AUSENTE | AUSENTE | AUSENTE |
| Antp A010-3.1 | AUSENTE | AUSENTE | AUSENTE |
| Antp A010-7 | LEVE | AUSENTE | PRESENTE |
| Antp A010-11 | LEVE | AUSENTE | PRESENTE |

Tabla III. Efecto de la expresión ectópica de Antennapedia y sus mutantes. En esta tabla se describen las tres alteraciones principales debidas a la expresión ectópica de Antennapedia a 6.5 h desarrollo de *D. melanogaster*. La clasificación esta basada en el trabajo de Gibson y Gehring en 1990, donde la pérdida completa de la involución de la cabeza (alta) y leve no alcanza a bloquearla, mientras que ausente presenta el fenotipo normal.

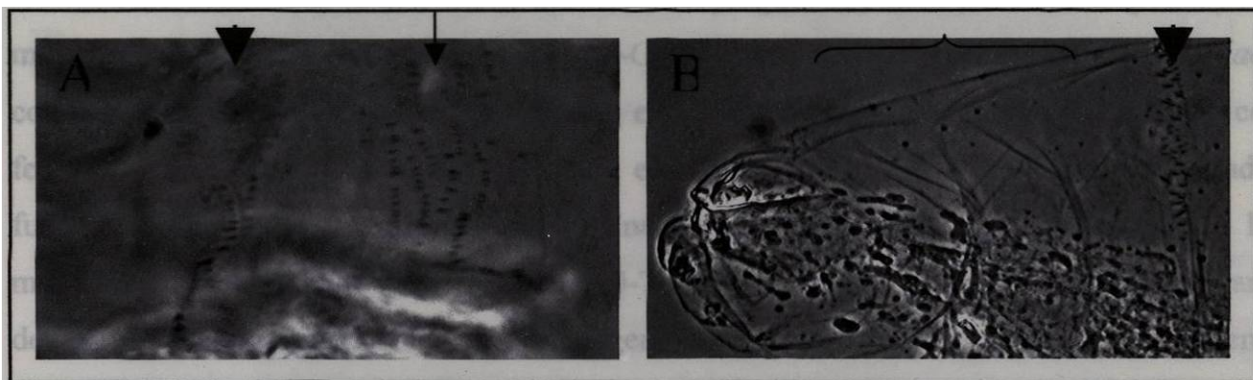


Figura 11. Expresión ectópica de Antp en los segmentos torácicos. (A) El torác de un embrión silvestre presentan la identidad del segmento T1 (punta de flecha) con un grupo de denticulas características (flecha) . (B) La expresión ectópica de Antp en las líneas A010-7 y A010-11 causó además de la transformación homeótica de T1 a T2, en algunos casos la pérdida completa de las tres regiones torácicas (corchete), las bandas de denticulas de la región abdominal no mostraron efecto (flecha) .

2 Activación del elemento *fkh[250^{con}]-lacZ* por Antennapedia y sus mutantes

Para dirigir la expresión ectópica de Antp y sus mutantes en el tetrapéptido YPWM se utilizó el potenciador específico de tejido *patched* (*ptc*). El patrón de expresión de este potenciador se determinó mediante la cruce de la línea productora *patched-GAL4* y la línea reportera *UAS-lacZ*. Los embriones de la cruce se trataron con un anticuerpo monoclonal

anti- β -gal y un segundo anticuerpo anti-ratón acoplado con el fluorocromo Alexa-Fluor para detectar la presencia de la enzima reportera β -galactosidasa (β -gal). La expresión de β -gal mostró que el potenciador *patched* (*ptc*) dirige la expresión a lo largo de todo el embrión (ubicuota) en la etapa 11 del desarrollo embrionario (Figura 12).

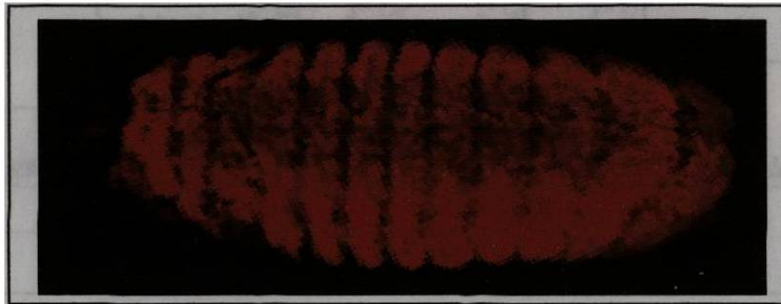


Figura 12. Determinación del patrón de expresión del potenciador *patched* en el estadio embrionario de *D. melanogaster*. Vista ventral de un embrión *patched-GAL4;UAS-lacZ* en la etapa 11 del desarrollo en el que se observa como el potenciador específico de tejido *ptc* dirige la expresión ubicuota del gen reportero *lacZ* (β -gal) a lo largo de todo el embrión.

Para determinar la activación del elemento *fkh[250^{con}]-lacZ* por Antennapedia y sus mutantes se cruzó la línea productora *ptc-GAL4* con la línea reportera *fkh[250^{con}]-lacZ* como se observa en el esquema de cruza en la Figura 13. La progenie de la cruce con fenotipo de alas rizadas normales teniendo el elemento *fkh[250^{con}]-lacZ* y el potenciador fueron seleccionadas y cruzadas con las líneas reporteras UAS: *Antp*, *Antp Δ HD* y las mutantes en el tetrapéptido A010-3.1, A010-7 y A010-11. De esta segunda cruce un cuarto de la población contenía los tres transgenes; el potenciador *ptc-GAL4*, el elemento *fkh[250^{con}]-lacZ* y *UAS-Antp*. El mecanismo de activación del elemento *fkh[250^{con}]-lacZ* con la expresión ectópica de *Antp* mediante el potenciador *ptc* se muestra en detalle en la Figura 14.

Se colectaron los embriones producto de la segunda cruce para determinar la activación del elemento *fkh[250^{con}]-lacZ* mediante una tinción inmunohistoquímica del reportero *lacZ*. Como se puede observar en la Figura 15 la determinación del patrón endógeno de *fkh[250^{con}]-lacZ* mostró la expresión del parasegmento 2 al 6, así como en el 14 y 15 (A). Cuando se dirigió *Antp* ectópicamente fue capaz de activar su expresión en la cabeza a regiones anteriores al parasegmento 2 mientras que *Antp* con la delección en el homeodominio no causó ningún efecto en la regulación de este elemento como se esperaba, ya que mostró solamente la expresión endógena (Figura 15 B y C). Por otro lado, la

expresión ectópica de las tres Antp mutantes A010-3.1, A010-7 y A010-11 no fueron capaces de activar el elemento *fkh[250^{con}]* mostrando un patrón de expresión del tipo endógeno como el observado en el testigo negativo (Figura 15 D-F). Se observaron aproximadamente 150 embriones por línea en tres experimentos independientes.

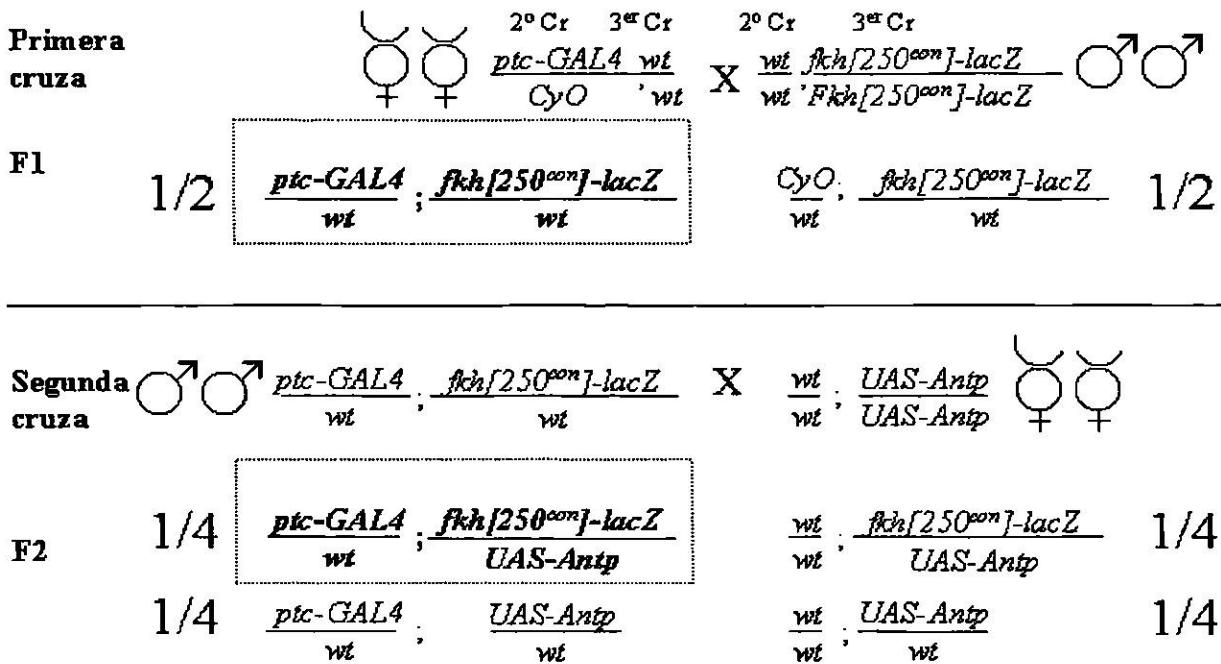


Figura 13. Esquema de las cruces para determinar el mecanismo de activación del tetrapéptido “YPWM” en el gen *fkh[250^{con}]-LacZ*. Se cruzaron hembras vírgenes de la línea productora *ptc-GAL4* con machos *fkh[250^{con}]-LacZ*. De la mitad de la progenie (F1) que contenían ambos transgenes (negritas) se seleccionaron machos que no tuvieran las alas rizadas (no *CyO*) para la segunda cruce con hembras vírgenes de cada una de las líneas de *Antp*. Un cuarto de la población (F2) mostró el genotipo requerido, con las tres construcciones integrados (negritas).

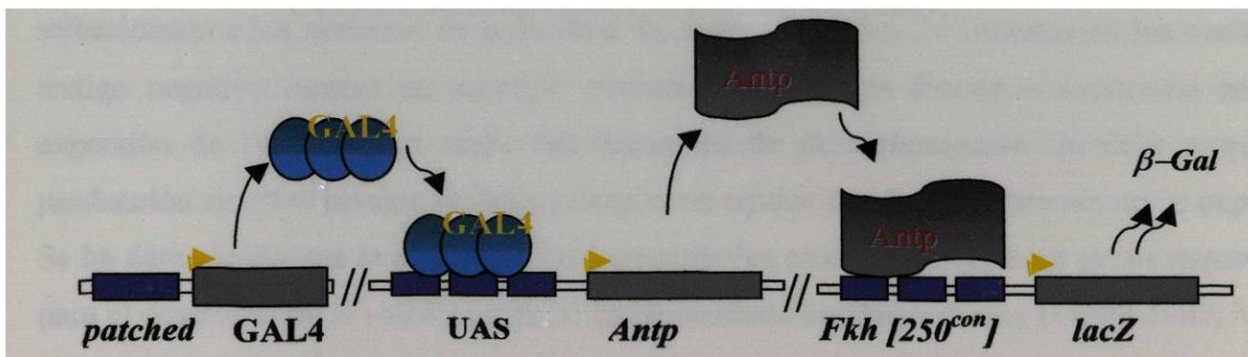


Figura 14. Activación ectópica del elemento *fkh-[250^{con}]* mediante expresión de *Antp* en el dominio *ptc*. El potenciador *patched* dirige la expresión de la proteína transactivadora de levadura GAL4, esta se une a los sitios UAS activando *Antp* ectopicamente que se une al elemento *fkh-[250^{con}]* para activar el gen reportero *lacZ* (β-gal).

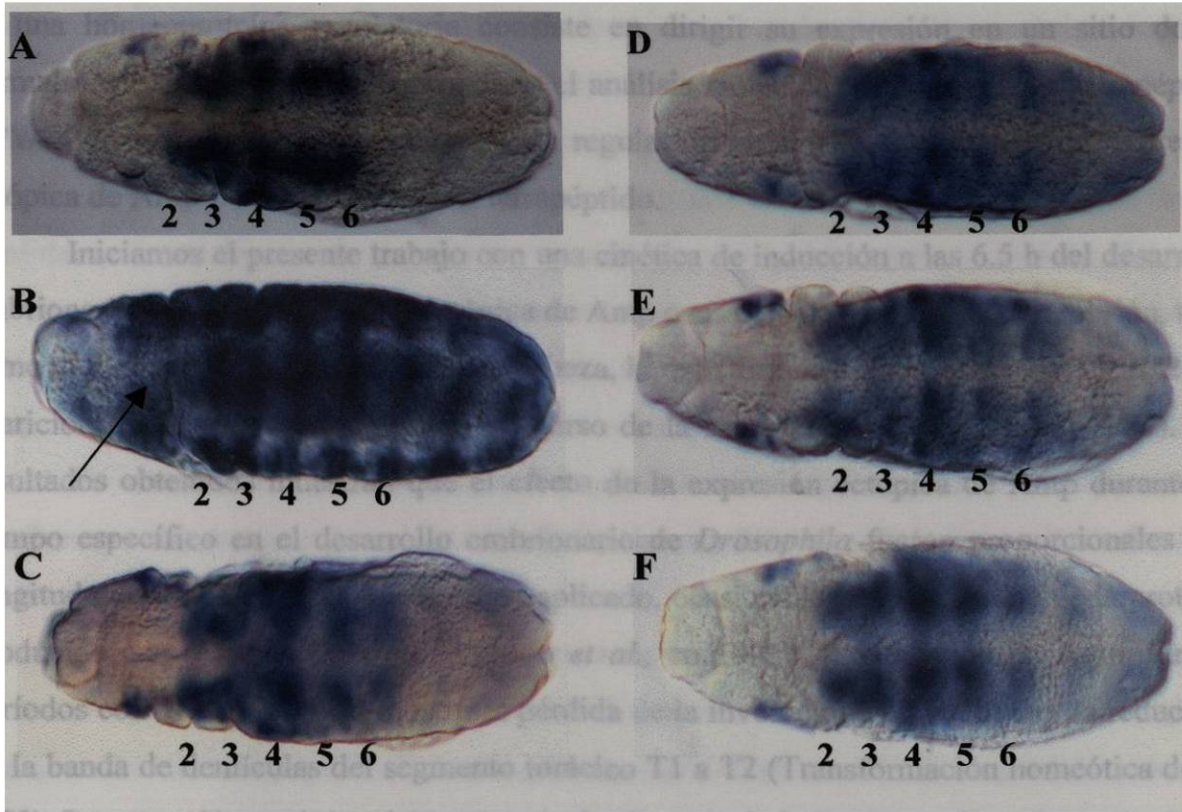


Figura 15. Efecto de la expresión ectópica de Antp y sus mutantes en el elemento *fkh[250con]-lacZ*. (A) La expresión endógena del elemento *fkh[250con]-lacZ* dirige la expresión de β -Gal del PS2 hasta el PS6, y así como los PS14 y PS15. (B) La expresión ectópica de Antp silvestre ocasiona activación ectópica de β -Gal en la cabeza (Flecha). (C) La expresión ectópica de Antp con la delección en el homeodominio no ocasiona ningun tipo de activación ectópica (D, E y F). Las mutantes de Antp con el motivo "YPWM" mutado A010-3.1, A010-7 y A010-11 no mostraron la activación de β -gal ectópicamente en la región de la cabeza.

V. Discusión y conclusiones

Una de las estrategias utilizadas en Biología del Desarrollo para conocer la función de una homeoproteína regulatoria consiste en dirigir su expresión en un sitio donde normalmente no se expresa. Para realizar el análisis molecular y funcional del tetrapéptido YPWM en Antp utilizamos el sistema de regulación GAL4-UAS dirigiendo la expresión ectópica de Antp y las mutantes en el tetrapéptido.

Iniciamos el presente trabajo con una cinética de inducción a las 6.5 h del desarrollo embrionario ya que la expresión ectópica de Antp causa efectos severos en el embrión, tales como el bloqueo de la involución de la cabeza, la transformación homeótica de T1 a T2 y la aparición de dentículas ectópicas en el dorso de la cabeza (Gibson y Gehring 1988). Los resultados obtenidos muestran que el efecto de la expresión ectópica de Antp durante un tiempo específico en el desarrollo embrionario de *Drosophila* fueron proporcionales a la longitud del período del choque térmico aplicado, ocasionado por la cantidad de la proteína producida como fue descrito por Gibson *et al.*, en 1990. La inducción de Antp durante períodos cortos (5 y 10 min) mostró la pérdida de la involución de la cabeza y la reducción de la banda de dentículas del segmento torácico T1 a T2 (Transformación homeótica de T1 a T2). La expresión ectópica de Antp usando tiempos de inducción más prolongados (15 y 20 min) ocasionaron una alta pérdida de la involución de la cabeza, la transformación del segmento T1 a T2 y la aparición de dentículas en el dorso de la cabeza. Es importante señalar que cuando dirigimos la expresión ectópica de Antp durante 25 min encontramos efectos secundarios atribuidos al choque térmico, como se observó en el testigo negativo con la delección en el homeodominio (Resultados no mostrados). Debido a lo anterior, seleccionamos los períodos de inducción de Antp entre 15 y 20 minutos en los cuales el testigo negativo mostró un fenotipo silvestre normal. Los fenotipos mostrados con la expresión de Antp en esa etapa del desarrollo de *D. melanogaster* se debe a que la producción de altos niveles de Antp ectópica en tejidos donde normalmente no se expresa. Se ha demostrado que la expresión de Antp ectópica es capaz de reprimir genes requeridos para el desarrollo de la cabeza como se ha demostrado con homothorax (Struhl 1981; Mann y Casares 2001).

Una vez estandarizadas las condiciones de la expresión ectópica de Antp procedimos a dirigir durante 15 y 20 min la expresión ectópica de Antp con el tetrapéptido

mutado usando las líneas (Antp A010-3.1, A010-7 y A010-11). Los resultados de la expresión de Antp con el tetrapéptido mutado con dos líneas (A010-7 y A010-11) mostraron que la actividad funcional de Antp se vio afectada ya que las proteínas mutadas bloquearon en menor grado la involución de la cabeza, algunas presentaron la transformación de T1 a T2 y ninguna presentó la aparición de denticulas en el dorso de la cabeza. La mutación en el tetrapéptido causó en dos líneas transgénicas; una moderada pérdida de la involución de la cabeza y la transformación del segmento torácico T1 a T2, sin presentarse el tercer efecto de la aparición de denticulas ectópicas en el dorso de la cabeza. En una tercera línea transgénica esta mutación suprimió totalmente la función de Antp ectópica al no presentar ningún efecto ya que no causó ninguna alteración en el desarrollo embrionario y su fenotipo fue idéntico al testigo negativo. Estos resultados confirman a los encontrados en la evaluación del papel funcional de las regiones flexibles Antennapedia usando el sistema de regulación Tet (Bello B. y colaboradores en 1998). Este trabajo mostró que la función de Antp es totalmente suprimida al substituir por alanina el motivo YPWM y no afectó su actividad funcional cuando se mutaron las regiones flanqueantes del tetrapéptido (Resendéz-Pérez *et al.*, en preparación). La pérdida parcial de la función de Antp en dos de las líneas usadas podría ser debida a que el sistema UAS-GAL4 probablemente es más potente para la sobre-expresión de estas homeoproteínas.

En algunos de los embriones que mostraron la transformación homeótica se observó la pérdida de los cinturones de denticulas que delimitan la posición de los segmentos torácicos T1, T2 y T3. Estos resultados no descritos presentan una pérdida de función que podría deberse a que la mutación en el tetrapéptido YPWM no permitió activar y/o reprimir genes implicados en la identidad torácica compitiendo probablemente con la homeoproteína Antp endógena. Estas evidencias deberán ser confirmadas ya que Gibson y Gehring en 1988 señalan que sólo las estructuras anteriores al dominio normal de expresión son afectadas en la sobreexpresión ectópica de Antp.

La pérdida de la función total y parcial de la proteína ectópica de Antp es debida a que la mutación en el motivo YPWM eliminó la interacción con su posible(s) cofactor ya que como se ha descrito previamente en estudios *in vitro* en otras homeoproteínas la interacción con los cofactores Exd y PBX1 es mediada a través del tetrapéptido YPWM en Ubx y HoxB1 respectivamente (Phelan *et al.*, 1995 y Passner *et al.*, 1999). Otros ensayos *in*

in vitro han mostrado que el motivo YPWM es una región clave para mediar las interacciones con el cofactor PBX, ya que mutaciones en los residuos “WM” por Alanina fueron suficientes para prevenir la formación de un complejo de cooperación HOX-PBX (Shanmugam *et al.*, 1997). La mutación en el tetrapéptido YPWM eliminó total o parcialmente la función activadora/represora de Antp expresada ectópicamente probablemente por la falta de interacción con algún cofactor específico en esa etapa del desarrollo. Esta falta de función de Antp podría ser diferente en otra etapa del desarrollo ya que se ha descrito que la interacción normal entre las homeoproteínas y los cofactores permite cambiar la función de las homeoproteínas de represoras a activadoras (Biggin y McGinnis, 1997).

Con el objeto de determinar cual podría ser la función del tetrapéptido YPWM en Antp para la activación de genes blanco de Antp determinamos el mecanismo de activación en el elemento *fkh[250^{con}]* (Ryoo *et al.*, 1999). Para ello dirigimos la expresión ectópica de Antp y las mutantes en el tetrapéptido mediante el potenciador específico de tejido patched (*ptc*). Debido a que Ryoo y colaboradores en 1999 utilizaron este potenciador para dirigir la expresión ectópica de Antp determinamos el patrón de expresión específico de este potenciador a las 6 h 50 min del desarrollo período de tiempo necesario para la activación del elemento *fkh[250^{con}]*. Los resultados obtenidos mostraron que el dominio de expresión de *ptc* en ese tiempo del desarrollo es ubicuoto a lo largo todo el embrión de *Drosophila* como se esperaba. Cuando dirigimos la expresión ectópica de Antp silvestre con este potenciador *ptc* el elemento *fkh[250^{con}]* se activaron en las regiones anteriores al dominio endógeno como se esperaba (Ryoo *et al.*, 1999).

Antp con la delección en el homeodominio fue incapaz de activar este elemento (testigo negativo) y las mutantes A010-3.1, A010-7 y A010-11 presentaron el patrón endógeno por lo que no fueron capaces de activar al elemento *fkh[250^{con}]*. Experimentos *in vitro* han demostrado que Antp puede cooperar con Exd para regular al elemento *fkh[250^{con}]*. El elemento *fkh[250^{con}]* de 37 pb no es un sitio natural de activación por Antp, este se deriva de una porción del potenciador *fkh* que contiene las secuencias de unión para ser activado por Sex comb reduced (*Scr*) en combinación con Exd. La mutación de los sitios de unión para *Scr* por otros sitios consenso permitió que *fkh[250^{con}]* pudiera ser activado por Antp ectópicamente. Los resultados de Ryoo y colaboradores muestran que la

activación del elemento *fkh[250^{con}]* por Antp requiere la presencia del cofactor Exd. Este ha mostrado formar un heterodímero con la homeoproteína Ubx, siendo indispensable para esta interacción el motivo YPWM de Ubx (Passner *et al.*, 1999). Lo mismo sucede en mamíferos en los que la homeoproteína HOXB1 forma un heterodímero con el cofactor PBX1 (el ortólogo de Exd) mediado por la interacción con el hexapéptido –Y/F-P-W-M/R de HoxB1 (Pipper *et al.*, 1999). Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la activación del elemento *fkh[250^{con}]* por las expresión de Antp ectópica requiere el tetrapéptido YPWM y sugieren que esta falta de activación en las mutantes en el tetrapéptido de Antp podría estar mediada por la cooperación con el cofactor Exd siendo necesario el motivo YPWM en esta interacción Antp/Exd como se muestra en el modelo propuesto de la Figura 16.

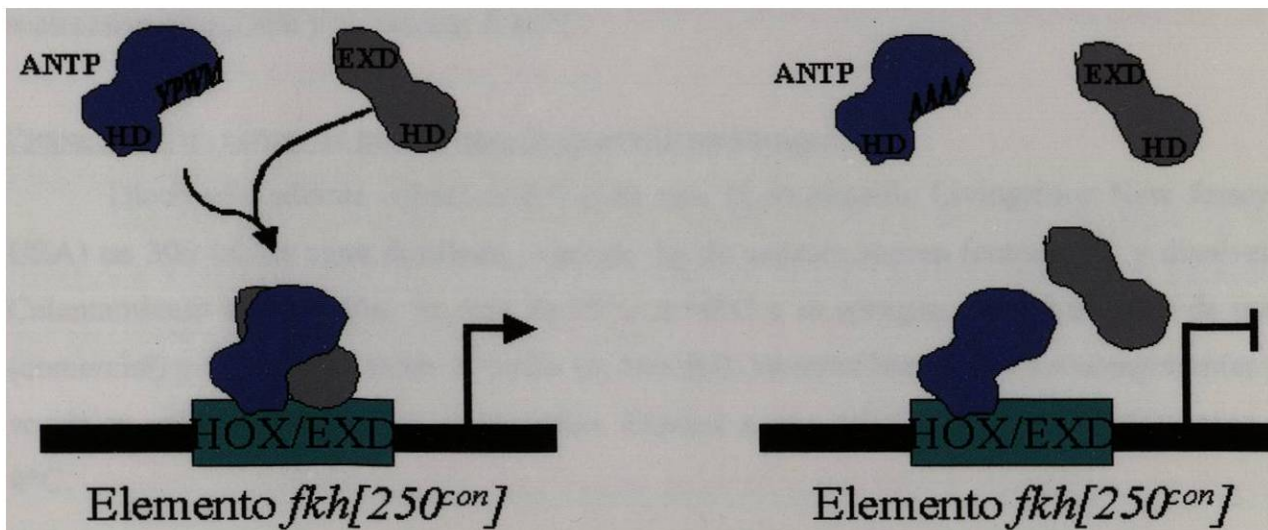


Figura 16. Modelo propuesto para la activación del elemento *fkh[250^{con}]* por Antp. (A) Para la activación del elemento *fkh[250^{con}]* se requiere de la formación de un heterodímero formado por la homeoproteína Hox (Antp) y el cofactor Exd. Ambas homeoproteínas reconocen sitios de unión en el DNA a través de su respectivo homeodominio (HD). (B) La interacción entre estas dos homeoproteínas puede estar mediada por el tetrapéptido YPWM ya que las mutantes con las substitución del motivo YPWM por AAAA alanina fueron incapaces de activar este elemento.

- La expresión ectópica de Antp mutante en el tetrapéptido YPWM usando el sistema de regulación GAL4-UAS confirma que el tetrapéptido YPWM es necesario para la función de la homeoproteína Antp debido a que suprimió parcial ó totalmente la actividad funcional de Antp expresada ectópicamente en *Drosophila*.

- El análisis molecular del tetrapéptido YPWM de Antp en la regulación del elemento *fkh[250^{con}]* mostró que este motivo es indispensable para la activación ectópica del elemento *fkh[250^{con}]*. Estos resultados permitieron proponer un modelo en que el tetrapéptido YPWM es necesario para la interacción de Antp con el cofactor Exd en la activación del elemento *fkh[250^{con}]*.
- Los resultados obtenidos en este trabajo permitirán el análisis molecular del tetrapéptido YPWM de Antp en la regulación de otros genes blanco de Antp como *teashirt* y *apterous* para confirmar el papel funcional del motivo YPWM en Antp *in vivo* en *D. melanogaster*.

V. Apéndice

Preparación de comida estándar para *Drosophila melanogaster*.

En un litro de agua destilada disolver 100 g de levadura (Imexa, Cuautitlán Izcalli Edo. de México, México) por 10 min mediante agitación. Añadir 13.75 g de agar (Labscientific Livingstone New Jersey, USA) y esperar a que se disuelva por aproximadamente 10 min mediante agitación. Agregar 100 g de azúcar morena (comercial) y esperar a que se disuelva por aproximadamente 10 min en agitación. Añadir 50 g de harina de maíz (Maseca Guadalupe Nuevo León, México) y disolver por 10 min. Calentar a ebullición durante 15 min, esperar a que la temperatura baje entre 55 y 60°C y disolver 10 g de propionato de sodio (Comercial) en agitación por 10 min. Servir el alimento en viales ó frascos y esperar a que solidifique por 45 min. Espolvorear sobre la superficie levadura seca activa granulada y almacenar a 18°C.

Preparación de placas de puesta para *Drosophila melanogaster*.

Disolver mediante agitación 8.5 g de agar (Labscientific Livingstone New Jersey, USA) en 300 ml de agua destilada. Agregar 5g de azúcar morena (comercial) y disolver. Calentamiento a ebullición. Se deja de 55°C a 60°C y se agregan 100 ml de jugo de uva (comercial) y 4g de propionato de sodio (comercial). Mezclar bien todos los componentes y servir en cajas petri de plástico pequeñas. Esperar a que solidifique, tapar y almacenar a 4°C.

NaCl al 0.4% y Tritón X-100 al 0.1%

Pesar 0.4 g de NaCl en 800 ml de agua destilada, agregar 100 µl de Tritón X-100 y aforar a 1000 ml con agua destilada.

Buffer PIPES pH 6.9 0.1 M

Pesar EGTA 2mM 0.4683 g y MgSO₄7H₂O 1mM 0.2464 g en 90 ml de agua destilada ajustar el pH 6.9 con HCl concentrado.

Buffer de Fosfatos Salino (PBS (10X))

Pesar, disolver, aforar en un litro de agua destilada y esterilizar mediante autoclave

| | |
|----------------------------------|---------|
| NaCl | 200.0 g |
| KCl | 5.0 g |
| KH ₂ PO ₄ | 5.0 g |
| Na ₂ HPO ₄ | 27.8 g |

PBS + Tritón X-100 0.1% (PBT 0.1%)

Disolver por agitación 50 µl de PBT X-100 en 40 ml de PBS y aforar a 50 ml con PBS.

PBT 0.1% + Albúmina Sérica Bovina 1%

Disolver por agitación 500µl de PBT X-100 en 40 ml de PBS. Agregar 0.5g de Albúmina Sérica Bovina (BSA) y disolver. Aforar a 50 ml con PBS y filtrar la solución con una membrana de nitrocelulosa de 0.45µm.

PBT 0.1% + Albúmina Sérica Bovina 10%

Disolver por agitación 50 µl de PBT X-100 en 40 ml de PBS. Agregar 5g de Albúmina Sérica Bovina (BSA) y disolver. Aforar a 50 mL con PBS y filtrar la solución con una membrana de nitrocelulosa de 0.45µm.

PBS + Tween 20 0.05%

Disolver por agitación 25 µl de Tween 20 en 45 ml de PBS 1 X y aforar a 50 ml con PBS.

Medio para montaje Bálsamo de Canada.

Disolver mediante agitación durante toda la noche 10ml de metilsalicilato en 40 ml de Bálsamo de Canada.

Solución de montaje de Hoyer.

Añadir 30 g de goma arábica (Merck, Glattbrug Suiza) en 50 ml de agua destilada, agitar por toda la noche hasta que este completamente disuelta. Agregar mediante agitación 200 g de hidrato de cloral (Sigma-Aldrich, St Louis Missouri, USA) en pequeñas

cantidades. Agregar 20 g de glicerol y centrifugar la mezcla hasta que no presente turbidez (3 h o toda la noche a 12 000 g).

VI. Bibliografía

Andrew, D.J. (1998). Regulation and formation of the *Drosophila* salivary glands. *Ann. N.Y. Acad. Sci* **15**:55-69.

Bello B, Resendez-Perez D y Gehring W.J. (1998) Spatial and temporal targeting of gene expresión in *Drosophila* by means of tetracycline-dependent transactivador system. *Development* **125**:2193-2201.

Bender W., Spierer P., y Hogness D.S. (1983) Chromosomal walking and jumping to isolate DNA from the *Ace* and *rosy* loci and the *bithorax* complex in *Drosophila melanogaster*. *J Mol Biol.* **168**:17-33.



Brand A.H. y Perrimon N. (1993) Targeted expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**:401-415.

Capovilla M., Kambris Z. y Botas J. (2001) Direct regulation of the muscle-identity gene *apterus* by a Hox protein in the somatic mesoderm. *Development* **128**:1221-1230.

Casares. F. y Mann. R.S. (1998) Control of antennal versus leg development in *Drosophila*. *Nature* **392**:723-726.

Casares, F. y Mann. R.S. (2001) The ground state of the ventral appendage in *Drosophila*. *Science* **293**:1477-80.

Duboule D. (1994) Guidebook to the Homeobox Gene. Oxford University Press. England. Pages (3-23).

Duboule D. y Dollé P. (1989) The structural and functional organization of the murine HOX gene family resembles that of *Drosophila* homeótica gene. *EMBO J.* **8**, 1497-1505.

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

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 widely spaced zinc fingers motifs. *Cell* **64**: 63-79.

Featherstone M.S., Baron A., Gaunt S.J., Mattei M.G. y Duboule D. (1988) Hox-5.1 defines a homeobox-containing gene locus on mouse chromosome 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **85**:4760-4.

Furukubo-Tokunaga K., Flister S. y Gehring W.J. (1993) Functional specificity of the Antennapedia homeodomain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**:6360-4.

Garber R.L., Kuroiwa A. y Gehring W.J. (1983) Genomic and cDNA clones of the homeotic locus *Antennapedia* in *Drosophila*. *EMBO J.* **2**:2027-36.

Gehring W.J., Affolter M. y Burglin T. Homeodomain proteins. (1994) *Annu. Rev. Biochem.* **63**:487-526.

Gehring W.J., Qian Y.Q., Billeter M., Furukubo-Tokunaga K., Schier AF., Reséndez-Pérez D., Affolter M., Otting G. y Wuthrich K. (1994) Homeodomain-DNA recognition. *Cell.* **78**:211-23.

Gehring, W.J. (1987) Homeoboxes in the study of development. *Science* **236**: 1245-1252.

Gibson, G. y Gehring, W.J. (1988) Head and thoracic transformation caused by ectopic expression of *Antennapedia* during *Drosophila* development. *Development* **102**: 657-675.

Johnson B., Parker E. y Krasnow 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. USA* **92**:739-743.

Kalions, P.S. y O'Farrell, P.H. (1993). A universal target sequence is bound *in vitro* by diverse homeodomains. *Mech Dev* **43**: 57-70.

Kuo Y.M., Jones N., Zhon B., Pazner S., Larson V. y Beckendorf S.K. (1996) Salivary duct determination in *Drosophila*: Roles of the EGF receptor signaling pathway and the transcription forkhead and tracheless. *Development* **122**:1909-1917.

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

Ma J., Przibilla E., Hu J., Bogorad L., y Ptashne M. (1988) Yeast activators stimulate plant gene expression. *Nature* **334**:631-633.

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

Mann R.S. y Chan S.K. (1996) Related Articles Extra specificity from extradenticle: the partnership between HOX and PBX/EXD homeodomain proteins. *Trends. Genet.* **12**:258-62.

McGinnis W., Levine M., Hafen E. Kuroiwa A. y Gehring, W.J. (1984) A conserved DNA sequence in homeotic genes of the *Drosophila Antennapedia* and *Bithorax* complexes. *Nature* **308**: 428-433.

McCormick A., Core N., Kerridge S. y Scott M.P. (1995) Homeotic response elements are tightly linked to tissue-specific elements in a transcriptional enhancer of the teashirt gene. *Development.* **121**:2799-812.

Ornitz D.M., Moreadith R.W. y Leder P. (1991) Binary system for regulating transgene expression in mice targeting *int-2* gene expression with yeast GAL4/UAS control elements. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**: 698-702.

Otting G., Qian Y.Q., Billeter M., Muller M., Affolter M., Gehring W.J. y 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**:3085-92.

Qian Y.Q., Resendez-Perez D., Gehring W.J. y 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**,4091-5.

Qian Y.Q., Otting G., Furukubo-Tokunaga K., Affolter M., Gehring W.J. y 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**,10738-42.

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

Panzer S., Weigel D. y Beckendorf S.K. (1992) Organogenesis in *Drosophila melanogaster*: Embryonic salivary gland determination is controlled by homeotic and dorsoventral patterning genes. *Development* **114**:49-57.

Phelan M. L., Rambaldi I. y Featherstone M.S. (1995) Cooperative interactions between HOX and PBX proteins mediated by a conserved peptide motif. *Molecular and Cellular Biology* **15**:3989-3997

Prince, Frédéric. (1998) Identification of cofactor that interact specifically with the YPWM-motif in the homeotic gene *Antennapedia* of *Drosophila melanogaster*. Diploma Thesis. Biozentrum, Universidad de Basilea, Basilea, Suiza.

Ramos Patricia Coordinadora. Manual de laboratorio de Genética para *Drosophila melanogaster*. (1993). McGrawHill. México. Páginas (3-30).

Roberts D. *Drosophila*, a practical approach. (1998). Oxford University Press. Second Edition. Great Britain.

Ryoo H.D. y Mann R.S. (1999) The control of trunk Hox specificity and activity by Extradenticle. *Genes Dev.* **13**:1704-16.

Shanmugam K., Featherstone M.S. y Saragovi H. U. (1997) Residues flanking the HOX YPWM motif contribute to cooperative interactions with PBX. *The journal of Biological Chemistry* **272**:19081-19087.

Scheer N. y Campos-Ortega J.A. (1999). Use of the GAL4-UAS technique for targeted gene expression in the zebrafish. *Mech. Dev.* **80**:153-158.

Shneuwly S., Kuroiwa A. y Gehring W.J (1987) redesigning the body plan of *Drosophila* by ectopic expression of the homeotic gene *Antennapedia*. *Nature.* **325**, 816-818.

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

Sullivan W., Ashburner M. y Scott R. (2000) *Drosophila* Protocols. Cold Spring Harbor Laboratory Pres., N.Y.

Wakimoto B.T. y Kaufman T.C. (1981). Analysis of larval segmentation in lethal genotypes associated with the *antennapedia* gene complex in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* **81**:51-64.

Zeng W., Andrew D.J., Mathies L.D., Horner M.A. y Scott M.P. (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.

新刊
新刊