

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**EFFECTO DEL MOTIVO WRPW EN LA ACTIVIDAD FUNCIONAL DE  
ANTENNAPEPIA EN *Drosophila melanogaster***

**Por**

**OLGA KARINA VILLANUEVA SEGURA**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA**

**Julio, 2007**

**EFFECTO DEL MOTIVO WRPW EN LA ACTIVIDAD FUNCIONAL  
DE ANTENNAPEDIA EN *Drosophila melanogaster***

**Comité de Tesis**

---

**Dra. Diana Reséndez Pérez**  
**Director**

---

**Dr. Mario Rodolfo Morales Vallarta**  
**Secretario**

---

**Dr. Jorge Armando Verduzco Martínez**  
**Vocal**

A la persona que es responsable de  
que este viviendo este momento y  
me ha apoyado a pesar de todo:  
Mi madre, Olga Segura

A mi padre Oscar Villanueva  
con respeto

A la “casa” de locos (mis hermanitos)  
Katy, Gladys, Rolando, Oscar  
los quiero mucho

A la lucecita de nuestros ojos  
Nahomi



## TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS.....	i
LISTA DE TABLAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
NOMENCLATURA.....	vi
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. HIPÓTESIS.....	4
4. OBJETIVOS.....	5
4.1. Objetivo General.....	5
4.2. Objetivos Específicos.....	5
5. ANTECEDENTES.....	6
5.1. <i>Drosophila melanogaster</i> .....	6
5.1.1. Ciclo de vida.....	6
5.1.2. Etapa Embrionaria.....	8
5.1.3. Jerarquía genética que permite la identidad segmental en los embriones de <i>D. melanogaster</i> .....	8
5.1.4. Parasegmentos.....	10
5.1.5. Cutículas embrionarias.....	10
5.2. Mutaciones homeóticas.....	10
5.3. Descubrimiento del homeobox.....	11
5.4. Genes homeóticos en vertebrados.....	12
5.5. Antennapedia.....	13
5.5.1. Estructura del gen <i>Antennapedia</i> .....	14
5.5.2. Estructura tridimensional del homeodominio de Antp.....	15
5.6. Genes blanco de Antennapedia.....	15



5.6.1. <i>Teashirt</i> .....	16
5.7. Tetrapéptido YPWM.....	17
5.7.1 YPWM en Antennapedia.....	18
5.7.2 Interacción proteína-proteína a través del tetrapéptido YPWM.....	19
5.7.2.1. En <i>D. melanogaster</i> .....	19
5.7.2.2. En vertebrados.....	20
5.8. El motivo WRPW.....	21
5.8.1. Interacción proteína-proteína a través del motivo WRPW.....	22
5.9. Modelo de Activación-Represión en las proteínas homeóticas.....	22
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
6.1. Obtención de los DNA's plasmídicos pUAST, pUASAntp y Helper 2-3 wc.....	25
6.1.1. Preparación de bacterias Ca <sup>++</sup> competentes.....	25
6.1.2. Transformación de los DNA's plasmídicos.....	25
6.1.3. Obtención de los DNA's plasmídicos mediante minipreparación.....	26
6.1.4. Caracterización de los DNA's plasmídicos con enzimas de restricción diagnósticas.....	26
6.2. Construcción de los plásmidos recombinantes pUAST <sup>YPWM</sup> Antp <sup>WRPW</sup> y pUAST <sup>AAAA</sup> Antp <sup>WRPW</sup> .....	27
6.2.1. Purificación de los fragmentos YPWM Antp <sup>WRPW</sup> , AAAA Antp <sup>WRPW</sup> y pUAST.....	27
6.2.2. Ligaciones vector-inserto.....	28
6.2.3. Caracterización de los plásmidos recombinantes con enzimas de restricción.....	28
6.3. Generación de las moscas transgénicas con los plásmidos recombinantes.....	29
6.3.1. Purificación de los DNA's recombinantes usando columnas de Qiagen.....	29
6.3.2. Microinyección de los plásmidos recombinantes en embriones de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	29
6.4. Inducción ectópica de Antennapedia y sus mutantes mediante choque térmico.....	30
6.4.1 Mantenimiento y amplificación de las moscas transgénicas.....	30
6.4.2 Sexado y realización de las cruzas.....	31
6.4.3 Colecta de embriones de <i>D. melanogaster</i> .....	32
6.4.4 Preparación de las cutículas embrionarias.....	33
6.5. Activación del gen blanco <i>tsh</i> por Antp y sus mutantes.....	33



6.5.1.	Colecta y fijación de embriones de <i>D. melanogaster</i> .....	33
6.5.2.	Detección de las proteínas Antp y Tsh en embriones de <i>D. melanogaster</i> .....	34
7.	RESULTADOS.....	36
7.1.	Caracterización de los plásmidos pUAST, pUASAntp y Helper 2-3 wc.....	36
7.2.	Construcción de los plásmidos recombinantes pUAST <sup>YPWM</sup> Antp <sup>WRPW</sup> y pUAST <sup>AAAA</sup> Antp <sup>WRPW</sup> .....	36
7.3.	Caracterización de los plásmidos recombinantes pUAST <sup>YPWM</sup> Antp <sup>WRPW</sup> y pUAST <sup>AAAA</sup> Antp <sup>WRPW</sup> .....	37
7.4.	Generación de las moscas transgénicas con los plásmidos recombinantes.....	39
7.4.1.	Purificación de los DNA's recombinantes por columnas de Qiagen.....	39
7.4.2.	Microinyección de los plásmidos recombinantes en <i>D. melanogaster</i> .....	39
7.5.	Expresión ectópica de Antp fusionada a WRPW.....	41
7.6.	Activación del gen blanco <i>teashirt</i> por Antp.....	42
7.6.1.	Expresión endógena y ectópica de Antp inducida por el potenciador <i>patched</i> .....	42
7.6.2.	Activación de <i>tsh</i> con las mutantes <sup>YPWM</sup> Antp <sup>WRPW</sup> y <sup>AAAA</sup> Antp <sup>WRPW</sup> .....	45
8.	DISCUSIÓN.....	48
9.	CONCLUSIONES.....	53
10.	APÉNDICE.....	54
10.1.	Preparación de soluciones.....	54
10.2.	Lista de reactivos.....	56
	LITERATURA CITADA.....	58



## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la Dra. Diana Reséndez por ser el asesor de esta tesis, por el apoyo para la realización del proyecto, los consejos para cada experimento, y principalmente la paciencia mostrada a largo de estos casi cinco años de permanencia en su laboratorio como estudiante.

Agradezco al Dr. Mario Morales por permitirme trabajar en su laboratorio durante los fines de semana y utilizar su microscopio para las observaciones de las muestras; así como los consejos para la realización de la presente tesis.

Al Dr. Jorge Verduzco le agradezco ser parte de la comisión de tesis y por las observaciones que contribuyeron en este trabajo.

A CONACYT le agradezco por el apoyo económico para la realización de la tesis de Maestría.

A Steve Cohen por la donación al laboratorio del anticuerpo  $\alpha$ -Tsh.

Al ahora M.C. Ricardo Canales, agradezco que hayas sido mi guía muchas veces durante los experimentos, por escucharme en momentos de crisis, por tu plática de la medianoche cuando había que trabajar y por enseñarme a usar la cámara de manera idónea.

A Diana Cárdenas, que hace poco es M.C., te agradezco los dos consejos en el momento justo y exacto (pienso que se alinearon los planetas ¿?) que permitieron seguir el curso natural de los experimentos.

A mi compañerita de viaje en la Maestría, Ixchelt Cuaranta, te agradezco el apoyo moral y médico durante este tiempo, por la alimentación de “algunas” semanas, por darme asilo político y por el baile árabe. También le agradezco a Gerardo Alvarado (esposo de Ixchelt) que proporcionara por un tiempo (2 meses o más...) la bolsa de dormir que me resguardo del frío durante los experimentos nocturnos (pienso que es colchoneta).

A Melisa Gómez y Arturo Machuca les agradezco el apoyo, las pláticas ociosas, los momentos divertidos, la paciencia, los sábados de cine, por acompañarme en la madrugada que tuve que trabajar (fueron más veces por parte de Melisa la verdad!!) y por la amistad que me brindaron durante este tiempo.

Al resto de los integrantes del Laboratorio 8 (alias UBD): Maribel por orientarme en los cálculos de preparación de soluciones y las idas al cine en los momentos de “libertad”; Fermín por los consejos al preparar los seminarios (¿5 puntos pueden ser la diferencia??); Jeannie por escucharme y rezar por mi, Nancy por escucharme en



cualquier momento y ayudarme en los asuntos monetarios; Claudio por las orientaciones al realizar métodos relativamente nuevos, por las diversas “cenas que degeneran a fiestas y que siguen evolucionando....” y por los panecitos!!!!; Paco, el super técnico, por preparar las diversas comidas de las moscas, por ayudarme en las colectas, por los desayunos después de largas horas de trabajo experimental y también por escucharme; Delia por ser amiguita y apoyarme siempre; Citlali, la casi nueva, por apoyarme en los momentos buenos y malos; Alejandra por enseñarme cosas diferentes de la vida, Yenny por su plática del cine alterna; Alejandro y Carlos por las pláticas en los tiempos libres de los fines de semana.

A M.C. María Porfiria Barrón por su plática durante las largas sesiones de observación de muestras generalmente en las tardes y los fines de semana y por estar siempre dispuesta a ayudarme.

A Anadulce (muñeca!!) por esos momentos de plática tan divertidos.

Agradezco también a los ex-integrantes del L8 que me apoyaron al inicio de este proyecto, José Wendy y Argentina.

A los amiguitos externos Roberto y Nydia les agradezco su amistad.



## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I.	Embriones de <i>Drosophila melanogaster</i> en las diferentes etapas del desarrollo.....	7
II.	Condiciones de digestión con las enzimas <i>HindIII</i> y <i>SalI</i> .....	27
III.	Componentes de la digestión preparativa con la enzima <i>NotI</i> .....	27
IV.	Condiciones de ligación para la construcción de los plásmidos recombinantes.....	28
V.	Condiciones de reacción para las enzimas de restricción <i>BamHI</i> , <i>EcoRI</i> y <i>SmaI</i> .....	28
VI.	DNA's purificados en columnas de Qiagen.....	40
VII.	Líneas transgénicas de <i>D. melanogaster</i> obtenidas mediante microinyección.....	40
VIII.	Efecto de la expresión ectópica de <i>Antp</i> y sus mutantes en las líneas transgénicas de <i>D. melanogaster</i> .....	44



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	6
2. Jerarquía genética que permite la identidad en los embriones de <i>D. melanogaster</i> .....	8
3. Relación de segmentos y parasegmentos (ps) en <i>D. melanogaster</i> .....	9
4. Cutícula embrionaria de <i>D. melanogaster</i> .....	10
5. Transformaciones homeóticas en <i>D. melanogaster</i> .....	11
6. Expresión de los complejos génicos Antennapedia y Bithorax en <i>D. melanogaster</i> .....	11
7. Organización de los genes homeóticos en <i>D. melanogaster</i> y el humano.....	12
8. Pérdida de la involución de la cabeza causada por la inducción ectópica de la homeoproteína Antp.....	13
9. Estructura del gen de <i>Antp</i> .....	14
10. Estructura tridimensional del complejo Antp-DNA.....	15
11. La expresión de Tsh requiere a la homeoproteína Antp <i>in vivo</i> .....	16
12. Alineamiento y comparación aminoacídica de homeoproteínas en <i>D. melanogaster</i> .....	17
13. Representación esquemática de las mutantes de Antennapedia y su efecto en el desarrollo embrionario.....	19
14. Interacción de los homeodominios de Ultrabithorax (Ubx) y Extradenticle (Exd) con el DNA.....	20



15.	Expresión ectópica de Ultrabithorax-VP16.....	23
16.	Obtención y caracterización de los plásmidos pUAST, pUASAntp y Helper 2-3 wc con enzimas de restricción.....	37
17.	Construcciones pUAST <sup>YPWM</sup> Antp <sup>WRPW</sup> y pUAST <sup>AAAA</sup> Antp <sup>WRPW</sup> .....	38
18.	Caracterización de los plásmidos recombinantes pUAST <sup>YPWM</sup> Antp <sup>WRPW</sup> y pUAST <sup>AAAA</sup> Antp <sup>WRPW</sup> con enzimas de restricción.....	39
19.	Cruza genética en líneas de <i>D. melanogaster</i> mutantes para la integración de dos transgenes.....	41
20.	Efecto de la expresión ectópica de Antp y sus mutantes en el desarrollo embrionario de <i>D. melanogaster</i> .....	43
21.	Inducción ectópica de Antp dirigida por el potenciador <i>ptc</i> .....	44
22.	Expresión endógena y ectópica de Antp en embriones de <i>D. melanogaster</i> .....	45
23.	Efecto de la sobreexpresión de Antp y las mutantes fusionadas a WRPW sobre el gen blanco <i>tsh</i> .....	46
24.	Activación ectópica de Tsh por las mutantes <sup>YPWM</sup> Antp <sup>WRPW</sup> y <sup>AAAA</sup> Antp <sup>WRPW</sup> .....	47



## NOMENCLATURA

°C	grados centígrados
ΔHD	homeodomino deletado
aa's	aminoácidos
<sup>AAAA</sup> Antp	Antp con sustitución del tetrapéptido YPWM por cuatro alaninas
AbdA	Abdominal A
AbdB	Abdominal B
Abs	Absorbancia
Antp	Antennapedia
AP	Fosfatasa alcalina
BSA	Albumina sérica bovina
cl	clypeolabrum
cm	centímetros
C-terminal	Extremo carboxilo terminal
Dfd	Deformed
<i>dll</i>	<i>distalless</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>dpp</i>	<i>decapentaplegic</i>
Exd	Extradenticle
<i>fh[250<sup>con</sup>]</i>	secuencia consenso de <i>forkhead</i>
Ftz	Fushi tarazu



---

---

g	gramos
GKFAQ	Glicina-Lisina-Fenilalanina-Glutamina
h	hora
HS	choque térmico
kbp	kilopares de bases
Lab	Labial
<i>lacZ</i>	Secuencia codificante a $\beta$ -galactosidasa
M	Molaridad
mg	miligramos
min	minutos
ml	mililitro
mM	miliMolar
mRNA	Ácido Ribonucléico mensajero
$\mu$ g	microgramo
$\mu$ l	microlitro
N-terminal	Extremo amino terminal
ng	nanogramo
nm	nanometros
pb	pares de bases
PBS	Buffer de fosfatos salino
pc	procephalon
pH	logaritmo negativo de la concentración de iones hidrógeno
ps	parasegmento



---

---

<i>ptc</i>	<i>patched</i>
pUAST	plásmido con los sitios de unión a GAL4
®	marca registrada
rpm	revoluciones por minuto
Scr	Sex combs reduced
seg	segundos
<i>tsh</i>	gen blanco <i>teashirt</i>
T1, T2, T3	Segmentos torácicos 1, 2, 3
U	Unidades
UV	ultravioleta
UAS	Secuencias de unión a GAL4
V	voltios
VP16	Proteína viral
w	en moscas; fenotipo de ojos blancos
WRPW	Triptófano-Arginina-Prolina-Triptófano
wt	tipo silvestre
YPWM	Tirosina-Prolina-Triptófano-Metionina
yw	en moscas; fenotipo de cuerpo amarillo y ojos blancos



## 1. RESUMEN

Los genes homeóticos permiten el control genético del desarrollo de los diferentes organismos en la especificación del plan corporal. Estos genes presentan dos secuencias altamente conservadas: el homeobox que codifica a un péptido de 60 aminoácidos conocido como homeodominio (HD) que es el sitio de unión al DNA y el tetrapéptido YPWM que se ha involucrado en interacciones proteína-proteína. Estos dominios están presentes en la homeoproteína Antennapedia (Antp) que es un factor transcripcional que controla la formación de los segmentos torácicos en *Drosophila melanogaster*. Similarmente, la proteína Hairy contiene el motivo WRPW que es capaz de conferir actividad represora debido al reclutamiento del corepresor Groucho.

Debido a que la actividad funcional de las diferentes proteínas homeóticas está dada por un balance regulado por los mecanismos de activación/represión de las homeoproteínas para la regulación de los genes blanco, en esta tesis se realizó la adición del motivo de represión transcripcional WRPW, en el extremo C-terminal de Antp para determinar el efecto de un motivo de represión adicional en la actividad funcional de Antp durante el desarrollo embrionario y en la actividad de un gen blanco en *D. melanogaster*.

Para cumplir con los objetivos se llevó a cabo la clonación de las secuencias nucleotídicas codificantes a Antp y sus mutantes con la fusión a WRPW en el vector pUAST. Los vectores recombinantes fueron microinyectados en embriones de moscas  $w^{1118}$  para la obtención de las líneas transgénicas, en las que se analizó la expresión ectópica de Antp quimérica usando el sistema binario GAL4-UAS mediante cruces con la línea Hs-GAL4. Las larvas producto de las cruces fueron analizadas para la determinación de los efectos fenotípicos producidos por la inserción Antp<sup>WRPW</sup>. El análisis de activación transcripcional del gen blanco *tsh* se realizó mediante cruces genéticas con la línea *patched*-GAL4 para detectar el efecto del motivo WRPW en la actividad funcional de Antp.

Los resultados obtenidos en esta tesis demuestran evidentemente que la adición del motivo WRPW en el extremo C-terminal de Antp incrementó la actividad funcional de esta homeoproteína en la transformación homeótica T1 a T2 y en la activación del gen blanco *tsh*. Adicionalmente, la presencia de WRPW en Antp con ausencia del tetrapéptido YPWM rescató el fenotipo de esta mutante sugiriendo la actividad similar de YPWM y WRPW como motivos de represión transcripcional. Sorprendentemente, el tetrapéptido YPWM de Antp mostró ser indispensable para la activación del gen blanco *tsh* en la región de la cabeza de los embriones de *D. melanogaster* debido a que la presencia de WRPW no afectó la activación de *tsh*.



La importancia del análisis de las funciones activadoras ó represoras de las homeoproteínas es fundamental para entender el mecanismo por el cual éstas regulan los genes blanco. Los ensayos que se realizaron en esta tesis podrían complementarse al estudiar más genes blanco, como es el caso de *fkf[250<sup>con</sup>]* ó *apterous*, que son regulados por Antp. Además, deberá analizarse en ensayos de interacción si realmente el correpresor Groucho esta siendo reclutando por la proteína mutante <sup>YPWM</sup>Antp<sup>WRPW</sup>, así como también el cofactor TAFII155 que podría ser la proteína que interacciona en la actividad de la homeoproteína Antp a través del tetrapéptido YPWM.



## 2. INTRODUCCIÓN

Los diversos organismos multicelulares, se diferencian desde cigotos para dar lugar a diferentes morfologías que le servirán para desenvolverse en un ambiente apropiado. Durante el desarrollo embrionario miles de factores transcripcionales regulan la expresión de diversos genes que permiten que cada tipo celular se diferencie al producir proteínas específicas en determinadas cantidades. Las proteínas homeóticas representan una larga e importante clase de factores transcripcionales que dirigen estos complejos patrones de decisión.

En *Drosophila melanogaster* se han encontrado ocho proteínas homeóticas y treinta y nueve en vertebrados. Las proteínas homeóticas comparten en sus secuencias aminoacídicas una región altamente conservada, denominada homeodominio la cual se ha comprobado que es el sitio de unión al DNA; así como también el tetrapéptido YPWM que no tiene un arreglo estructural definido y posiblemente es capaz de interactuar con diversos cofactores que podrían regular la especificidad de las proteínas.

A la fecha, a las proteínas homeóticas se les ha atribuido un papel dual al momento de regular la expresión de diversos genes, es decir, pueden actuar como activadores ó represores, aunque los mecanismos por los que logran esta actividad aún no han sido esclarecidos totalmente, pero se postula que en algunos casos es regulado a través del tetrapéptido YPWM.

De manera similar al YPWM, el motivo WRPW se encuentra en proteínas represoras activas como Hairy y es capaz de conferir actividad represora debido al reclutamiento de la proteína Groucho. Experimentos previos han demostrado que al fusionar WRPW en la proteína activadora como GAL4 al extremo C-terminal, disminuyó su capacidad como activador transcripcional.

Debido a que la importancia funcional de las diferentes homeoproteínas esta dada por un balance de los mecanismos de activación y represión de sus genes blanco, en esta tesis evaluamos la actividad funcional de la proteína homeótica Antennapedia fusionada al motivo de represión WRPW en el desarrollo embrionario y en la activación de un gen blanco, para el análisis de los cambios de activación y/o represión transcripcional atribuidos a la homeoproteína Antp.



### 3. HIPÓTESIS

El motivo WRPW es un dominio de represión transcripcional que fusionado al extremo C-terminal de Antennapedia, en presencia o ausencia del tetrapéptido YPWM, afecta la activación del gen blanco *tsh* así como en el desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster*.



## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo General

Analizar la actividad funcional de Antennapedia en presencia y ausencia de YPWM fusionada al motivo WRPW en el desarrollo embrionario y en la activación del gen blanco *tsh* en *Drosophila melanogaster*

### 4.2. Objetivos Específicos

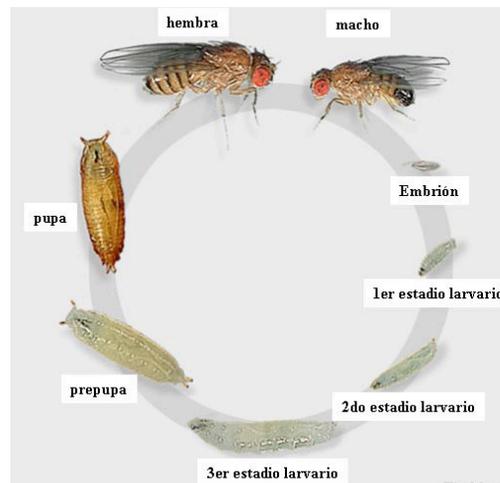
- 1.- Obtención y caracterización molecular de los vectores plasmídicos pUAST, pUASAntp y Helper 2-3 wc
- 2.- Construcción y caracterización de los plásmidos recombinantes pUAST<sup>YPWM</sup>Antp<sup>WRPW</sup> y pUAST<sup>AAAA</sup>Antp<sup>WRPW</sup>
- 3.- Generación de las líneas transgénicas UAS<sup>YPWM</sup>Antp<sup>WRPW</sup> y UAS<sup>AAAA</sup>Antp<sup>WRPW</sup> mediante microinyección de los plásmidos recombinantes en embriones de *D. melanogaster*
- 4.- Amplificación de las líneas transgénicas: Hs-GAL4, ptc-GAL4, UAS<sup>YPWM</sup>Antp, UASAntpΔHD, UAS<sup>AAAA</sup>Antp, UAS<sup>YPWM</sup>Antp<sup>WRPW</sup> y UAS<sup>AAAA</sup>Antp<sup>WRPW</sup>
- 5.- Realización de las cruas genéticas Hs-GAL4 / UAS<sup>YPWM</sup>Antp<sup>WRPW</sup> y Hs-GAL4 / UAS<sup>AAAA</sup>Antp<sup>WRPW</sup> para la determinación del efecto de WRPW sobre Antp en la transformación homeótica en *D. melanogaster*
- 6.- Determinación del patrón de expresión de las proteínas Antennapedia y de Teashirt en las cruas genéticas ptc-GAL4 / UAS<sup>YPWM</sup>Antp<sup>WRPW</sup> y ptc-GAL4 / UAS<sup>AAAA</sup>Antp<sup>WRPW</sup> para el análisis de la actividad funcional de Antp sobre el gen blanco *tsh*.



## 5. ANTECEDENTES

### 5.1. *Drosophila melanogaster*

La mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, es un organismo modelo utilizado en experimentación genética y en biología del desarrollo desde hace casi cien años; los primeros estudios realizados con *D. melanogaster* los realizó Thomas H. Morgan y su grupo de colaboradores en 1909. *D. melanogaster* es considerada un buen modelo debido a que a) ocupan un espacio reducido; b) es fácil de manipular; c) la dieta es económica; d) tiene un ciclo de vida corto; e) una hembra ovoposita alrededor de 1000 huevos a lo largo de su vida; f) es posible analizar diferentes generaciones y poblaciones en poco tiempo; g) se pueden estudiar las diferentes etapas del desarrollo debido a que el embrión se desarrolla fuera del cuerpo de la hembra; h) se pueden generar moscas transgénicas en poco tiempo; i) el genoma está totalmente secuenciado con 120 millones de pb y aproximadamente 13,647 genes; j) contiene cuatro cromosomas, que facilitan los estudios genéticos; y k) algunos de los genes humanos tienen su contraparte en el genoma de las moscas.



**Figura 1. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.** El esquema muestra las diferentes etapas del desarrollo de la mosca: etapa embrionaria, tres estadios larvarios, pupa y finalmente la eclosión del adulto. El ciclo de vida dura aproximadamente 10 días a 25°C y 60% de humedad.

#### 5.1.1. Ciclo de vida

*D. melanogaster* es un artrópodo (patas articuladas) de la clase insecta, del orden díptera (dos alas), que tiene un ciclo de vida que dura alrededor de 10 días en condiciones controladas de laboratorio a 25°C y con 60% de humedad, como se muestra en la Figura 1. Los cambios en la temperatura afectan la duración de este ciclo; a 10°C el ciclo requiere



aproximadamente 57 días, mientras que a 27°C constituye 9.5 días. Los valores entre 27° y 30°C ocasionan esterilidad en las moscas y reducen la viabilidad. En su hábitat natural la duración del ciclo de vida es más variable como resultado de los cambios climáticos y la adversidad del ambiente.

El huevo de *D. melanogaster* 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. El desarrollo embrionario empieza inmediatamente después de la fertilización.

**Tabla I. Embriones de *D. melanogaster* en las diferentes etapas del desarrollo**

Embrión	Etapas	Tiempo	Evento del desarrollo
	1	0min – 15min	Fusión pronuclear
	2	15min – 1h20min	Primeras divisiones celulares
	3	1h20min – 1h30min	Formación de las células del polo
	4	1h30min – 2h30min	Blastodermo sincitial
	5	2h30min – 3h15min	Celularización
	6	3h15min – 3h35min	Gastrulación temprana
	7	3h35min – 3h45min	Constricciones del intestino medio
	8	3h45min – 4h30min	Extensión de la banda embrionaria
	9	4h30min – 5h10min	Formación de la placa del estomodeo
	10	5h10min – 6h50min	Constricción del estomodeo
	11	6h50min – 9h	Formación de la banda embrionaria trilaminada
	12	9h – 10h30min	Inicio de la constricción de la banda embrionaria
	13	10h30min – 11h30min	Término de la constricción de la banda embrionaria
	14	11h30min – 13h	Involución de la cabeza e inicio de la terminación dorsal
	15	13h – 15h	Terminación dorsal
	16	15h – 22h	Condensación del SNC

Modificado de Wieschaus y Nüsslein-Volhard, 1998

La larva es blanca, vermiforme, segmentada y con piezas bucales más oscuras. Éstas son muy activas por lo que dejan surcos en el medio semisólido donde se mueven y comen. Debido a que la piel no es elástica, la pequeña larva debe mudar su cutícula para



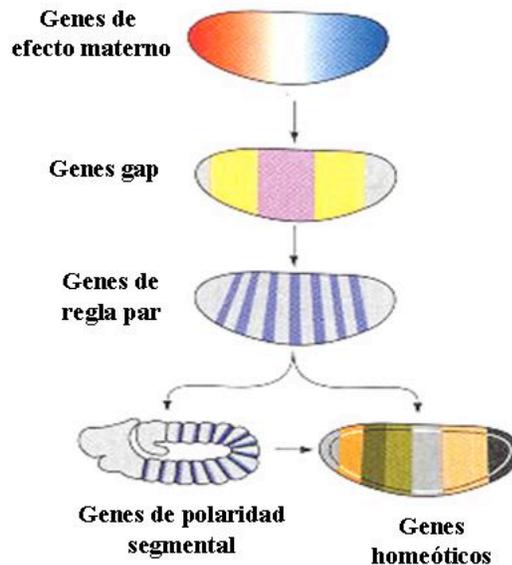
alcanzar el tamaño adulto. Tanto el tamaño de larva como el número de dientes en sus piezas bucales son un indicativo del estadio en que se encuentra. La larva de tercer estadio se alimenta y se desplaza hacia un lugar más seco para transformarse en pupa. El cuerpo de la larva se reduce y su cutícula 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 más tiempo. Una vez que la hembra es sexualmente madura, se aparea y almacena el semen en los receptáculos ventrales y lo utilizan para fecundar los huevos posteriormente.

### 5.1.2. Etapa Embrionaria

El desarrollo de los embriones en *D. melanogaster* se realiza en aproximadamente 22h y está subdividido en 16 etapas antes de llegar al primer estadio larvario (Wieschaus y Nüsslein-Volhard, 1998). Las diferentes etapas de los embriones son definidas por eventos especiales que son distinguibles visualmente, como se muestra en la Tabla I.

### 5.1.3. Jerarquía genética que permite la identidad segmental en los embriones *D. melanogaster*



Modificado de Gilbert, 2003

**Figura 2. Jerarquía genética que permite la identidad en los embriones de *D. melanogaster*.** El diseño en *D. melanogaster* es establecido inicialmente por genes de *efecto materno* que forman gradientes. Estos determinantes morfogénicos crean un gradiente protéico que activa los genes *gap*, los cuales definen los límites de los segmentos amplios en el embrión. Estos genes permiten la expresión de los genes de *regla par*, que dividen al embrión en regiones de dos segmentos y los de *polaridad segmental* que dividen al embrión en unidades segmentales a lo largo del eje antero-posterior. Las acciones de estos genes definen los dominios especiales de los genes homeóticos que permiten la identidad específica de cada segmento.

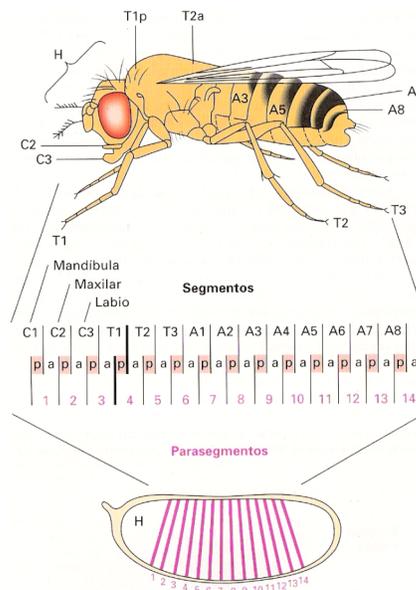


Durante el desarrollo embrionario de *D. melanogaster* se establecen los ejes antero-posterior y dorsoventral que permite la formación de los segmentos y se confiere la identidad particular de cada uno de ellos.

La Figura 2 muestra la jerarquía genética que controla estos eventos, que inicia con la acción de los genes de *efecto materno*. Estos genes se transcriben en el ovario de la mosca, y los mRNA se transmiten a diferentes regiones del huevo. Estos se traducen a proteínas reguladoras que se difunden a través del blastodermo sincitial. Los promotores de los genes *gap*, responden a las diferentes concentraciones y combinaciones de las proteínas de efecto materno y dividen al embrión en dominios anchos. Los genes de *regla par* y los de *polaridad segmental* son regulados por las proteínas *gap* y por algunas proteínas de efecto materno, y su función es afinar los dominios en segmentos de expresión más delgados que se denominan parasegmentos.

Las proteínas de regla par y las de polaridad segmental regulan la expresión de los genes *homeóticos*, los cuales son homeoproteínas que se encargan de asignar la identidad a cada parasegmento, estableciendo características y funciones únicas (Figura 2) (Gilbert, 2003).

La distribución o localización de proteínas que contribuyen a la diferenciación en los embriones se realiza utilizando anticuerpos que las reconocen específicamente, permitiendo, de esta manera, el análisis de la regulación génica (White, 1998).



Tomado de Lawrence et al., 1992

**Figura 3. Relación de segmentos y parasegmentos (ps) en *D. melanogaster*.** Los segmentos de la cabeza se designan de C1-C3; los segmentos torácicos de T1-T3; los abdominales de A1-A8. Cada segmento está dividido en un compartimiento anterior (a) y uno posterior (p). Cada parasegmento (ps) corresponde aproximadamente al compartimiento posterior de un segmento y el compartimiento anterior del segmento adyacente hacia atrás.

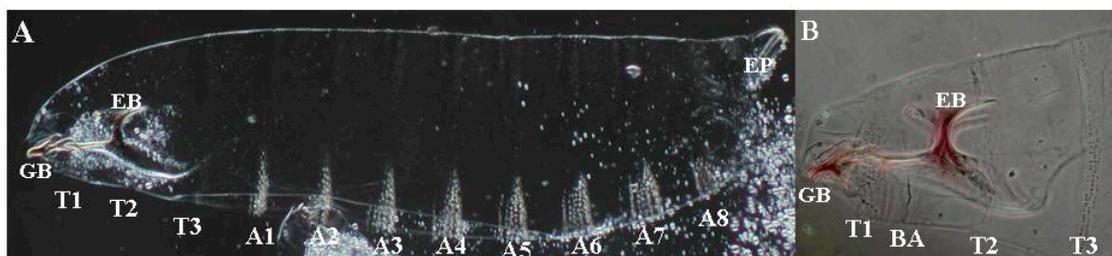


### 5.1.4. Parasegmentos

Tradicionalmente, los segmentos han sido considerados como las unidades de construcción del desarrollo en *D. melanogaster*, sin embargo, los parasegmentos (ps) son los más importantes en el desarrollo de los embriones. Los ps están fuera de fase con los segmentos, en la epidermis un segmento contiene un par de compartimientos anterior y posterior. En cambio, un ps está compuesto de un segmento posterior y otro anterior, es decir, se traslapan con los segmentos como se observa en la Figura 3 (Lawrence et al., 1992).

### 5.1.5. Cutículas embrionarias

El análisis de las cutículas embrionarias en *D. melanogaster* ha tenido un papel central en la historia de la genética y se han enfocado principalmente en el primer estadio larvario, debido a que la caracterización morfológica ha sido estudiada detalladamente (Stern y Sucena, 2000). Como se observa en la Figura 4, la larva de primer estadio está compuesta de tres segmentos torácicos y 8 abdominales que son distinguibles entre sí por la forma y el grosor de las dentículas.



**Figura 4. Cutícula embrionaria de *D. melanogaster*.** **A.** Imágen en campo oscuro de una cutícula embrionaria fijada con solución Hoyer's en vista lateral a 10X. La cabeza se encuentra orientada a la izquierda, se observan las piezas bucales interiores como los ganchos bucales (GB) y las estructuras bucales (EB). Los segmentos torácicos (T1-T3) se encuentran localizados en la parte exterior de la larva seguidos inmediatamente de los segmentos abdominales (A1-A8); los espiráculos posteriores (EP) se localizan después del segmento A8. **B.** Imágen en contraste de fases de una cutícula embrionaria en vista lateral a 20X, se observan los GB y las EB. El segmento T1 está diferenciado del T2 y T3 porque presenta 6 hileras de dentículas ó barbillas (BA) que son características de este segmento.

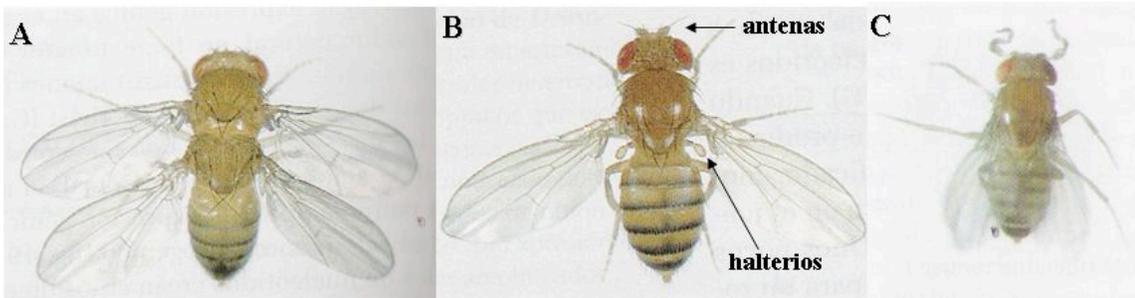
## 5.2. Mutaciones homeóticas

En 1894, William Bateson acuñó el término “homeosis” para referirse al fenómeno de la transformación parcial o completa de una estructura corporal por otra homóloga. Bithorax, fue el primer mutante homeótico descrito en *D. melanogaster* (Bridges et al., 1923); presentaba el tercer segmento torácico transformado al segundo y los halterios (órganos de equilibrio) fueron sustituidos por un segundo par de alas, (ver Figura 5). Posteriormente, se describió un segundo tipo de mutante homeótica, Antennapedia, en la cual, las antenas fueron reemplazadas por un segundo par de patas (LeCalvez, 1948).

En 1978, al estudiar la mutante Bithorax, Edward Lewis demostró la existencia de genes involucrados en el control de la segmentación en *D. melanogaster*. La identidad de los segmentos que componen la porción posterior del cuerpo de la mosca (metatórax



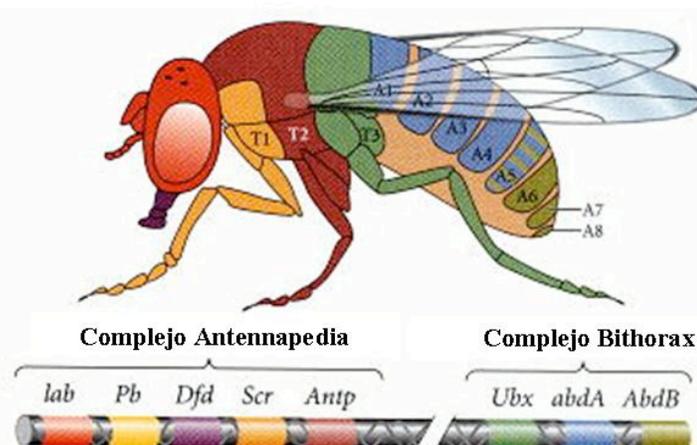
hasta el octavo segmento abdominal) son determinados por genes del complejo Bithorax (BX-C); mientras que la identidad de los dos primeros segmentos tórax (protórax y mesotórax), así como los segmentos de la cabeza (mandíbular, maxilar y labial) resultan de la expresión de los genes del complejo Antennapedia (ANT-C); (Lewis, 1978). Los complejos fueron denominados de esa forma por las mutantes previamente descritas.



**Figura 5. Transformaciones homeóticas en *D. melanogaster*.** A. La mutante Bithorax tiene los halterios sustituidos por un segundo par de alas. B. *D. melanogaster* normal, presenta un par de antenas, un par de alas y un par de halterios en el tercer segmento tórax. C. La mutante Antennapedia presenta en la cabeza un par de patas en lugar de un par de antenas.

### 5.3. Descubrimiento del Homeobox

Con la utilización de la tecnología del DNA recombinante fue posible aislar el complejo Antennapedia (ANT-C); (Garber et al., 1983) y el complejo Bithorax (BX-C); (Bender et al., 1983) de *D. melanogaster*. Al realizar experimentos con las secuencias de lo complejos, se observaron hibridaciones cruzadas en regiones homólogas en los genes *Antennapedia*, *fushi tarazu* y *Ultrabithorax* (Kuroiwa et al.; 1984; McGinnis et al., 1984), este segmento de DNA de hibridación fue mapeado y secuenciado conduciendo al descubrimiento del “homeobox”. Esta región de 180pb altamente conservada, al utilizarse como sonda permitió la clonación del resto de los genes homeóticos.



Modificado de Gilbert, 2003

**Figura 6. Expresión de los complejos génicos Antennapedia y Bithorax en *D. melanogaster*.** El color representa el segmento en donde se expresan cada uno de los genes homeóticos en el adulto y el orden en el que se encuentran distribuidos en el cromosoma es el mismo de las partes del cuerpo que definen.

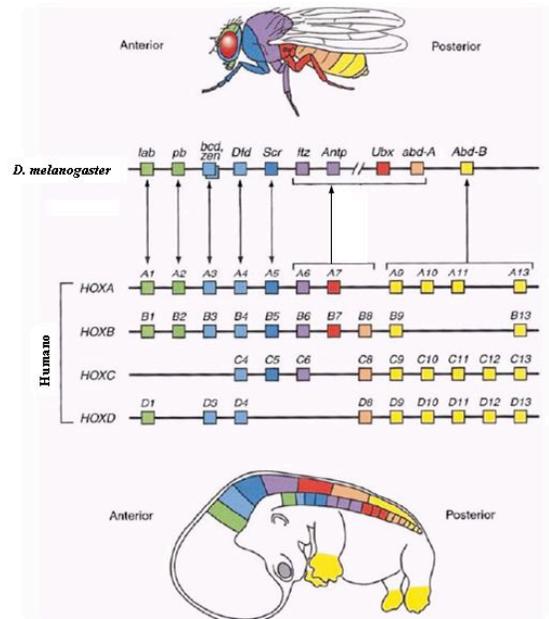


La Figura 6 muestra que los genes homeóticos en *D. melanogaster* se encuentran localizados en el tercer cromosoma y se encuentran agrupados en los complejos Bithorax (BX-C) y Antennapedia (ANT-C). El complejo BX-C contiene los genes *Ultrabithorax* (*ubx*), *Abdominal-A* (*abd-A*) y *Abdominal-B* (*abd-B*); mientras que el complejo ANT-C contiene a los genes *Labial* (*lab*), *Proboscipedia* (*pb*), *Deformed* (*dfd*), *Sex Combs Reduced* (*scr*) y *Antennapedia* (*Antp*).

Los genes homeóticos se expresan de manera colinear, es decir, se expresan en regiones específicas de acuerdo al orden en el que se encuentran distribuidos en el cromosoma. Además, presentan el fenómeno llamado supresión fenotípica o prevalencia posterior, en el cual los genes homeóticos posteriores reprimen la función de los que son expresados más anteriormente (Duboule et al., 1989).

#### 5.4. Genes homeóticos en vertebrados

Utilizando el homeobox como rastreador molecular se encontró que los genes homeóticos están presentes en organismos tan distantes como las levaduras y vertebrados superiores incluyendo al humano (McGinnis et al., 1984). Una de las características más importantes de los genes homeóticos es que estos siempre se encuentran agrupados en el genoma de las diferentes especies. Las especies de invertebrados analizadas contienen un solo grupo de genes homeóticos, en peces se han encontrado siete grupos cromosómicos; mientras que en mamíferos están organizados en cuatro grupos cromosómicos, conocidos como los genes HOX: Hox A, Hox B, Hox C y Hox D con 39 genes en total (Figura 7).



Modificado de Negre de Bofarull, 2005

**Figura 7. Organización de los genes homeóticos en *D. melanogaster* y el humano.** Los genes homeóticos en la mosca se agrupan en un solo cromosoma, en cambio en el hombre se organizan en cuatro cromosomas diferentes. En el esquema se observa los sitios de expresión de estos genes en ambos organismos.

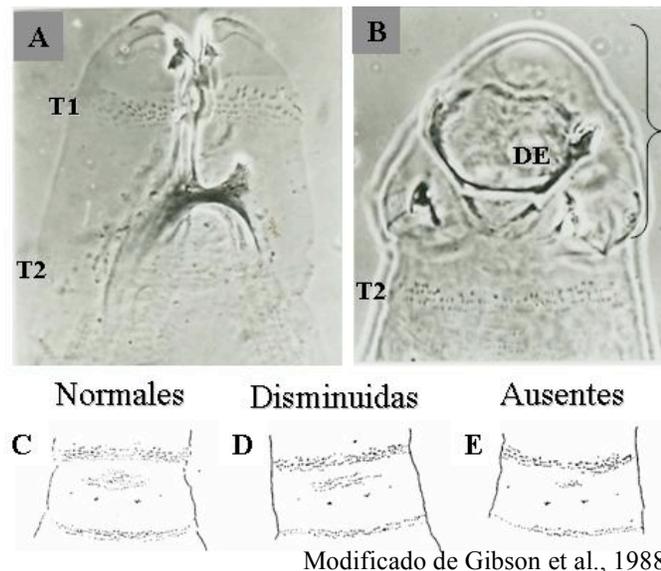


## 5.5. Antennapedia

La mutante homeótica Antennapedia en *D. melanogaster* fue descrita en 1948 por LeCalvez (ver Figura 5). Debido a que esta mutante fue un enigma por mucho tiempo para los investigadores, y con el advenimiento de la tecnología del DNA recombinante, se realizó la inserción del DNA complementario de Antennapedia (Antp) en un vector de expresión regulado por un promotor sensible a choque térmico. Las moscas transgénicas resultantes fueron sometidas a choques térmicos para promover la expresión ectópica de este gen; es decir se dirigió Antp en regiones que normalmente no lo hace; mostrando sorprendentemente, la transformación de antena por pata debido a la sobreexpresión de la homeoproteína Antp (Schneuwly et al., 1987).

Experimentos realizados en clonas de tejido mesotorácico deficientes para la homeoproteína Antp, mostraron que el tejido se transformó en antena en lugar de pata desde la diferenciación temprana. Estos primeros experimentos sugirieron que la función de Antp promueve la identidad del segmento mesotorácico suprimiendo los genes propios de la cabeza (Struhl, 1981). De esta manera en *D. melanogaster*, las antenas y las patas que son estructuras homólogas, difieren unas de otras como resultado de la acción de Antp.

El análisis de la distribución de la homeoproteína Antp mediante detección con anticuerpos policlonales mostró que ésta se expresa endógenamente, en la epidermis embrionaria, especialmente en la región posterior de T2 y anterior de T3 así como en el sistema nervioso (Carroll et al., 1986). En la larva se ha detectado Antp en los discos imaginales de pata así como en los discos torácicos dorsales (ala y halterio) pero no así en los discos de ojo-antena (Wirtz et al., 1986).



**Figura 8. Pérdida de la involución de la cabeza causada por la inducción ectópica de la homeoproteína Antp.** A. La larva tipo silvestre muestra la involución de la cabeza y los segmentos torácicos normales. B. La sobreexpresión de la homeoproteína Antp causa bloqueo en la involución de la cabeza (marcada con corchete), aparición de denticulas extra en la cabeza (DE) y la transformación de T1 por T2. C-E. Representaciones esquemáticas de las larvas que muestran las barbillas “normales”, “disminuidas” y “ausentes” en el segmento T1.



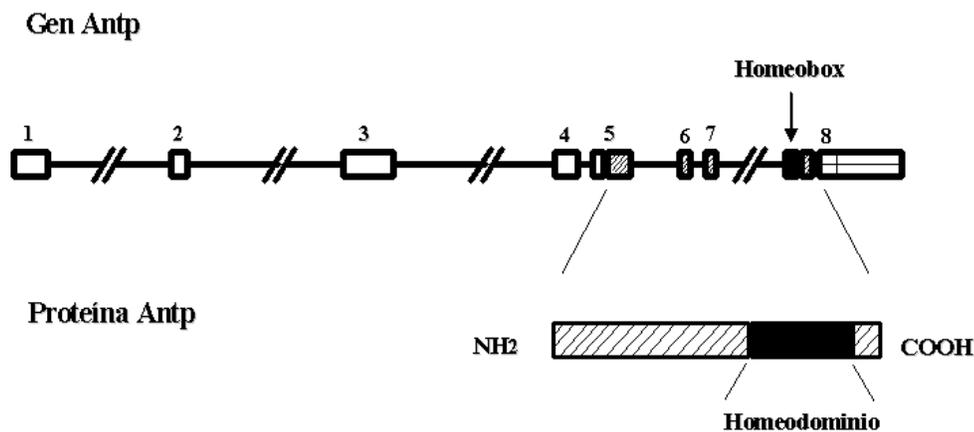
Gibson y colaboradores describieron detalladamente las mutaciones provocadas por la expresión ectópica de Antp dirigida por un promotor de choque térmico, en distintas etapas del desarrollo. En embriones a las 6.5h, la expresión ubícuota de Antp causa tres efectos muy característicos en las larvas: pérdida de involución de la cabeza, inducción de denticulas extra en la superficie dorsal de la cabeza y transformación homeótica del segmento T1 por T2. Esta transformación es determinada por las reducciones en las denticulas ó barbillas que son características de T1 y fueron clasificadas en tres rangos: “Normal” si estaban presentes 6 hileras de barbillas o denticulas; “Disminuidas” si hay un número intermedio de denticulas y “Ausentes” si hay menos de 20 denticulas (ver Figura 8).

En embriones de estadios más avanzados, la sobreexpresión de Antp, ocasiona letalidad larvaria y durante el estadio larvario ocasiona defectos en el desarrollo de las patas y en las pupas generalmente es letal. En los discos de antena la expresión ectópica produce la transformación de la arista, del segundo y tercer segmento antenal, en las estructuras correspondientes de la pata (Gibson et al., 1988).

### 5.5.1. Estructura del gen de *Antennapedia*

El análisis de la secuencia nucleotídica del gen *Antp* en *D. melanogaster* reveló que contiene dos promotores, ocho exones, siete intrones de hasta 60kbp y dos regiones de procesamiento y terminación (Schneuwly et al., 1987; ver Figura 9).

El mRNA de Antp contiene dos sitios de splicing en la región codificante (Stroeher et al., 1988) y las proteínas resultantes tienen cuatro sitios de fosforilación (Jaffe et al., 1997). Las cuatro posibles clases de proteínas difieren por 17aa's de un total de 378; sin embargo, éstas son reguladas de tal manera que una domina en la epidermis y en el sistema nervioso central, otra en el intestino del embrión, y otra en los discos imaginales en la larva (Gibson et al., 1988).

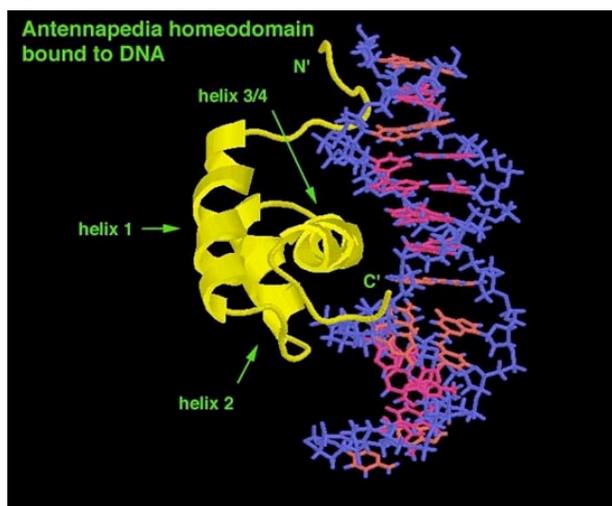


**Figura 9. Estructura del gen de *Antp*.** El gen *Antp* está constituido por ocho exones y siete intrones. El exón ocho contiene la secuencia nucleotídica del homeobox con 180pb (indicada en color negro). El producto codificante del homeobox es un homeodominio de 60aa's localizado en el extremo C-terminal de la homeoproteína.



### 5.5.2. Estructura Tridimensional del Homeodominio de Antp

La estructura tridimensional del homeodominio de Antp analizada por Resonancia Magnética Nuclear (RMN), mostró tres  $\alpha$ -hélices con una vuelta de 5aa's entre la hélice 1 y la hélice 2, y una vuelta de 4aa's entre la hélice 2 y la hélice 3 (Gehring et al., 1994). La hélice 3 llamada de reconocimiento hace contacto con el DNA en el surco mayor y el extremo N-terminal del homeodominio hace contacto con el surco menor del DNA, (Figura 10) (Otting et al., 1990). La conformación tridimensional "hélice-vuelta-hélice" se encuentra altamente conservada en los homeodominios de diferentes homeoproteínas de *D. melanogaster*; así como en las de diferentes especies (Qian et al., 1989). En la mayoría de este tipo de ensayos de unión al DNA usaron secuencias "TAAT" y "ATTA" como sitios de unión para el homeodominio (Kalionis et al., 1993).



Tomado de [http://www.biozentrum.unibas.ch/gehring\\_pictures.html#](http://www.biozentrum.unibas.ch/gehring_pictures.html#)

**Figura 10. Estructura tridimensional del complejo Antp-DNA.** Los principales contactos proteína-DNA se localizan en la hélice de reconocimiento tres con el surco mayor y el N-terminal del homeodominio con el surco menor del DNA.

El análisis de la estructura tridimensional, mediante RMN, del homeodominio de Antp mutado con una delección en el brazo N-terminal mostró que la estructura de esta homeoproteína truncada permanece intacta; sin embargo, la afinidad de unión al DNA de esta homeoproteína truncada mostró una disminución que se puede atribuir a la ausencia de contactos presentes en el extremo N-terminal del homeodominio (Qian et al., 1994).

La relevancia biológica de la estructura de los homeodominios fue confirmada en experimentos con el homeodominio de Fushi tarazu. Estos estudios muestran que los aa's de contacto al DNA en la hélice de reconocimiento son efectivamente indispensables para la actividad funcional de esta homeoproteína (Schier et al., 1993).

### 5.6. Genes blanco de Antp

Los productos de los genes homeóticos son factores transcripcionales son responsables de la formación de los segmentos específicos de tejido mediante regulación de la transcripción de genes blanco río abajo de su expresión. La mayoría de los sitios de



unión de los genes blanco contienen un núcleo de reconocimiento (secuencia TAAT) el cual se requiere para la unión óptima de las homeoproteínas. Los genes blanco pueden ser activados por algunas proteínas y ser reprimidos por otras.

Aunque la caracterización de la mayoría de los genes blanco de Antp no se ha realizado a nivel molecular se han descrito los siguientes genes bajo la regulación de esta homeoproteína: *teashirt* (McCormick et al., 1995); *apterous* (Capovilla et al., 2001); un fragmento derivado del potenciador de *forkhead* (*fkh[250<sup>con</sup>]*); (Ryoo et al., 1999); *decapentaplegic* (Manak et al., 1995); *odd paired* (Cimbora et al., 1995); *serrate* (Wiellette et al., 1999) y *centrosomina* (Heuer et al., 1995).

Existen genes que son reprimidos por el fenómeno de la dominancia posterior, término que describe la regulación cruzada entre los genes homeóticos y las consecuencias fenotípicas de su expresión. Las observaciones iniciales se apoyaron en que los genes del BX-C son capaces de reprimir a *Antp* (Hafen et al., 1984); mientras que los genes más posteriores del BX-C podrían reprimir a Ultrabithorax (Struhl, 1985). Este modelo se vio fortalecido con la evidencia bioquímica de que Ultrabithorax podría reprimir Antp uniéndose directamente a uno de sus promotores (Beachy, 1988). Se ha demostrado que Antp expresada ectópicamente en regiones más anteriores es capaz de reprimir a *lab*, *pb*, y *scr*; sin embargo, el mecanismo de represión molecular aún no se ha determinado (Gibson et al., 1988; Miller et al., 2001; Sprecher et al., 2004).

### 5.6.1. *Teashirt*

Uno de los genes blanco mejor caracterizados para Antp lo constituye *teashirt* (*tsh*) un gen que codifica para una proteína de dedos de zinc (Fasano et al., 1991). Dentro del desarrollo embrionario *tsh* es activado distintamente por las homeoproteínas en epidermis y mesodermo. Antp activa al gen *tsh* en la epidermis mientras que Ultrabithorax lo activa en el mesodermo somático. Durante el desarrollo del embrión los más altos niveles de la proteína Tsh (6h50min-9h) se localizan en las células donde se expresa Antp (ver Figura 11).



Tomado de McCormick et al., 1995

**Figura 11. La expresión de Tsh requiere a la homeoproteína Antp *in vivo*.** Los embriones en estadio 11 fueron incubados con anticuerpos policlonales contra las proteínas Antp y Tsh respectivamente. Los corchetes señalan la localización de la expresión de Antp, indicando de esta manera la relación directa entre Antp y Tsh.

Antp está presente durante el desarrollo de la epidermis y en el mesodermo en los parasegmentos 3 (ps3), ps4 y ps5 así como en altos niveles en el sistema nervioso central del ps3 al ps13. Por otro lado, los niveles más altos de la proteína Tsh están en el ps3, ps4



y ps5 en epidermis, mientras que los niveles más bajos están en la misma región en el mesodermo y en el sistema nervioso central.

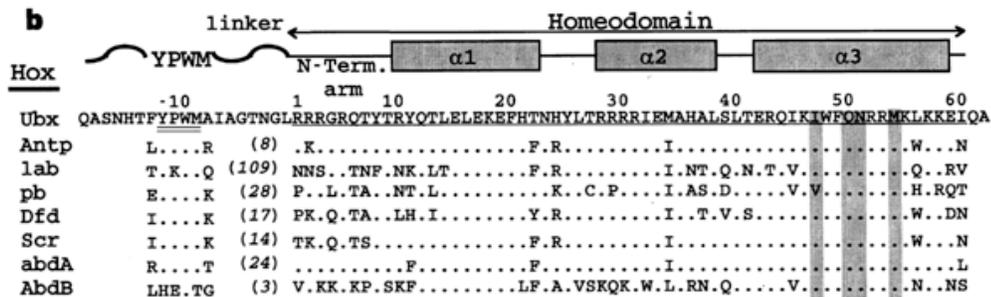
Se han identificado tres regiones reguladoras que modulan la expresión de *tsh*; el potenciador regulado por Fushi tarazu que actúa en los ps pares y que es dependiente de Fushi tarazu (Core et al., 1997); el potenciador que responde a las homeoproteínas Antp y Ultrabithorax (McCormick et al., 1995) y un elemento activador en *cis* que se requiere para que *tsh* se exprese en las regiones proximales del ala y halterio (Soanes et al., 2001).

Ensayos realizados donde se fusionó a *lacZ* el potenciador de *tsh*; que responde a homeoproteínas, mostró que era capaz de activar en las regiones donde normalmente se encuentra la homeoproteína Antp. Por lo tanto, la expresión del gen *tsh* requiere de Antp. Por otra parte, la producción ectópica de Antp estimula la expresión en epidermis, la expresión en bajos niveles en mesodermo del ps3 al ps5, así como en el mesodermo de la cabeza (McCormick et al., 1995).

### 5.7. Tetrapéptido YPWM

Las homeoproteínas contienen la región conservada del homeodominio, la cual presenta alta relevancia funcional ya que todos se unen a secuencias de DNA similares (TAAT); sin embargo, esta secuencia se presenta con alta frecuencia en los genomas de los diversos organismos, sugiriendo demasiados sitios de unión para estas proteínas (Desplan et al., 1988; Hoey et al., 1988; Kalionis et al., 1993; Beachy et al., 1993).

Experimentos realizados en *D. melanogaster* mediante sustitución recíproca de cuatro residuos en los extremos N-terminal entre Antp y Scr, cambiaron sorprendentemente la especificidad funcional de Antp a Scr y viceversa (Furukubo-Tokunaga et al., 1993). Estos experimentos 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.



**Figura 12. Alineamiento y comparación aminoacídica de homeoproteínas en *D. melanogaster*.** El homeodominio se muestra de 1 a 60aa's y los residuos N-terminal donde se incluye el tetrapéptido YPWM se enumeran de -1 hasta -19. El número de aa's entre YPWM y el homeodominio se muestra en los paréntesis.

La Figura 12 muestra que al comparar la secuencia de aa's de diferentes homeoproteínas en *D. melanogaster*, se encontró que además del homeodominio existe



otra región altamente conservada, el tetrapéptido YPWM (Tirosina-Prolina-Triptófano-Metionina). Este tetrapéptido está localizado río arriba de la mayoría de los genes homeóticos y se conecta al homeodominio mediante el brazo N-terminal flexible de este (Burglin, 1995). El número de aa's que separan este motivo de la región N-terminal es variable en las diferentes homeoproteínas.

La importancia del YPWM fue estudiada en la proteína Ftz de *D. melanogaster*, *Tribolium castaneum* y *Schistocherca americana*. La proteína Ftz de *D. melanogaster* que carece de YPWM es incapaz de activar a *tsh*, sin embargo Ftz de *T. castaneum* y *S. americana* que contiene YPWM si logran activarlo (Löhr et al., 2001). En base a estas observaciones, se postuló que la función del gen *fushi tarazu* cambió de un gen homeótico a un gen de segmentación, esto probablemente debido a la pérdida de YPWM.

La mutagénesis del tetrapéptido YPWM de HoxB8 en ratones, reveló que la expresión de esta proteína mutante acarrea mutaciones homeóticas similares a aquellas observadas cuando había una pérdida de función de los genes *HoxA7*, *HoxB7* y *HoxA9*. Esto revela que la mutación en el tetrapéptido afecta la función de otros genes que se encuentran en el locus HoxB. Por lo que se postuló, que este motivo es necesario para la interacción con cofactores que seleccionan los genes blanco naturales y se interfirió con la función de otras homeoproteínas al unirse a sus genes blanco (Medina-Martínez et al., 2004).

### 5.7.1. YPWM en Antennapedia

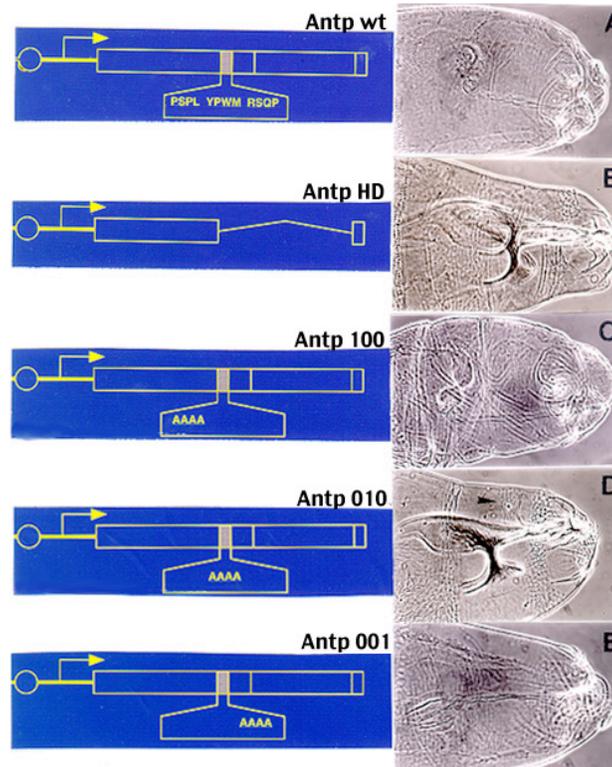
El análisis estructural de YPWM en Antp mostró que este tetrapéptido no presenta un arreglo estructural definido, es decir, es una región flexible de la proteína. Estos resultados permitieron postular que el tetrapéptido YPWM en combinación con el brazo flexible constituye un puente de conexión entre el homeodominio 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 (Qian et al., 1992).

Para analizar la función del tetrapéptido YPWM de Antp en el primer estadio larvario; se llevó a cabo un ensayo mutacional de este motivo y sus regiones flanqueantes mediante mutagénesis sitio dirigida con sustituciones a alanina. La sobreexpresión de las mutantes de Antp en las regiones flanqueantes bloquearon la involución de la cabeza y produjeron la transformación del segmento torácico T1 a T2 muy similar a Antp normal. Sin embargo, la sustitución del tetrapéptido YPWM de Antp mostró un fenotipo larvario normal como el testigo negativo el cual expresó la proteína Antp truncada en el homeodominio (Figura 13). Estos resultados muestran que YPWM es necesario e indispensable para la función *in vivo* de Antp (Canales, 2002).

Además, la expresión ectópica de Antp en embriones de *D. melanogaster* activó a los genes blanco *tsh*, al elemento *forkhead* (*fhk* [250<sup>con</sup>]) y reprimió la expresión de *scr*. Por el contrario, la mutación en el tetrapéptido YPWM por alaninas fue incapaz de activar *tsh* ó *fhk* [250<sup>con</sup>] y no logró reprimir a *scr*. Interesantemente, el tetrapéptido en



Antp es indispensable para la regulación de estos genes blanco (Canales del Castillo, 2005).



**Figura 13. Representación esquemática de las mutantes de Antennapedia y su efecto en el desarrollo embrionario.** El diagrama de la izquierda representa la estructura de la proteína Antp y sus mutantes. **A.** El Antp normal (Antp wt) muestra pérdida de la involuación de la cabeza, mientras que **B.** Antp con el homeodominio deletado (Antp $\Delta$ HD) muestra un desarrollo normal. Las mutantes en las regiones flanqueantes al YPWM **C.** y **E.** muestran el mismo fenotipo que la proteína Antp normal, en cambio la mutante en el tetrapéptido YPWM **D.** muestra un fenotipo normal como el de Antp con la delección en el homeodominio.

Experimentos realizados en células Schneider, demostraron que un péptido de 12aa's que incluye el tetrapéptido YPWM de Antp actúa como un dominio de represión transcripcional ya que éste redujo la activación de la transcripción de la proteína GAL4 en un 55% debido a la fusión del YPWM en su extremo C-terminal (Cárdenas, 2003). Por otro lado, ensayos de afinidad de unión al DNA de la proteína Antp y su mutante en el YPWM sugieren que éste podría modificar la conformación tridimensional de esta proteína al seleccionar los genes blanco (Cárdenas, 2007).

### 5.7.2. Interacción proteína-proteína a través del tetrapéptido YPWM

#### 5.7.2.1. En *D. melanogaster*

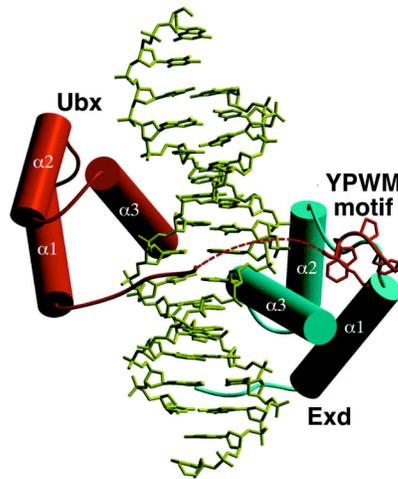
Las interacciones de algunas homeoproteínas son reguladas por el hexapéptido que contiene el motivo YPWM. La proteína Labial con una mutación en el hexapéptido se unía al DNA en ausencia del cofactor Extradenticle, e incrementó la habilidad para activar la transcripción *in vivo*. Estos resultados sugieren que el hexapéptido de la



proteína Labial inhibe la unión al DNA y que Extradenticle puede inducir un cambio conformacional en Labial promoviendo así, interacciones altamente específicas con el DNA (Chan et al., 1996).

Estudios realizados en homeoproteínas de *D. melanogaster* señalaron que el tetrapéptido está involucrado en las interacciones de Ultrabithorax y Abdominal-A con Extradenticle, en donde el mayor contacto se realiza mediante el tetrapéptido. Sin embargo, no se encontró una interacción directa entre Antp y Extradenticle utilizando este sistema (Johnson et al., 1995).

Ensayos realizados mediante Cristalografía de Rayos X con los homeodominios de Ultrabithorax y Extradenticle mostraron que estas proteínas se unen en caras opuestas del DNA y sus hélices de reconocimiento se conectan entre ellas (Figura 14). Esta interacción proteína-proteína está dada por el YPWM de Ultrabithorax que se inserta en una hendidura hidrofóbica formada en la superficie del homeodominio de Extradenticle (Passner et al., 1999).



**Figura 14. Interacción de los homeodominios de Ultrabithorax (Ubx) y Extradenticle (Exd) con el DNA.** El esquema representa la unión de las proteínas Ultrabithorax y Extradenticle en caras opuestas del DNA. La interacción proteína-proteína está regulada por el tetrapéptido YPWM de Ultrabithorax.

Cuando se analizó la importancia del tetrapéptido YPWM en Antp en transformaciones homeóticas en el estadio larvario se demostró que este tetrapéptido es necesario en la transformación ojo-ala y en menor grado en la transformación antena-pata. Utilizando el sistema de dos híbridos, se identificó una nueva proteína que interactúa con Antp a través de YPWM: la proteína TAFII155 asociada a la proteína de unión a la caja TATA. Ensayos de ganancia y pérdida de función demostraron que TAFII155 interactúa con Antp en la transformación ojo-ala (Prince et al., 2007).

### 5.7.2.2. En vertebrados

La importancia funcional de YPWM en vertebrados, se destacó cuando se logró determinar que las interacciones entre las proteínas Hox y Pbx (es el ortólogo de Extradenticle en vertebrados) estaban mediadas por el tetrapéptido. El análisis mediante



mutaciones puntuales reveló que los residuos triptófano y metionina son críticos para estas interacciones cooperativas (Chang et al., 1995; Knoepfler et al., 1996; Phelan et al., 1995).

El análisis *in vitro* mediante el uso de anticuerpos dirigidos contra el tetrapéptido YPWM confirmaron que éste es necesario para la cooperación de las homeoproteínas con el cofactor Pbx (Shanmugam et al., 1997).

Cuando se analizó la interacción entre las proteínas Hox/Pbx se encontró que además del tetrapéptido YPWM existía otra región que participaba en la interacción; el tetrapéptido GKFQ localizado en el extremo C-terminal del homeodominio de Pbx. Usando derivados de la oncoproteína E2-Pbx se determinó que el tetrapéptido GKFQ no es esencial para la interacción cooperativa con HoxA1 pero contribuye a la estabilidad del complejo, mientras que YPWM es estrictamente requerido para estas interacciones cooperativas (Green et al., 1997).

La estructura terciaria del complejo Pbx / DNA / HoxB1 fue determinada mediante Cristalografía de Rayos X. La interacción entre las proteínas se da a través del tetrapéptido de HoxB1, el cual se une a un paquete hidrofóbico en la proteína de Pbx. Este paquete está formado por una inserción de tres aa's en el homeodominio de Pbx. El dominio de unión al DNA de Pbx es mayor que el del homeodominio de las proteínas Hox, debido a que contiene una hélice adicional que parece contribuir a la unión del tetrapéptido de HoxB1 y a la unión más estable de Pbx al DNA (Piper et al., 1999).

## 5.8. El motivo WRPW

Existen motivos que se conocen de represión y se encuentran en proteínas represoras activas, como la proteína Hairy. Esta proteína define los límites en que debe expresarse el gen *fushi tarazu* y se encuentra estructurada por un dominio básico de unión a DNA, un dominio HLH, un sitio orange, y el motivo WRPW en el extremo C-terminal (Dawson et al., 1995).

La importancia del motivo WRPW fue encontrada cuando se secuenciaron los alelos del gen Hairy, mostrando dos mutaciones que afectaban solo a WRPW (Wainwright et al., 1991). El motivo WRPW fue analizado en cultivo celular al unirlo al extremo C-terminal de la proteína transactivadora GAL4. Esta proteína quimérica GAL4WRPW presentó una represión transcripcional del 50%, mostrando que el motivo WRPW confirió actividad represora a GAL4 (Fisher et al., 1996). Este motivo se ha encontrado en otras proteínas que actúan específicamente como represores tal es el caso de Huckebein (Goldstein et al., 1999), las proteínas Runt (Aronson et al., 1997) y Even-skipped (Kobayashi, 2001).

En nuestro laboratorio se realizó la fusión de la secuencia codificante al motivo WRPW en el extremo C-terminal de la homeoproteína Antp para analizar el efecto de esta fusión en la actividad transactivadora de Antp en cultivo celular. La actividad transcripcional de la proteína de fusión AntpWRPW mostró una reducción de la



transcripción en un 35%, mientras que Antp mutada en el tetrapéptido YPWM y fusionada a WRPW no mostró reducción en la actividad transactivadora.

Estos resultados sugieren que Antp requiere del tetrapéptido YPWM de manera indispensable para realizar su función; e interesantemente, el mecanismo molecular de activación/represión sugiere que Antp puede adquirir diferentes estados de activación o represión transcripcional dependiendo de los motivos como YPWM ó WRPW para su interacción con posibles coactivadores o represores para la regulación de los genes blanco específicos (Villanueva, 2004).

### 5.8.1. Interacción proteína-proteína a través del motivo WRPW

El motivo WRPW es necesario y suficiente para formar interacciones proteína-proteína con el corepresor Groucho (Paroush et al., 1994; Fisher et al., 1996) que es requerido para la función apropiada de las proteínas Hairy y todas aquellas proteínas que poseen el dominio WRPW (Ohsako et al., 1994; Fisher et al., 1996).

El corepresor Groucho y sus ortólogos en mamíferos (TLE) y levaduras (Tup1) poseen una estructura similar que incluye un N-terminal rico en Glicina, requerido para su dimerización, secuencias internas ricas en Ser/Thr/Pro y un C-terminal con repeticiones de WD (Triptófano-Ácido Aspártico) implicadas en el reconocimiento de proteínas. Groucho no se une al DNA, por lo que es reclutado mediante interacciones proteína-proteína por proteínas represoras que sí se unen al DNA (Parkhurst, 1998).

Groucho, en *D. melanogaster*, es de contribución materna y es expresado de forma ubicua durante el desarrollo embrionario (Delidakis et al., 1991). Los embriones deficientes en la contribución materna de Groucho muestran interrupciones en todos los procesos que están regulados por las proteínas Hairy y las relacionadas a ella (Paroush et al., 1994).

## 5.9. Modelo de Activación-Represión en las proteínas homeóticas

La actividad regulatoria de las proteínas homeóticas esta apoyada por experimentos realizados en Antp y Deformed. Antp es fosforilada por la proteína caseín-cinasa II (CKII) *in vitro* y mutaciones en los sitios de fosforilación en Antp puede inhibir su actividad biológica en embriones (Jaffe et al., 1997).

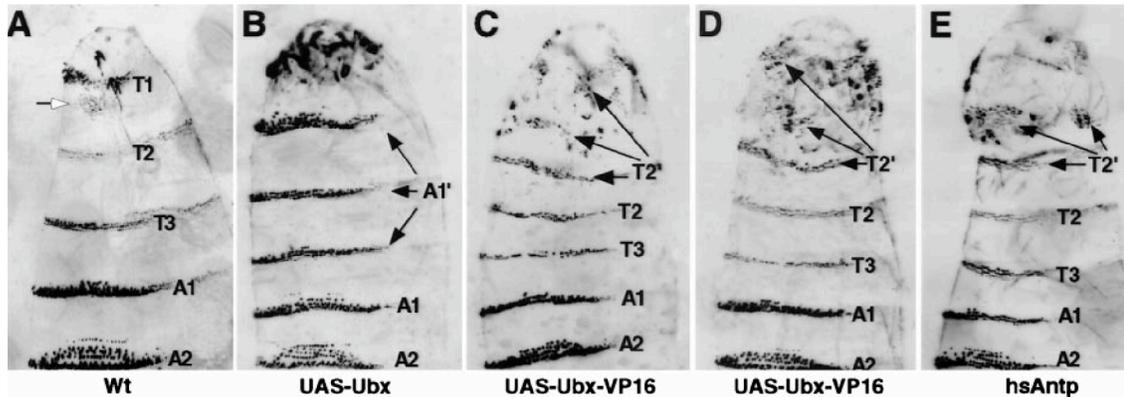
En el caso de Deformed, su unión como monómero al DNA en embriones puede ocurrir independientemente de cofactores, como Extradenticle; sin embargo, los sitios de unión ocupados no son suficientes para generar la activación en embriones. Los ensayos de transfección muestran que la región N-terminal de la proteína Deformed contiene un fuerte dominio de activación, pero su función es suprimida por el homeodominio de la misma proteína (Li et al., 1999).

Consistente con el modelo de la actividad regulatoria, muchas proteínas homeóticas son capaces de activar y reprimir la expresión génica. Esta propiedad esta bien



documentada para Ultrabithorax, que puede directamente activar ó reprimir la transcripción de diferentes promotores en ensayos genéticos y de transfección en células Schneider. Ultrabithorax modula la activación o represión génica dependiendo de las secuencias de los sitios de unión al DNA (Vachon et al., 1992; Capovilla et al., 1994; Krasnow et al., 1989; Saffman et al., 1994).

Ultrabithorax suele funcionar como represor; pero puede convertirse en un activador mediante la fusión del dominio de activación de la proteína viral VP16 en el homeodominio de Ultrabithorax. Li y cols. demostraron que la expresión ectópica de la proteína de fusión Ultrabithorax-VP16 transformó el segmento T1 a T2 en el primer estadio larvario de *D. melanogaster* como se observa en la figura 15; a diferencia de la expresión ectópica de Ultrabithorax normal que transformó los tres segmentos torácicos al primer segmento abdominal. Así, en lugar de presentar la actividad represora como la proteína Ultrabithorax, la proteína de fusión Ultrabithorax-VP16 se comportó como activador; ya que produce el mismo fenotipo que se obtiene con la expresión de Antp ectópica (Li et al., 1999).



Tomada de Li et al., 1999

**Figura 15. Expresión ectópica de Ultrabithorax-VP16.** A. Larva de primer estadio que muestra los tres segmentos torácicos y dos segmentos abdominales normales en *D. melanogaster*. B. La expresión ectópica de Ultrabithorax transformó los segmentos torácicos a segmentos abdominales A1. C. y D. La expresión ectópica de dos diferentes mutantes Ultrabithorax-VP16 transformaron el segmento T1 a T2 tal y como ocurre con la E. sobreexpresión de Antp.

En *D. melanogaster* y otros insectos Ultrabithorax y Abdominal-A se expresan en los segmentos abdominales donde estas proteínas pueden suprimir el desarrollo de segmentos torácicos durante la embriogénesis. En cambio, en los crustáceos (que se encuentran relacionados con los insectos); Ultrabithorax y Abdominal-A se expresan en el tórax y el abdomen.

Estudios previos han propuesto que la ganancia y pérdida de función de la activación y/o represión en las proteínas homeóticas fue un posible mecanismo para diversificar la morfología. En algún punto de la evolución, prototipos de los genes homeóticos fueron generados por la duplicación de un solo gen ancestral. Después del evento de la duplicación, una o ambas copias acumularon mutaciones y realizaron diferentes funciones. Uno de los posibles eventos que alteraron la función fueron cambios en las



secuencias regulatorias que alteraron los patrones de expresión comparados con la copia ancestral. En el caso de los genes homeóticos, los cambios en las secuencias codificantes han generado distinciones funcionales que alteraron los sitios de reconocimiento a los posibles genes blanco (Carroll et al., 2001).

Comparaciones entre las proteínas Ultrabithorax del crustáceo *Artemia franciscana* y *D. melanogaster* muestran que ambas poseen varios dominios de represión que podrían interactuar con uno o más complejos represores de la transcripción. La proteína Ultrabithorax de *A. franciscana* contiene además un péptido, que denominaron de “anti-represión”, el cual probablemente interfiere con la capacidad de los dominios de represión para atraer estos complejos. Cuando este péptido se agrega a la proteína Ultrabithorax de *D. melanogaster* la proteína híbrida se comporta como la Ultrabithorax de *A. franciscana*, la cual es incapaz de reprimir el gen blanco *dll*, que es fundamental para el desarrollo de los apéndices (Ronshaugen et al., 2002).

Debido a lo anterior, el propósito de la presente tesis es determinar la actividad de la proteína homeótica Antp en presencia del motivo de represión WRPW; para determinar el posible mecanismo de activación/represión que puede adquirir esta proteína homeótica, dependiendo de la presencia de uno o dos motivos de represión (YPWM ó WRPW), para la regulación de los genes blanco.



## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Obtención de los DNA's plasmídicos pUAST, pUASAntp y Helper 2-3 wc

#### 6.1.1. Preparación de bacterias $\text{Ca}^{++}$ competentes

Para la preparación de las bacterias  $\text{Ca}^{++}$  competentes se utilizó el método descrito por Sambrook et al. en 2001; se tomó 1ml de la cepa de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  crecida en 3ml de medio de cultivo Luria Bertani (LB) toda la noche a 250 rpm a 37°C y se inoculó en 100ml de medio LB. Posteriormente, el inóculo se mantuvo en las mismas condiciones de agitación y temperatura aproximadamente 2h30min hasta alcanzar la densidad óptica de 0.375 a una absorbancia de 590nm.

Una vez alcanzada la densidad óptica en el cultivo bacteriano, éste se transfirió a dos tubos de 50ml y se centrifugaron a 5,000rpm por 10min a 4°C; los paquetes celulares se resuspendieron completamente en 10ml de  $\text{CaCl}_2$  0.1M frío y previamente esterilizado. Los tubos se incubaron en hielo durante 30min y nuevamente se centrifugaron durante 8min a 5000rpm a 4°C. Se deshechó el sobrenadante y los paquetes celulares fueron resuspendidos en 2ml de la misma solución de  $\text{CaCl}_2$  0.1M almacenándose a 4°C en hielo.

La eficiencia de transformación de preferencia debe ser mayor a  $1 \times 10^6$  colonias por  $1\mu\text{g}$  de DNA, si esta es obtenida, a las bacterias competentes se les agrega 15% de glicerol estéril y frío, se hacen alícuotas de  $200\mu\text{l}$ , se colocan en nitrógeno líquido para la congelación rápida y se almacenan inmediatamente a -70°C.

#### 6.1.2. Transformación de los DNA's plasmídicos

Para la transformación de las bacterias *E. coli*  $\text{Ca}^{++}$  competentes se utilizó el método descrito por Sambrook et al. 2001; se agregó  $1\mu\text{l}$  del plásmido (pUAST, pUASAntp ó Helper 2-3 wc) a una concentración de  $1\text{ng}/\mu\text{l}$  a diferentes alícuotas de  $50\mu\text{l}$  de bacterias  $\text{Ca}^{++}$  competentes y se incubaron durante 30min en hielo. Pasado el tiempo de incubación, se dio un choque térmico de 1min 30seg a 42°C y se incubaron inmediatamente en hielo durante 5min, posteriormente se añadieron  $250\mu\text{l}$  de medio LB y se dejaron 30min en agitación a 250rpm a 37°C. Al término de este tiempo se centrifugaron las reacciones de transformación durante 20seg, se desecharon  $250\mu\text{l}$  de medio LB, para finalmente sembrarlas en placas con ágar LB más ampicilina a 50mg/ml e incubarlas a 37°C durante toda la noche.



### 6.1.3. Obtención de los DNA's plasmídicos mediante minipreparación

Las colonias bacterianas obtenidas de la transformación de los plásmidos pUAST, pUASAntp y Helper 2-3 wc fueron levantadas, se inocularon en tubos de ensayo con 3ml de medio LB y 3 $\mu$ l de ampicilina 50mg/ml. Los tubos fueron puestos en agitación constante a 250rpm a 37°C durante toda la noche para la posterior obtención de los DNA's plasmídicos por el método de lisis alcalina modificado de Birnboim y Doly en 1979 que se describe a continuación:

Un volumen de 1.5ml de cada cultivo bacteriano fue colocado en tubos eppendorf de 1.5ml. Los cultivos se centrifugaron por 2min a 14000rpm (este paso se realizó dos veces para procesar los 3ml de medio LB), se desechó el sobrenadante y se les agregó 150 $\mu$ l de solución I (Tris-HCl 25mM pH 8, EDTA 10mM pH 8), los paquetes celulares se resuspendieron mediante agitación con vórtex y se incubaron por 5min a temperatura ambiente. Se les añadió 150 $\mu$ l de solución II (NaOH 0.2 N, SDS 1%), se mezclaron por inversión, y se incubaron 3min en hielo. Se les adicionó posteriormente 150 $\mu$ l de solución III (KOAc 5M, CH<sub>3</sub>COOH) se agitaron por inversión y se incubaron 10min a -20°C. Pasado el tiempo de incubación, los tubos se centrifugaron durante 10min a 14000rpm y los sobrenadantes, que contenían los DNA's plasmídicos, se transfirieron a tubos eppendorf estériles de 1.5ml, se les agregó un volumen de cloroformo (450 $\mu$ l), se mezclaron por vórtex y se centrifugaron durante 5min a 14000rpm. Las fases superiores se transfirieron a tubos eppendorf estériles de 1.5ml agregándoles inmediatamente 2.5 volúmenes de etanol al 100% frío (1.13ml), se agitaron los tubos por inversión y se incubaron mínimo 30min a -20°C, para que los DNA's plasmídicos se precipitaran al fondo del tubo.

Terminada la incubación, los tubos se centrifugaron durante 5min a 14000 rpm, se descartaron los sobrenadantes y las pastillas de DNA's se lavaron con 400 $\mu$ l de etanol al 70% mediante vórtex, después se centrifugaron por 5min a 14000rpm, se eliminó completamente el sobrenadante y se secaron a 37°C durante 10min. Finalmente, los DNA's plasmídicos fueron resuspendidos en 20 $\mu$ l de H<sub>2</sub>O miliQ que contenía RNAsa a una concentración final de 0.02mg/ml. Los DNA's aislados fueron almacenados a -20°C hasta su utilización.

### 6.1.4. Caracterización de los DNA's plasmídicos con enzimas de restricción diagnósticas

Los plásmidos pUAST, pUASAntp y Helper 2-3 wc fueron caracterizados mediante digestión con las enzimas de restricción diagnósticas *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Sma*I, *Sal*I de acuerdo a los sitios de corte descritos para esas secuencias. Las condiciones requeridas para las digestiones fueron realizadas con las recomendaciones de la casa comercial Invitrogen (Carlsband, California, E.U.A.). La Tabla II muestra los cálculos para las reacciones de digestión en dos de las enzimas utilizadas.

La visualización de los DNA's se realizó en geles de agarosa al 0.7% colocados en una cámara de electroforesis horizontal sumergidos en buffer SB 1X. Las muestras de los



DNA's plasmídicos fueron mezcladas con 1µl de jugo azul 6X y fueron depositadas en los carriles del gel. La electroforesis se llevó a cabo a 150V por 40min, posteriormente se tiñeron en una solución de bromuro de etidio a concentración de 100µg/ml durante 10min. La fotodocumentación de los geles con los DNA's se realizó utilizando un transiluminador de luz UV y el programa Gel-PRO 3.1 (Dinco & Rhenium Industries, R.F., Israel).

**Tabla II. Condiciones de digestión con las enzimas *HindIII* y *SalI***

Componentes	Reacción	Componentes	Reacción
DNA µg/µl	1µl (1µg)	DNA µg/µl	1µl (1µg)
Buffer2 10X	1µl (1X)	Buffer10 10X	1µl (1X)
<i>HindIII</i> 20U/µl	0.2µl (4U)	<i>SalI</i> 10U/µl	0.2µl (2U)
H <sub>2</sub> O miliQ	7.8µl	H <sub>2</sub> O miliQ	7.8µl
Volumen Final	10µl	Volumen Final	10µl

## 6.2. Construcción de los plásmidos recombinantes pUAST<sup>YPWM</sup>Antp<sup>WRPW</sup> y pUAST<sup>AAAA</sup>Antp<sup>WRPW</sup>

### 6.2.1. Purificación de los fragmentos <sup>YPWM</sup>Antp<sup>WRPW</sup>, <sup>AAAA</sup>Antp<sup>WRPW</sup> y pUAST

Los plásmidos pUAST, pNPac<sup>YPWM</sup>Antp<sup>WRPW</sup> y pNPac<sup>AAAA</sup>Antp<sup>WRPW</sup> fueron preparados por midipreparación mediante lisis alcalina; esta técnica tiene el mismo fundamento que la minipreparación solo que se realiza a partir de 100ml de cultivo bacteriano. Posteriormente, los plásmidos fueron sometidos a digestión con la enzima de restricción *NotI* para obtener el vector pUAST linearizado y los fragmentos codificantes a Antp como se muestra en la Tabla III:

**Tabla III. Componentes de la digestión preparativa con la enzima *NotI***

Componentes	pUAST	pNPac <sup>YPWM</sup> Antp <sup>WRPW</sup>	pNPac <sup>AAAA</sup> Antp <sup>WRPW</sup>
DNA µg/µl	1µl (1µg)	2µl (1µg)	2µl (1µg)
Buffer 3 10X	2µl (1X)	2µl (1X)	2µl (1X)
Enzima <i>NotI</i> (15U/µl)	1µl (15U)	1µl (15U)	1µl (15U)
H <sub>2</sub> O miliQ	16µl	15µl	15µl
Volumen Final	20µl	20µl	20µl

Posteriormente, estos fragmentos se purificaron utilizando el Kit Wizard® (Promega, Madison WI, E.U.A.). El método utilizado corresponde al descrito por el proveedor que consistió en cortar los fragmentos de DNA obtenidos a partir del gel de agarosa 0.7% y se disolvieron por separado con solución de unión a membrana (10µl por cada 10mg de gel) a una temperatura mayor de 55°C. Después, los geles disueltos con los fragmentos de DNA se transfirieron a las minicolumnas y se incubaron 1min a temperatura ambiente para luego ser centrifugados por 1min a 10000rpm. Los



sobrenadantes fueron retirados por decantación, las columnas se reinsertaron en los tubos, se les agregaron 700 $\mu$ l y después 500 $\mu$ l de solución de lavado de membrana a la columna, inmediatamente se centrifugaron a 10000rpm por 1min y en cada lavado se desecharon los sobrenadantes. En el último lavado, las columnas fueron transferidas a tubos eppendorf estériles de 1.5ml, se les agregó 50 $\mu$ l de H<sub>2</sub>O miliQ, se incubaron por 1min a temperatura ambiente y se centrifugaron a 10000rpm para eluir los DNA's, los cuales fueron visualizados en un gel de agarosa al 0.7% para corroborar su obtención.

### 6.2.2. Ligaciones Vector-Inserto

Los insertos purificados con la secuencia codificante a <sup>YPWM</sup>Antp<sup>WRPW</sup> y <sup>AAAA</sup>Antp<sup>WRPW</sup>, se ligaron al vector linealizado pUAST utilizando la enzima T4 DNA ligasa (Invitrogen, Carlsban, California, E.U.A.). Las reacciones vector-inserto se realizaron como se observa en la Tabla IV:

**Tabla IV. Condiciones de ligación para la construcción de los plásmidos recombinantes**

Componentes	Inserto <sup>YPWM</sup> Antp <sup>WRPW</sup>	Inserto <sup>AAAA</sup> Antp <sup>WRPW</sup>
DNA <sub>inserto</sub>	2 $\mu$ l (100ng/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l (150ng/ $\mu$ l)
DNA <sub>vector</sub> (pUAST)	0.5 $\mu$ l (150ng/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l (150ng/ $\mu$ l)
Buffer ligasa 5X	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l
Enzima T4 DNA ligasa (1U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O miliQ	4.5 $\mu$ l	4.5 $\mu$ l
Volumen Total	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l

Estas reacciones fueron incubadas a 16°C durante 24h y posteriormente se llevó a cabo la transformación de 2.5 $\mu$ l de las ligaciones en 50 $\mu$ l de bacterias *E. coli* Ca<sup>++</sup> competentes, con una eficiencia de 1x10<sup>6</sup>, para la obtención de colonias con los plásmidos recombinantes.

**Tabla V. Condiciones de reacción para las enzimas de restricción *Bam*HI, *Eco*RI y *Sma*I**

Componentes	Reacción
DNA $\mu$ g/ $\mu$ l	1 $\mu$ l (1 $\mu$ g)
Buffer 3 10X	1 $\mu$ l (1X)
Enzima de restricción	0.2 $\mu$ l (2U)
H <sub>2</sub> O miliQ	7.8 $\mu$ l
Volumen Final	10 $\mu$ l

### 6.2.3. Caracterización de los plásmidos recombinantes con enzimas de restricción

Los plásmidos recombinantes pUAST<sup>YPWM</sup>Antp<sup>WRPW</sup> y pUAST<sup>AAAA</sup>Antp<sup>WRPW</sup> fueron obtenidos por minipreparación utilizando la técnica descrita previamente; y se



caracterizaron usando tres enzimas de restricción diagnósticas: *Bam*HI, *Eco*RI, *Sma*I (Invitrogen, Carlsban, California, E.U.A.). Las reacciones de digestión fueron realizadas de acuerdo a las recomendaciones de la casa comercial como se muestra en la Tabla V.

### 6.3. Generación de las moscas transgénicas con los plásmidos recombinantes

#### 6.3.1. Purificación de los DNA's recombinantes usando columnas de Qiagen

Los DNA's plasmídicos pUAST<sup>YPWM</sup>Antp<sup>WRPW</sup>, pUAST<sup>AAAA</sup>Antp<sup>WRPW</sup> y Helper 2-3 wc utilizados para microinyectar se purificaron mediante midipreparación usando las columnas del Kit de Qiagen (Qiagen® Plasmid Handbook, Valencia, CA, E.U.A.). El protocolo se basa en un procedimiento descrito por el proveedor el cual consistió en inocular 10µl de cultivo bacteriano con los plásmidos de nuestro interés (previamente crecido en 3ml de LB con 3µl ampicilina) en 100ml de LB con 100µl de ampicilina 50mg/ml y se incubó a 37°C durante 12h a 250rpm.

Posteriormente, los cultivos bacterianos se transfirieron a diferentes tubos de 50ml, se centrifugaron por 15min a 5000rpm, se retiraron los sobrenadantes por decantación y los paquetes celulares se resuspendieron totalmente con 4ml de Buffer P1 mediante vórtex, inmediatamente se les agregó 4ml de Buffer P2, se agitaron por inversión durante 6 tiempos y se incubaron a temperatura ambiente 5min. Pasado el tiempo de incubación, se agregaron 4ml de Buffer P3, también se agitaron por 6 tiempos y se dejaron en hielo por 20min.

Los lisados celulares fueron centrifugados a 12000rpm durante 30min a 4°C; al mismo tiempo se equilibraron columnas de Qiagen aplicando 4ml de Buffer QBT y los sobrenadantes obtenidos de la centrifugación se colocaron en las columnas equilibradas dejando que pasaran por fuerza de gravedad. Los DNA's unidos en las columnas se eluyeron en tubos de 50ml agregando 5ml de Buffer QF y para precipitarlos se agregaron 0.7 volúmenes (3.5ml) de isopropanol absoluto y se mezclaron por inversión para después ser centrifugados a 9500rpm durante 10min a 4°C. Los sobrenadantes se decantaron cuidadosamente, las pastillas de DNA's se lavaron con 5ml de etanol al 70% centrifugándose, posteriormente a 9500rpm por 10min a 4°C. Finalmente, los sobrenadantes se retiraron cuidadosamente, las pastillas de DNA's se secaron a 37°C por 10min y se resuspendieron en aproximadamente 500µl de H<sub>2</sub>O miliQ.

El análisis de calidad y concentración de los DNA's purificados se realizó mediante absorbancia con luz ultravioleta a 260 y 280nm usando una dilución 1:100 y se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.7%.

#### 6.3.2. Microinyección de los plásmidos recombinantes en embriones de *Drosophila melanogaster*

Los DNA's recombinantes se enviaron en tubos eppendorf estériles (50µg) a la compañía Bestgene Inc. (Chino Hills, California, E.U.A.). El protocolo C utilizado



consistió en microinyección de los DNA's plasmídicos así como la identificación y balanceo de las moscas transgénicas.

La microinyección de los plásmidos recombinantes se realizó en doscientos embriones de la línea  $w^{1118}$  de *D. melanogaster* resultando en una tasa de sobrevivencia aproximada del 20%. Debido a lo anterior, los DNA's fueron transformados en bacterias DH5 $\alpha$  Ca<sup>++</sup> competentes y purificados nuevamente por columnas de Qiagen en la compañía para asegurar la calidad de los DNA's plasmídicos. Posteriormente, se realizó el segundo proceso de microinyección en doscientos embriones de la misma línea, volviéndose a obtener el 20% de sobrevivencia. Como sugerencia de la Dra. Reséndez, que tenía evidencia de la toxicidad de los plásmidos con secuencias codificantes a la proteína Antp en los embriones, los plásmidos recombinantes se diluyeron a una concentración de 0.2 $\mu$ g/ $\mu$ l y fueron microinyectados en doscientos embriones adicionales, obteniéndose posteriormente cien larvas para cada plásmido recombinante.

Los embriones que lograron alcanzar la etapa adulta después de la microinyección fueron sesenta y éstos fueron cruzados con moscas de la línea  $w^{1118}$  para localizar el marcador fenotípico de ojos rojos en la descendencia. Para el plásmido  $Y^{PWM}Antp^{WRPW}$  se obtuvieron dieciséis líneas independientes y para  $AAAAAntp^{WRPW}$  se obtuvieron quince. Las líneas de moscas transgénicas fueron sometidas a dos procesos de balanceo genético de cromosomas, obteniéndose para cada plásmido recombinante 10 líneas independientes, que fueron finalmente enviadas a nuestro laboratorio.

## 6.4. Inducción ectópica de Antennapedia y sus mutantes mediante choque térmico

### 6.4.1. Mantenimiento y amplificación de las moscas transgénicas

Todas las líneas de *D. melanogaster* fueron mantenidas como homocigotos viables a 18°C en tubos de comida estándar (Fisher Scientific Cat. no. AS153) y transferidas a viales con comida fresca una vez a la semana. Las amplificaciones masivas de moscas se realizaron mediante colectas de huevos durante 12h y mantenidas en botellas con comida a 25°C hasta el momento de las eclosiones.

Las líneas de moscas transgénicas productoras y reporteras utilizadas en esta tesis fueron las siguientes:

**Hs-GAL4 (110):** Esta línea productora posee un promotor de choque térmico fusionado río arriba de la secuencia codificante a la proteína de las levaduras GAL4 insertado en el cromosoma dos.

***patched*-GAL4/Cyo; F1C1/MkRS (113):** Esta línea productora contiene el potenciador del gen *patched*, que dirige la expresión de la proteína GAL4 a las regiones anteriores de todos los parasegmentos durante el desarrollo embrionario y se encuentra localizado en el cromosoma dos.



**yw; UASAntp (75):** Esta línea reportera posee las secuencias UAS fusionadas río arriba de la secuencia codificante para la homeoproteína Antp wt, y la inserción se encuentra localizada en el cromosoma tres.

**yw; UASAntp $\Delta$ HHD 6.1 (76):** Esta línea reportera contiene las secuencias UAS fusionadas río arriba de la secuencia que codifica a la proteína Antp con el homeodominio deletado. Esta delección abarca a partir de los aa's 246 al 463, cuya región corresponde el homeodominio, el extremo N-terminal de este, la región del tetrapéptido YPWM y parte de la región central de la homeoproteína. La inserción se encuentra localizada en el tercer cromosoma.

**yw; UASAntp A010-7 (66):** Esta línea reportera contiene la construcción recombinante de Antp con sustitución del tetrapéptido YPWM por un bloque de AAAA (<sup>AAAA</sup>Antp) río abajo de las secuencias UAS. La inserción se encuentra localizada en el tercer cromosoma.

**w<sup>1118</sup>; UAS<sup>YPWM</sup>Antp<sup>WRPW</sup> (174):** Esta línea reportera contiene la secuencia codificante, obtenidas previamente en este trabajo, de Antp wt fusionada al motivo de represión WRPW río abajo de las secuencias UAS. La inserción se encuentra localizada en el cromosoma tres.

**w<sup>1118</sup>; UAS<sup>YPWM</sup>Antp<sup>WRPW</sup> (178):** Esta línea reportera contiene la construcción recombinante de Antp wt fusionada a WRPW río abajo de las secuencias UAS. La inserción se encuentra localizada en el cromosoma tres.

**w<sup>1118</sup>; UAS<sup>YPWM</sup>Antp<sup>WRPW</sup> (180):** Esta línea reportera posee la secuencia nucleotídica de Antp wt fusionada a WRPW río abajo de las secuencias UAS. La inserción se encuentra localizada en el cromosoma tres.

**w<sup>1118</sup>; UAS<sup>AAAA</sup>Antp<sup>WRPW</sup> (184):** Esta línea reportera posee la secuencia codificante a <sup>AAAA</sup>Antp fusionada al motivo de represión WRPW río abajo de las secuencias UAS. La inserción se encuentra localizada en el cromosoma tres.

**w<sup>1118</sup>; UAS<sup>AAAA</sup>Antp<sup>WRPW</sup> (191):** Esta línea reportera contiene la construcción recombinante de <sup>AAAA</sup>Antp fusionada al motivo de represión WRPW río abajo de las secuencias UAS. La inserción se encuentra localizada en el tercer cromosoma.

**w<sup>1118</sup>; UAS<sup>AAAA</sup>Antp<sup>WRPW</sup> (192):** Esta línea reportera contiene la secuencia nucleotídica que codifica a <sup>AAAA</sup>Antp fusionada al motivo de represión WRPW río abajo de las secuencias UAS. La inserción se encuentra localizada en el cromosoma tres.

#### 6.4.2. Sexado y realización de cruzas

Las moscas transgénicas seleccionadas y amplificadas fueron anestesiadas con éter etílico y/o bióxido de carbono, se observaron al estereoscopio y se sexaron en base al dimorfismo sexual. El criterio de sexado se realizó en base a las siguientes características:



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 tres segmentos abdominales fusionados y melanizados, c) la punta del abdomen en las hembras es puntiaguda en contraste con la de los machos que es redondeada y d) los machos presentan los peines sexuales, como una hilera de aproximadamente 10 cerdas cortas y gruesas, de color oscuro y con apariencia de peine, en la región basal del tarso del primer par de patas (Ramos et al., 1993).

La colecta de las hembras vírgenes se realizó poniendo especial atención a que hubiesen eclosionado durante un período no mayor de 8h incubadas a 25°C para evitar la cruce con machos. De las líneas productoras se seleccionaron las hembras vírgenes y los machos fueron seleccionados de las líneas reporteras.

Las cruces de moscas productoras y reporteras se realizaron en la proporción de 3:1 (200 hembras y 60 machos), las cuales se dejaron aparear por lo menos 24h a 25°C y se mantuvieron viables en frascos con comida de puesta (ágar, azúcar, jugo de manzana y ácido propiónico) suplementada con levadura seca activa.

#### 6.4.3. Colecta de embriones de *D. melanogaster*

Para la expresión ectópica de Antp y las mutantes con y sin YPWM fusionadas a WRPW se realizaron cruces genéticas de hembras de la línea productora Hs-GAL4 y machos de las líneas reporteras UASAntp, UASAntp $\Delta$ H $\Delta$ D, UAS<sup>AAAA</sup>Antp, UAS<sup>YPWM</sup>Antp<sup>WRPW</sup> y UAS<sup>AAAA</sup>Antp<sup>WRPW</sup>. Las moscas de la cruce fueron colocadas en matraces de plástico con perforaciones en la base y en los cuellos se colocaron cajas de petri de 15 x 50cm con comida de puesta suplementada con levadura seca activa. Se realizó una precolecta de 1h a 25°C con el propósito de eliminar los huevos que estuviesen en el oviducto para permitir sincronizar la ovoposición.

Posteriormente, las moscas ovopositaron durante 2h en las cajas de puesta y los embriones obtenidos durante este tiempo se dejaron desarrollar hasta alcanzar 6.5h de desarrollo. Las cajas de puesta que contenían los embriones se sellaron con parafilm y se sumergieron a baño maría a 37°C durante 15min.

Pasado el tiempo de choque térmico, los embriones fueron decorionizados cuidadosamente con cloro al 4% durante 3min, se pasaron a una malla a través de un filtro/embudo, se lavaron con abundante agua destilada, se enjuagaron con una solución de Tritón X-100 0.03% / NaCl 0.4% y se enjuagaron nuevamente con agua destilada. Las mallas con los embriones decorionizados se colocaron en cajas petri con papel whatman húmedo y se sellaron nuevamente con parafilm para dejarlos desarrollar 24h hasta el primer estadio larvario (Gibson y Gehring, 1988; Canales del Castillo, 2002).



#### 6.4.4. Preparación de las cutículas embrionarias

Las larvas tratadas con choque térmico se pasaron a tubos eppendorf de 1.5ml con 500µl de heptano y 500µl de metanol absoluto. Éstas se desprendieron de la malla mediante agitación al colocar los tubos en un brazo de rotación durante 5min a 90rpm. Después, ambos solventes fueron retirados, las larvas fueron lavadas cuidadosamente a tres tiempos con 500µl de metanol absoluto durante 10min en el brazo de rotación a 40rpm. En el último lavado se deshechó el metanol y se dejaron secar a temperatura ambiente por 10min. Posteriormente, se agregaron 50µl de solución Hoyer's disuelta en ácido láctico (1:1) usando una puntilla de micropipeta recortada lateralmente y se dejaron reposar durante 16h.

Las larvas embebidas en solución Hoyer's se montaron en portaobjetos colocándoles cubreobjetos y se observaron en un microscopio de contraste de fases (Zeiss Axiostar) para la clasificación de los fenotipos obtenidos (Gibson y Gehring, 1988; Canales del Castillo, 2002).

#### 6.5. Activación del gen blanco *tsh* por *Antp* y sus mutantes

##### 6.5.1. Colecta y fijación de embriones de *D. melanogaster*

La sobreexpresión de *Antp* dirigida por el potenciador *patched* se utilizó para analizar la activación del gen blanco *tsh*, para lo cual se colectaron hembras vírgenes de la línea productora *patched-GAL4* y se cruzaron con machos de las líneas reporteras *UASAntp*, *UAS<sup>AAAA</sup>Antp*, *UAS<sup>YPWM</sup>Antp<sup>WRPW</sup>* y *UAS<sup>AAAA</sup>Antp<sup>WRPW</sup>*. Los embriones producto de estas cruces fueron colectados durante 12h, realizando previamente una pre-colecta de 1h.

Los embriones colectados de 11h30min del desarrollo fueron decorionizados, como se describió anteriormente, y fueron colocados en tubos eppendorf de 1.5ml que contenían 500µl de heptano, 100µl de formaldehído y 400µl de buffer PIPES 0.1M pH 6.9 para su fijación durante 20min en el brazo de rotación a 50rpm. Pasado este tiempo, los embriones fueron devitelinizados, para lo cual se retiraron cuidadosamente las soluciones, procurando no desechar muchos embriones en ese proceso, y a los tubos se les agregaron 500µl de heptano y 500µl de metanol absoluto y se agitaron durante 5min en el brazo de rotación a 50rpm.

Finalmente, los embriones se lavaron al añadirles 500µl de metanol absoluto y se agitaron en el brazo de rotación a 50rpm durante 10min, este paso se realizó mínimo tres veces o hasta que los embriones fácilmente se depositaran en el fondo del tubo eppendorf. Los embriones fijados por este procedimiento se almacenaron a -20°C mínimo una noche antes de ser utilizados, e incluso pueden utilizarse si tienen un máximo de 2 meses.



### 6.5.2. Detección de las proteínas Antp y Tsh en embriones de *D. melanogaster*

Los embriones almacenados en metanol fueron rehidratados reemplazando sucesivamente el metanol con 500µl de diferentes soluciones de metanol/PBS (v/v) al 30%, 50%, 70% y 100%, se agitaron por inversión y se dejaron 5min en cada una de las soluciones. Se eliminaron los sobrenadantes y se permeabilizaron durante 1h usando 500µl de PBT (PBS+Tritón X-100 0.1%) y dejándolos en el brazo de rotación a 50rpm. Pasado ese tiempo, se eliminaron los sobrenadantes y se les añadieron 500µl de PBT+BSA10% preparada al momento, se bloquearon con esta solución durante 1h en el brazo de rotación a 50rpm.

La solución de bloqueo fue retirada, y a los embriones se les colocaron 50µl de anticuerpo primario diluido en PBT+BSA1% preparada al momento de usarse, o el volumen suficiente para cubrirlos, se agitaron con micropipeta y se dejaron incubando durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios utilizados fueron  $\alpha$ -Antp4C3 producido en ratón (Hybridoma Bank, University of Iowa, E.U.A) a una dilución de 1:50 y  $\alpha$ -Tsh producido en conejo (S. Cohen, EMBL Heidelberg, Alemania) a una dilución de 1:250.

Después de 16h de incubación, se retiraron los anticuerpos primarios y los embriones se lavaron rápidamente por inversión con 500µl de PBT y tres lavados de 30min con 500µl PBT en el brazo de rotación a 50rpm. Se eliminaron los sobrenadantes y se les agregaron 20µl de anticuerpos secundarios diluidos en PBT+BSA1% preparada al momento, se agitaron con micropipeta y se incubaron durante 3h a temperatura ambiente. Para  $\alpha$ -Antp4C3 se utilizó el anticuerpo secundario  $\alpha$ -ratón acoplado al fluorocromo FITC (J. Inmmunoresearch, West Grove, Pennslvania, E.U.A.) a una dilución de 1:200 y para  $\alpha$ -Tsh se utilizaron los anticuerpos secundarios  $\alpha$ -conejo acoplado al fluorocromo Alexa 546 (Molcular Probes, Invitrogen, Carlsban, California, E.U.A.) a una dilución de 1:50 ó un  $\alpha$ -conejo acoplado a la enzima fosfatasa alcalina (AP) (Promega, Madison WI, E.U.A.) a una dilución de 1:100. En el caso de los anticuerpos secundarios acoplados a fluorocromos, los tubos eppendorf se protegieron con papel aluminio para evitar la exposición a la luz.

Al término de la incubación con los anticuerpos secundarios se realizaron lavados con 500µl de PBT, uno rápido por inversión y tres de 30min en el brazo de rotación a 50rpm, posteriormente se eliminó el PBT y se dio un lavado rápido con 500µl PBS+Tween 20 0.05%. Particularmente en los embriones donde se utilizó el anticuerpo secundario acoplado a la enzima AP, se retiró el PBS+Tween 20 0.05% y se agregaron 100µl del sustrato 5-Bromo-4-Cloro-3-Indol Fosfato/Tetrazolium Nitro Azul (BCIP/NBT) para obtener la reacción colorimétrica de color azul. Ésta se detuvo al retirar el sustrato y realizando tres lavados por inversión con 500µl PBS+Tween 20 0.05%. A continuación los embriones se deshidrataron, de la misma manera para los tratados con inmunofluorescencia (evitando lo más posible exposición a la luz) como con inmunohistoquímica, eliminando el PBS+Tween 20 0.05% y agregando sucesivamente 500µl de PBS/etanol (v/v) al 30%, 50%, 70% y 100% durante 2min en cada solución



agitando por inversión. Finalmente, se agregaron 60µl de PBS 60% / glicerol 40% a los embriones y se montaron en un portaobjetos colocándoles cubreobjetos. En el caso de los embriones montados en laminillas con señales fluorescentes se protegieron contra la luz protegiéndolos con aluminio (Canales del Castillo, 2005).

La detección de las señales específicas en los embriones, en el caso inmunohistoquímica, se realizó mediante observación con microscopia de luz visible; y en el caso de la inmunofluorescencia se detectó mediante microscopia láser, usando el canal de detección BA510IF y BA550RIF, con 556nm (rojo) y 494nm (verde) de longitud de onda de excitación respectivamente.



## 7. RESULTADOS

### 7.1. Caracterización de los plásmidos pUAST, pUASAntp y Helper 2-3 wc

Para la construcción de los plásmidos recombinantes, que permitieron el análisis de la fusión del motivo represor WRPW en Antp, se inició con la obtención del DNA del plásmido pUAST, mediante el método de minipreparación por lisis alcalina (Birnboim y Doly, 1979). Al mismo tiempo, se prepararon los plásmidos pUASAntp, que se utilizó como testigo positivo en los experimentos, y el Helper 2-3 wc, que es utilizado en la generación de líneas de *Drosophila melanogaster* transgénicas. Los plásmidos fueron caracterizados con las enzimas de restricción diagnósticas *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Sma*I, *Sal*I, debido a que estos vectores poseen dentro de sus secuencias los sitios de corte específicos para las mismas, como se muestra en la figura 16A.

Los geles de agarosa al 0.7% en la figura 16B muestran las digestiones totales de los plásmidos con las enzimas de restricción diagnósticas empleadas. La digestión con la enzima *Bam*HI mostró los fragmentos de 4507 y 2560pb en Helper 2-3wc; de 6735 y 1000pb en pUAST; de 6955, 1800 y 1200pb en pUASAntp. Las digestiones con *Eco*RI permitieron obtener los fragmentos de restricción de 4000 y 2560pb en Helper 2-3 wc, la linearización del plásmido pUAST, y los fragmentos de 7744 y 2213pb en pUASAntp.

Las enzimas *Hind*III y *Sal* I se utilizaron para caracterizar el plásmido Helper 2-3 wc que mostró los fragmentos de 3500, 2838 y 820pb para *Hind* III y los fragmentos 4749 y 1700pb para *Sal*I. Finalmente, la enzima *Sma*I se utilizó para linearizar pUAST y para la obtención de los fragmentos de 6122 y 3833pb en el plásmido pUASAntp. Las digestiones en los tres plásmidos corroboraron la identidad de los mismos para su utilización en las construcciones plasmídicas.

### 7.2. Construcción de los plásmidos recombinantes pUAST<sup>YPWM</sup>Antp<sup>WRPW</sup> y pUAST<sup>AAAA</sup>Antp<sup>WRPW</sup>

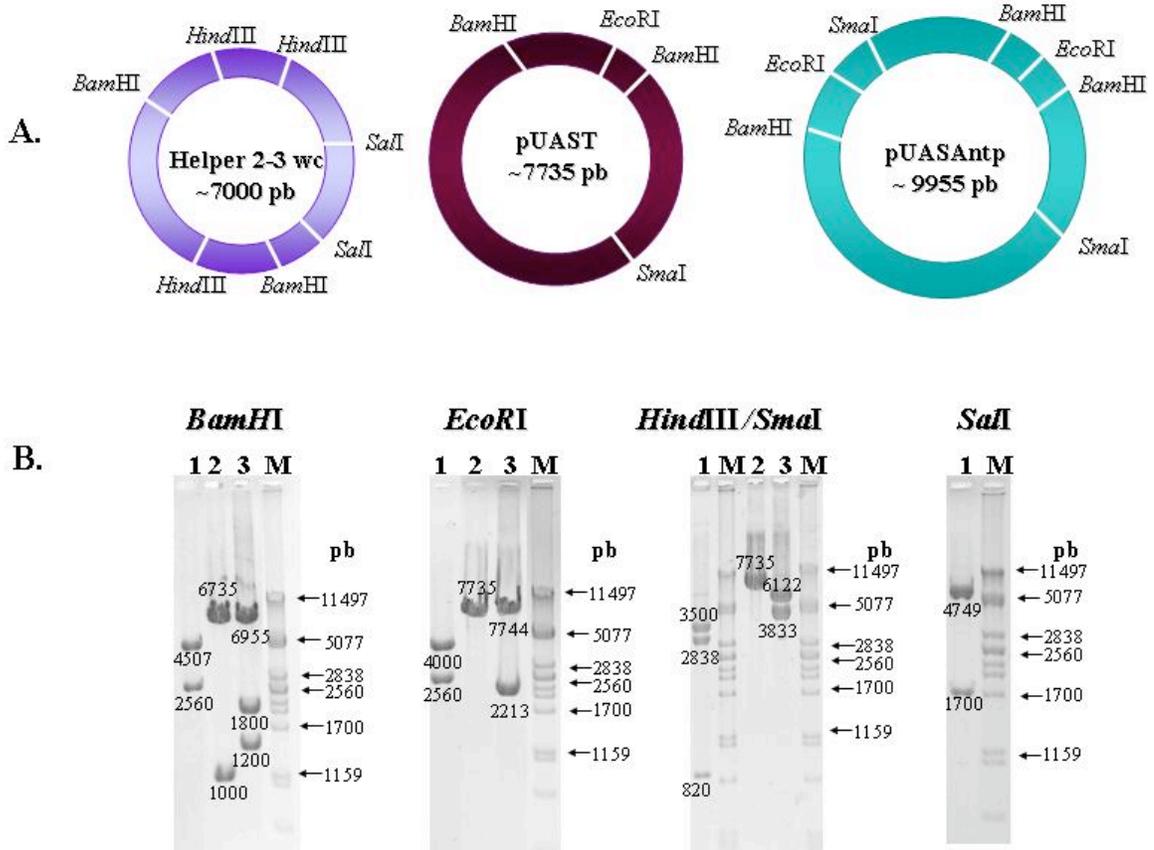
Los vectores plasmídicos pUAST, pUASAntp, pNPac<sup>YPWM</sup>Antp<sup>WRPW</sup> y pNPac<sup>AAAA</sup>Antp<sup>WRPW</sup> fueron preparados a mediana escala por el método de lisis alcalina, para la obtención de los DNA's plasmídicos.

En la Figura 17A se muestra esquemáticamente la linearización del plásmido pUAST de 7735 pb con la enzima *Not*I, la cual corta en el sitio múltiple de clonación. Los plásmidos pNPac<sup>YPWM</sup>Antp<sup>WRPW</sup> y pNPac<sup>AAAA</sup>Antp<sup>WRPW</sup> (Villanueva, 2004), fueron también digeridos con *Not*I liberando los fragmentos de 2232pb, que contienen las secuencias codificantes a <sup>YPWM</sup>Antp<sup>WRPW</sup> y <sup>AAAA</sup>Antp<sup>WRPW</sup>. Como se observa en la figura



17B, estos fragmentos fueron purificados con el Kit Wizard (Promega, Madison WI, E.U.A.) para eliminar la enzima de restricción y favorecer la reacción de ligación.

La figura 17C muestra las ligaciones vector-inserto, del plásmido pUAST realizados con los fragmentos codificantes a  $^{YPWM}Antp^{WRPW}$  y  $^{AAAA}Antp^{WRPW}$  para la construcción de los plásmidos recombinantes. Las ligaciones se transformaron en bacterias *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  Ca $^{++}$  competentes para la obtención de los DNA's plasmídicos de las clonas recombinantes.



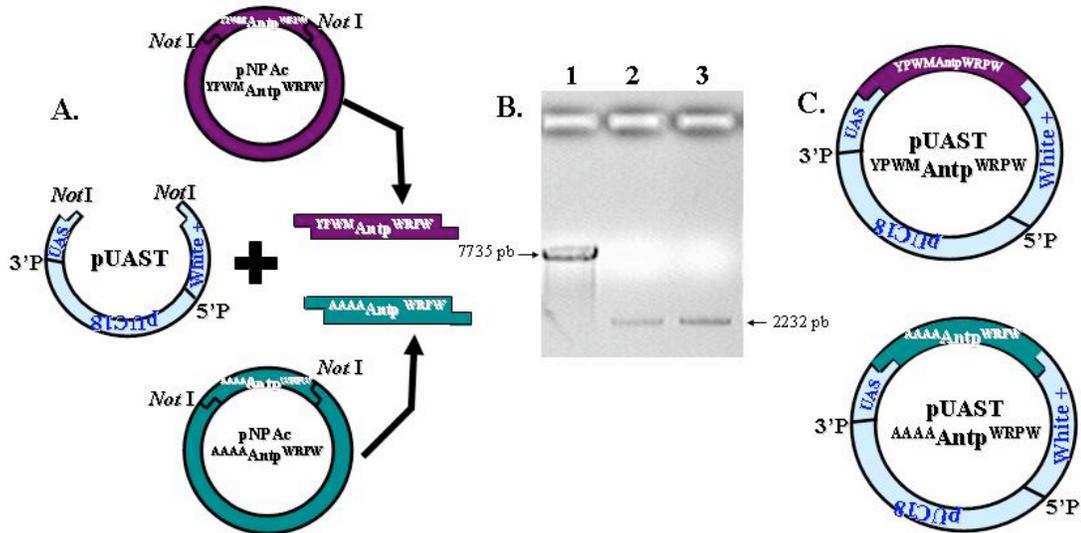
**Figura 16. Obtención y caracterización de los plásmidos pUAST, pUASAntp y Helper 2-3 wc con enzimas de restricción.** **A.** Representaciones esquemáticas de los plásmidos pUASAntp, pUAST, Helper 2-3 wc que muestran los sitios de corte para las enzimas diagnósticas utilizadas en la caracterización. **B.** Geles de agarosa al 0.7% con las digestiones totales de los plásmidos Helper 2-3 wc (carriles 1), pUAST (carriles 2), pUASAntp (carriles 3). El carril M corresponde al marcador de peso molecular  $\lambda+$  *Pst*I.

### 7.3. Caracterización de los plásmidos recombinantes pUAST $^{YPWM}Antp^{WRPW}$ y pUAST $^{AAAA}Antp^{WRPW}$

Para la caracterización de las clonas recombinantes se utilizaron las enzimas de restricción *Bam*HI, *Eco*RI, *Sma*I usando como testigo negativo el plásmido pUAST ya que no posee inserto y como testigo positivo el plásmido pUASAntp. Debido a que las construcciones recombinantes poseen la secuencia a *Antp* unida a las 12pb codificantes a WRPW, la migración de las bandas no mostró alteración en los geles de agarosa al 0.7%



utilizados, por lo que las bandas digeridas correspondieron visualmente a los fragmentos obtenidos en el testigo positivo.



**Figura 17. Construcciones pUAST<sup>YPWM</sup>Antp<sup>WRPW</sup> y pUAST<sup>AAAA</sup>Antp<sup>WRPW</sup>.** A. Representación esquemática de las construcciones pUAST<sup>YPWM</sup>Antp<sup>WRPW</sup>. El vector plasmídico pUAST fue preparado mediante digestión con la enzima de restricción *NotI* que corta en el sitio múltiple de clonación. Este plásmido contiene la secuencia de pUC18 que permite la propagación del plásmido en un sistema bacteriano, los elementos 3'P y 5'P que son sitios de reconocimiento para la proteína transposasa, el gen *white+* que es un marcador fenotípico de ojos rojos para las moscas transgénicas de *D. melanogaster* y los sitios de unión para la proteína transactivadora GAL4 (UAS). Las secuencias codificantes para los insertos YPWM Antp<sup>WRPW</sup> y AAAA Antp<sup>WRPW</sup> fueron obtenidas mediante corte con la enzima de restricción *NotI* de los plásmidos pNPAc<sup>YPWM</sup>Antp<sup>WRPW</sup> y pNPAc<sup>AAAA</sup>Antp<sup>WRPW</sup>. B. El gel de agarosa de 0.7% muestra el fragmento purificado usando el Kit Wizard Promega del vector pUAST linearizado con la enzima de restricción *NotI* (carril 1), y los fragmentos de los insertos YPWM Antp<sup>WRPW</sup> y AAAA Antp<sup>WRPW</sup> de 2232pb (carriles 2 y 3). C. Las ligaciones vector-inserto permitieron la construcción de los nuevos plásmidos pUAST<sup>YPWM</sup>Antp<sup>WRPW</sup> y pUAST<sup>AAAA</sup>Antp<sup>WRPW</sup>.

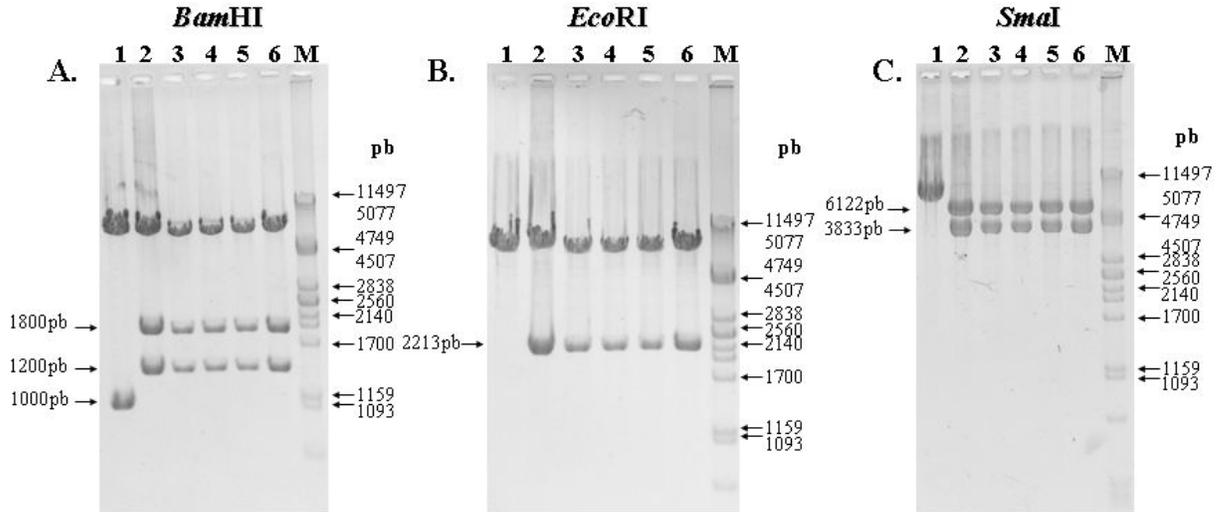
La Figura 18A muestra la digestión con la enzima de restricción *BamHI* donde las clonas recombinantes YPWM Antp<sup>WRPW</sup> y AAAA Antp<sup>WRPW</sup> (carriles 3-6), poseen un sitio de reconocimiento adicional para *BamHI* que permitió liberar los fragmentos de 1800 y 1200pb de la misma manera que el testigo positivo pUASAntp (carril 2). El testigo negativo pUAST solamente liberó un fragmento de 1000pb (carril 1).

Los DNA's plasmídicos digeridos con la enzima de restricción *EcoRI* (Figura 18B) mostraron la liberación de los fragmentos de 2213pb en los plásmidos recombinantes (carriles 3-6) y en el testigo positivo pUASAntp (carril 2). La liberación del fragmento 2213pb demuestra la presencia del inserto codificante a Antp<sup>WRPW</sup>; mientras que el testigo negativo muestra la linealización del plásmido pUAST (carril1).

La Figura 18C muestra los plásmidos recombinantes digeridos con la enzima de restricción *SmaI* que corroboraron la presencia de los insertos codificantes a YPWM Antp<sup>WRPW</sup> y AAAA Antp<sup>WRPW</sup> debido a la presencia de las bandas de 6122 y 3833pb



(carriles 3-6) de manera similar al testigo positivo pUASAntp (carril 2) mientras que el testigo negativo pUAST solo fue linearizado debido a que no posee el inserto (carril 1).



**Figura 18. Caracterización de los plásmidos recombinantes pUAST<sup>YPWM</sup>Antp<sup>WRPW</sup> y pUAST<sup>AAAA</sup>Antp<sup>WRPW</sup> con enzimas de restricción.** Los geles de agarosa al 0.7% muestran las digestiones totales de los DNA's plasmídicos pUAST (carriles 1), pUASAntp (carriles 2), pUAST<sup>YPWM</sup>Antp<sup>WRPW</sup> (carriles 3 y 4) y pUAST<sup>AAAA</sup>Antp<sup>WRPW</sup> (carriles 5 y 6) y el carril M es el marcador de peso molecular  $\lambda$  digerido con *Pst*I. **A.** La digestión de los plásmidos con la enzima de restricción *Bam*HI muestra la presencia de la secuencia codificante a Antp<sup>WRPW</sup> en las bandas de 1800 y 1200pb que no se observan en el testigo (-) pUAST sin inserto que solo libera la banda de 1000 pb. **B.** La digestión con la enzima *Eco*RI muestra la banda de 2213pb que corresponde a la secuencia de Antp<sup>WRPW</sup>. **C.** La caracterización con la enzima *Sma*I corrobora la presencia del inserto Antp<sup>WRPW</sup> en la banda de 3830pb misma que aparece en el testigo (+) y desaparece en el testigo debido a que lo lineariza (-).

## 7.4. Generación de las moscas transgénicas con los plásmidos recombinantes

### 7.4.1. Purificación de los DNA's recombinantes por columnas de Qiagen

Una vez caracterizados los plásmidos recombinantes y el plásmido Helper 2-3 wc, éstos fueron purificados mediante preparación a mediana escala usando columnas de Qiagen (Qiagen® Plasmid Handbook) como se describe en materiales y métodos. Los plásmidos fueron cuantificados en concentración y pureza mediante absorbancia con luz ultravioleta a 260 y 280nm, como se muestra en la Tabla VI. La concentración de los DNA's purificados varió de 0.6 a 3.9 $\mu$ g/ $\mu$ l y la relación de Abs260/280 de los plásmidos fue de 1.74 a 1.81, lo que indica que éstos plásmidos poseen una buena calidad para ser microinyectados en los embriones de *D. melanogaster* en la generación de las moscas transgénicas.

### 7.4.2. Microinyección de los plásmidos recombinantes en *D. melanogaster*

Las construcciones pUAST<sup>YPWM</sup>Antp<sup>WRPW</sup> y pUAST<sup>AAAA</sup>Antp<sup>WRPW</sup> en conjunto con el plásmido Helper 2-3 wc fueron microinyectados en embriones de estadios tempranos de la línea w<sup>1118</sup>. Las secuencias codificantes a Antp<sup>WRPW</sup> se insertan al azar en



uno de los cuatro cromosomas en *D. melanogaster* usando los elementos P que son sitio de reconocimiento para la proteína transposasa.

**Tabla VI. DNA's purificados en columnas de Qiagen**

	pUAST <sup>YPWM</sup> Antp <sup>WRPW</sup>	pUAST <sup>AAAA</sup> Antp <sup>WRPW</sup>	Helper 2-3 wc
<b>Abs 260 nm</b>	0.123	0.782	0.197
<b>Abs 280 nm</b>	0.068	0.431	0.113
<b>[<math>\mu\text{g}/\mu\text{l}</math>]</b>	0.6	3.9	1
<b>260/280</b>	1.80	1.814	1.74

Debido a que el microinyector FemtoJet®, Eppendorf en nuestro laboratorio presentó problemas técnicos que impedían regular la presión de microinyección en los embriones, se enviaron los plásmidos recombinantes pUAST<sup>YPWM</sup>Antp<sup>WRPW</sup> y pUAST<sup>AAAA</sup>Antp<sup>WRPW</sup> a la compañía BestGene Inc. (Chino Hills, California, E.U.A.) para la obtención de las moscas *D. melanogaster* transgénicas.

**Tabla VII. Líneas transgénicas de *D. melanogaster* obtenidas mediante microinyección**

<b>Línea transgénica</b>	<b>Transgene</b>	<b>Inserción en el Cromosoma</b>
173	UAS <sup>YPWM</sup> Antp <sup>WRPW</sup>	2
174	UAS <sup>YPWM</sup> Antp <sup>WRPW</sup>	3
175	UAS <sup>YPWM</sup> Antp <sup>WRPW</sup>	3
176	UAS <sup>YPWM</sup> Antp <sup>WRPW</sup>	2
177	UAS <sup>YPWM</sup> Antp <sup>WRPW</sup>	2
178	UAS <sup>YPWM</sup> Antp <sup>WRPW</sup>	3
179	UAS <sup>YPWM</sup> Antp <sup>WRPW</sup>	2
180	UAS <sup>YPWM</sup> Antp <sup>WRPW</sup>	3
181	UAS <sup>YPWM</sup> Antp <sup>WRPW</sup>	3
182	UAS <sup>YPWM</sup> Antp <sup>WRPW</sup>	3
183	UAS <sup>AAAA</sup> Antp <sup>WRPW</sup>	3
184	UAS <sup>AAAA</sup> Antp <sup>WRPW</sup>	3
185	UAS <sup>AAAA</sup> Antp <sup>WRPW</sup>	2
186	UAS <sup>AAAA</sup> Antp <sup>WRPW</sup>	2
187	UAS <sup>AAAA</sup> Antp <sup>WRPW</sup>	2
188	UAS <sup>AAAA</sup> Antp <sup>WRPW</sup>	3
189	UAS <sup>AAAA</sup> Antp <sup>WRPW</sup>	X
190	UAS <sup>AAAA</sup> Antp <sup>WRPW</sup>	2
191	UAS <sup>AAAA</sup> Antp <sup>WRPW</sup>	3
192	UAS <sup>AAAA</sup> Antp <sup>WRPW</sup>	3

La Tabla VII muestra que de cada construcción se obtuvieron 10 líneas de moscas transgénicas diferentes, las cuales fueron numeradas de acuerdo al stock general de la

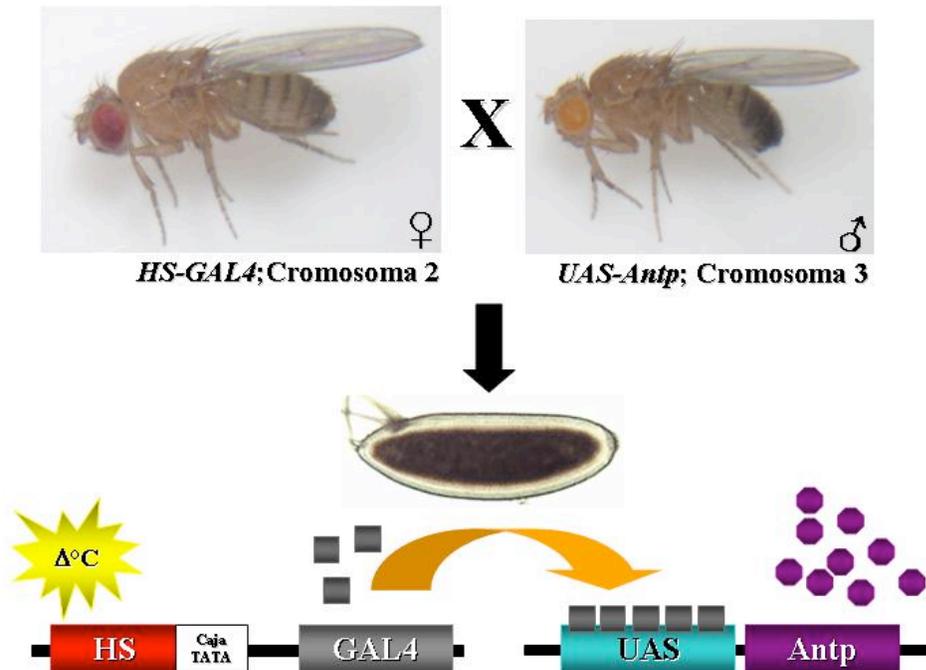


Unidad de Biología del Desarrollo (UBD). Las inserciones se encontraron predominantemente en los cromosoma 2 y 3; con la excepción en la línea 189 que presentó la inserción de <sup>AAAA</sup>Antp<sup>WRPW</sup> en el cromosoma X. Estos resultados muestra la baja probabilidad de que ocurran inserciones en este cromosoma debido a que presenta un tamaño reducido.

Las líneas transgénicas para los análisis funcionales fueron seleccionadas con la inserción en el cromosoma 3, debido a que los esquemas de cruza genéticas se realizaron con líneas transgénicas de *D. melanogaster* que poseen la inserción en el cromosoma 2. En el caso de las líneas que contienen en <sup>YPWM</sup>Antp<sup>WRPW</sup> se seleccionaron las líneas 174, 178 y 180; las líneas seleccionadas para <sup>AAAA</sup>Antp<sup>WRPW</sup> fueron las líneas 184, 191 y 192.

### 7.5. Expresión ectópica de Antp fusionada a WRPW

Para determinar el efecto de la presencia del motivo represor WRPW sobre la actividad funcional de la homeoproteína Antp con y sin el tetrapéptido YPWM se utilizó el esquema de cruce genética descrito en la Figura 19. A los embriones producto de la cruce HS-GAL4/UAS-Antp se les proporcionó un choque térmico de 37°C durante 15min. Al activar la proteína transactivadora GAL4 con el choque térmico, ésta permite la sobreexpresión de la homeoproteína de interés (Antp) en todos los tejidos del embrión de *D. melanogaster*.



**Figura 19. Cruza genética en líneas de *D. melanogaster* mutantes para la integración de dos transgenes.** El gen de levadura GAL4, que codifica para una proteína transactivadora, presente en el cromosoma 2 de *D. melanogaster*, es regulado a través de un promotor de choque térmico (HS). Las líneas de moscas que expresan GAL4 fueron cruzadas con líneas que contienen cinco sitios de unión específicos de GAL4 (UAS), los cuales se encuentran unidos río abajo de su secuencia a la proteína que expresa Antp (en el cromosoma 3). Los embriones producto de la cruce que poseen en su genoma ambos transgenes son inducidos por un choque térmico para la expresión ectópica de Antp.



Se ha demostrado previamente que la actividad funcional de Antp mediante la expresión ectópica a las 6.5h del desarrollo produce tres diferentes efectos: a) pérdida de la involución de la cabeza, b) aparición de dentículas ectópicas en el dorso de la cabeza y c) la transformación homeótica del primer segmento torácico T1 por el segundo T2 (Canales del Castillo, 2002; Gibson y Gehring, 1988).

Las larvas que sobreexpresaron la mutante  $^{YPWM}Antp^{WRPW}$  en dos cruza independientes con HS-GAL4 (líneas 174 y 178) mostraron en los dos casos efectos fenotípicos severos. La activación ectópica de Antp fusionada al motivo de represión WRPW mostró que la involución de la cabeza se bloqueo drásticamente; el segmento T1 se transformó completamente a T2 y aparecieron dentículas en el dorso de la cabeza, como se muestra en las figuras 20D y E. La línea mutante de  $^{YPWM}Antp^{WRPW}$  (línea 180) mostró un efecto fenotípico similar al testigo positivo Antp, es decir, mostró una pérdida de involución de la cabeza y transformación de T1 por T2 de forma intermedia en ambos casos y además no presentó la aparición de dentículas ectópicas (Figuras 20B y F).

Las líneas que expresaron ectópicamente la proteína mutante  $^{AAAA}Antp^{WRPW}$  (184, 191 y 192) mostraron un efecto similar que el testigo positivo, es decir, un fenotipo intermedio (Figuras 20G, H e I). Las proteínas mutantes  $^{AAAA}Antp$  y Antp $\Delta$ HHD sobreexpresadas, no causaron ningún efecto en el desarrollo embrionario mostrando el fenotipo normal, como se esperaba (figura 20A y C).

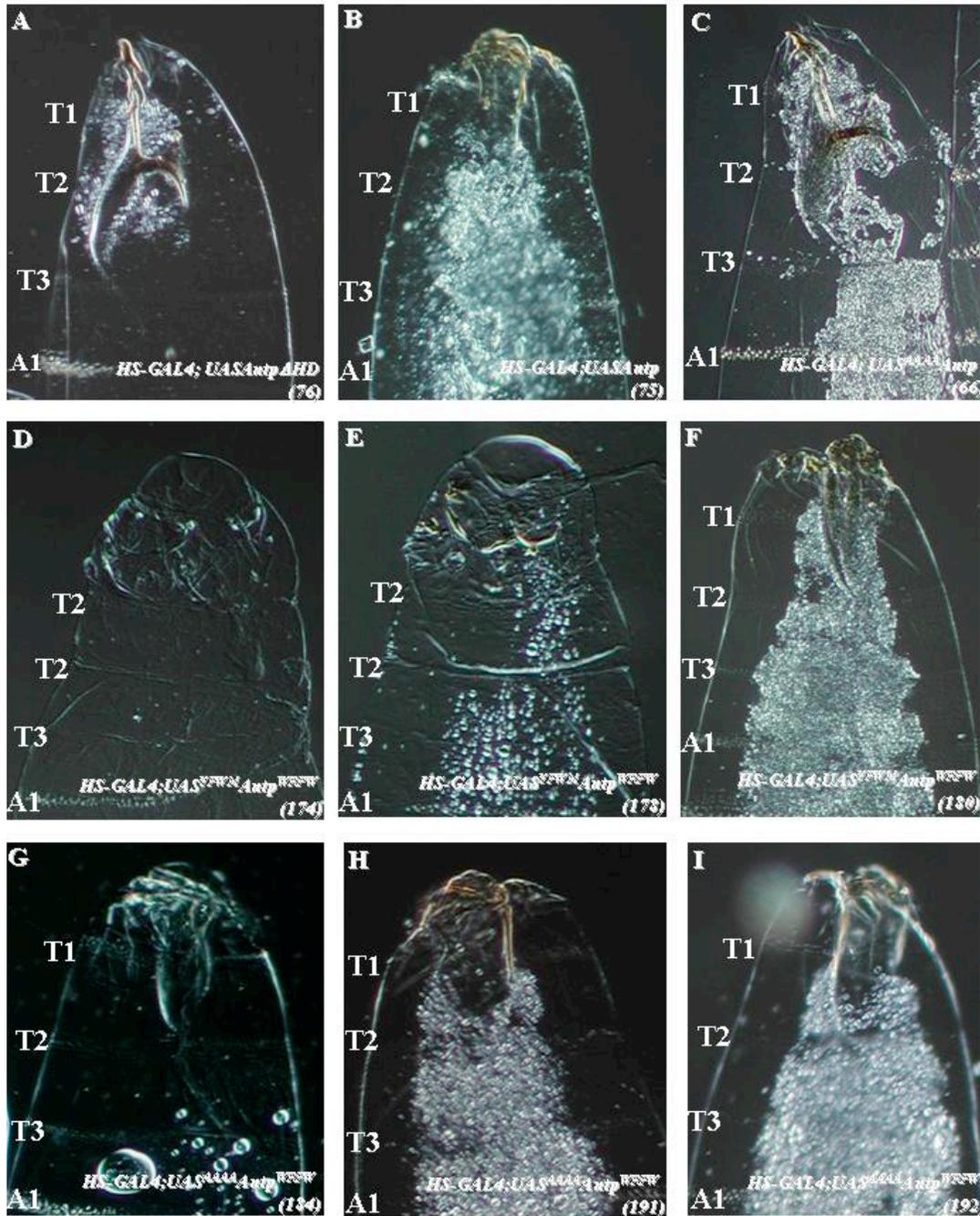
En la Tabla VIII se muestra, en resumen, los resultados obtenidos en las observaciones microscópicas de un máximo de 481 cutículas embrionarias, las cuales fueron clasificadas básicamente en tres fenotipos: el normal, el intermedio y el severo dependiendo del grado de efecto inducido por la expresión ectópica de Antp y sus mutantes.

## 7.6. Activación del gen blanco *teashirt* por Antp

### 7.6.1. Expresión endógena y ectópica de Antp inducida por el potenciador *patched*

Los embriones de *D. melanogaster* muestran la expresión endógena de la homeoproteína Antp en los parasegmentos (ps) del 3-5 y a lo largo del cordón nervioso del Sistema Nervioso Central como se esperaba usando el anticuerpo anti-Antp 4C3 (Figura 22A).

La inducción ectópica de Antp se realizó utilizando el sistema binario *patched*-GAL4/UAS-Antp, en una cruce genética que permitió integrar los dos transgenes en la descendencia (Figura 21). El potenciador *patched* (*ptc*) dirige la expresión de Antp constitutivamente, desde etapas tempranas del desarrollo, en la región anterior de todos los parasegmentos. En la figura 22B se muestra un embrión del estadio 14 en vista lateral, que muestra la sobreexpresión de la homeoproteína Antp dirigida por *ptc*.



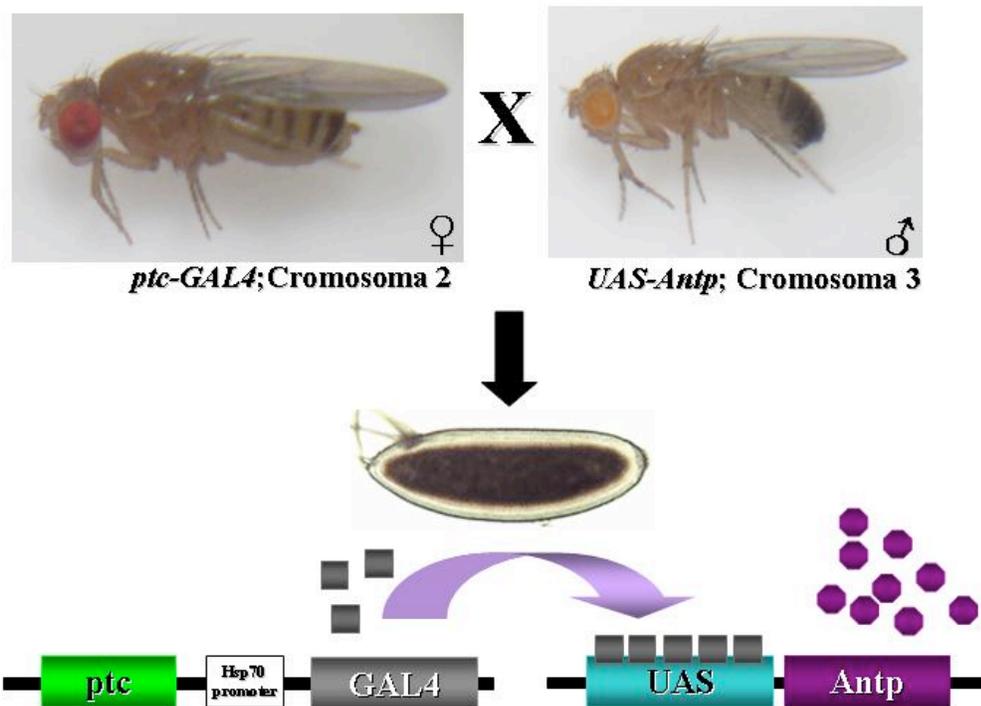
**Figura 20. Efecto de la expresión ectópica de Antp y sus mutantes en el desarrollo embrionario de *D. melanogaster*.** La homeoproteína Antennapedia y sus mutantes en YPWM fueron sobreexpresadas usando el promotor de choque térmico y las cutículas fueron clasificadas de acuerdo a la descripción de Gibson y Gehring en 1988. **A.** El testigo negativo que expresa la proteína Antp $\Delta$ HD presenta involución de la cabeza normal y T1 conserva su identidad. **B.** El testigo positivo Antp produce bloqueo de la involución de la cabeza a nivel intermedio, y T1 presenta, así mismo, transformación intermedia a T2. **C.** La mutante <sup>AAAA</sup>Antp no produce ningún efecto en la involución de la cabeza. **D. y E.** La expresión de <sup>YPWM</sup>Antp<sup>WRPW</sup> (en las líneas 174 y 178), causó bloqueo en la involución de la cabeza severo provocando que desaparecieran por completo las estructuras bucales así como la transformación completa de T1 por T2. **F.** La línea 180, de esta misma mutante, produce un fenotipo como el de Antp. **G.-I.** La expresión de <sup>AAAA</sup>Antp<sup>WRPW</sup> en todas las líneas analizadas produce un efecto similar que el de Antp con bloqueo de la involución de la cabeza intermedio y también una transformación intermedia de T1 por T2 (Fotografías tomadas en campo oscuro, a 10X).



**Tabla VIII. Efecto de la expresión ectópica de Antp y sus mutantes en las líneas transgénicas de *D. melanogaster***

Transgene	Inhibición de la involución de la cabeza (*)	Dentículas ectópicas en el dorso de la cabeza	Transformación de T1 a T2 (*)	Larvas observadas
Antp $\Delta$ HD (76)	-	Ausente	-	133
<sup>YPWM</sup> Antp (75)	+	Ausente	+	367
<sup>AAAA</sup> Antp (66)	-	Ausente	-	75
<sup>YPWM</sup> Antp <sup>WRPW</sup> (174)	++	Presentes	++	147
<sup>YPWM</sup> Antp <sup>WRPW</sup> (178)	++	Presentes	++	334
<sup>YPWM</sup> Antp <sup>WRPW</sup> (180)	+	Ausente	+	481
<sup>AAAA</sup> Antp <sup>WRPW</sup> (184)	+	Ausente	+	355
<sup>AAAA</sup> Antp <sup>WRPW</sup> (191)	+	Ausente	+	348
<sup>AAAA</sup> Antp <sup>WRPW</sup> (192)	+	Ausente	+	292

(\*) Los símbolos corresponden a (-) fenotipo normal, (+) fenotipo intermedio y (++) fenotipo severo con bloqueo de involución de la cabeza y transformación completa de T1 a T2.



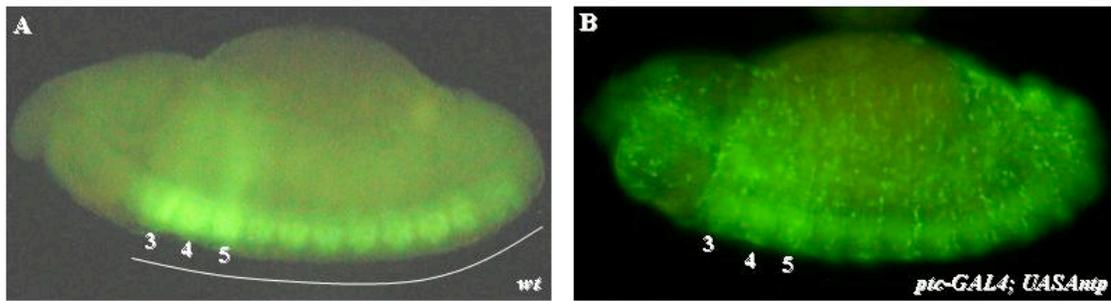
**Figura 21. Inducción ectópica de Antp dirigida por el potenciador *ptc*.** Hembras vírgenes que contiene en el cromosoma dos la secuencia del potenciador *patched* (*ptc*) unido a la secuencia de la proteína transactivadora GAL4, fueron cruzadas con machos de las líneas que tienen el transgen UAS unido a Antp en el cromosoma tres. La progenie producto de esta cruce tiene los dos transgenes en su genoma, lo cual permitió la expresión ectópica de Antp dirigida por el potenciador *ptc*



### 7.6.2. Activación de *tsh* con las mutantes $^{YPWM}Antp^{WRPW}$ y $^{AAAA}Antp^{WRPW}$

Una vez que se corroboró la activación ectópica de Antp usando el potenciador *ptc*, se realizaron las cruza genéticas con las líneas de *D. melanogaster* conteniendo las proteínas mutantes  $^{YPWM}Antp^{WRPW}$  y  $^{AAAA}Antp^{WRPW}$  así como el testigo negativo  $^{AAAA}Antp$ . Para los ensayos, se colectaron embriones en el estadio 14 del desarrollo producto de las cruza con las líneas mutantes seleccionadas 174 y 178 para la proteína que tiene el tetrapéptido YPWM y WRPW; así como las líneas 184 y 191 para la mutante con sustitución por AAAA y fusionada a WRPW.

El gen *teashirt* (*tsh*) es activado por las proteínas homeóticas, en particular por Ultrabithorax (Ubx) y Antp. En nuestro laboratorio se demostró que Antp es capaz de activar este gen blanco en la región de la cabeza del embrión usando el potenciador *ptc* (Canales del Castillo, 2005). Debido a lo anterior, seleccionamos este gen blanco para determinar el efecto de la presencia del motivo WRPW en Antp en la activación de *tsh*.



**Figura 22. Expresión endógena y ectópica de Antp en embriones de *D. melanogaster*.** La inmunodetección de  $^{YPWM}Antp$  se realizó en embriones del estadio 14 tratados con un anticuerpo producido en ratón contra Antp y un anticuerpo secundario contra ratón acoplado al fluorocromo FITC (coloración verde). **A.** La expresión endógena de Antp se encuentra localizada en los parasegmentos (ps) 3 al 5 y a lo largo del cordón nervioso del embrión (indicado con una línea). **B.** El potenciador *patched* (*ptc*) dirige la expresión ectópica de Antp en las regiones anteriores de todos los parasegmentos en el embrión, en la imagen se indican los ps de la expresión endógena (Embriones en vista lateral, a 10X).

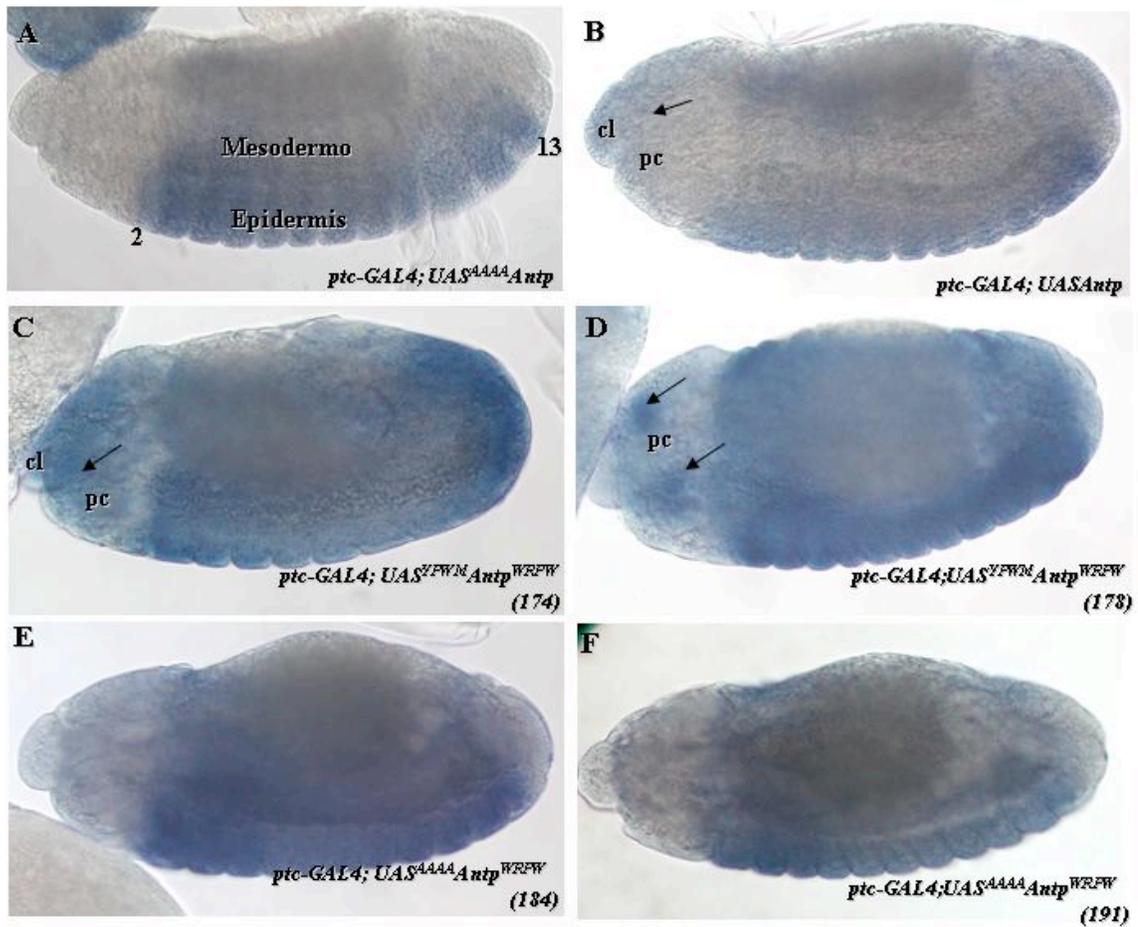
Para lograr esto, se realizó la detección de Tsh mediante inmunohistoquímica en los embriones producto de las cruza usando un anticuerpo dirigido contra la proteína Tsh. La proteína Tsh endógena se encuentra localizada en los embriones de *D. melanogaster* tanto en epidermis como en mesodermo en los ps 2 al 13.

Los embriones que expresan la proteína ectópica  $^{YPWM}Antp^{WRPW}$  (línea 174), mostraron la activación de Tsh con mayor intensidad en la región de la cabeza, tanto en el clypeolabrum (cl) como en toda la región del procephalon (pc), como se muestra en la Figura 23C. La activación de Tsh para esta misma mutante (línea 178) muestra la expresión confinada en dos parches en la región del pc (Figura 23D). Los embriones que expresan ectópicamente  $^{AAAA}Antp$ , (el testigo negativo) presentan la expresión endógena de Tsh (Figura 23A), en cambio los que expresan el testigo positivo Antp, además de la expresión endógena presentan una ganancia de función en el cl y en la parte anterior del pc (Figura 23B).



Por otro lado, para evaluar si el motivo WRPW podría recuperar la actividad de la proteína en la mutante <sup>AAAA</sup>Antp, se detectó igualmente Tsh en embriones que sobre-expresaban <sup>AAAA</sup>Antp<sup>WRPW</sup>. Los resultados mostraron preferencialmente la detección de Tsh endógena y no se visualizó la activación de este gen blanco en las regiones anteriores de la cabeza, (Figura 23E y F).

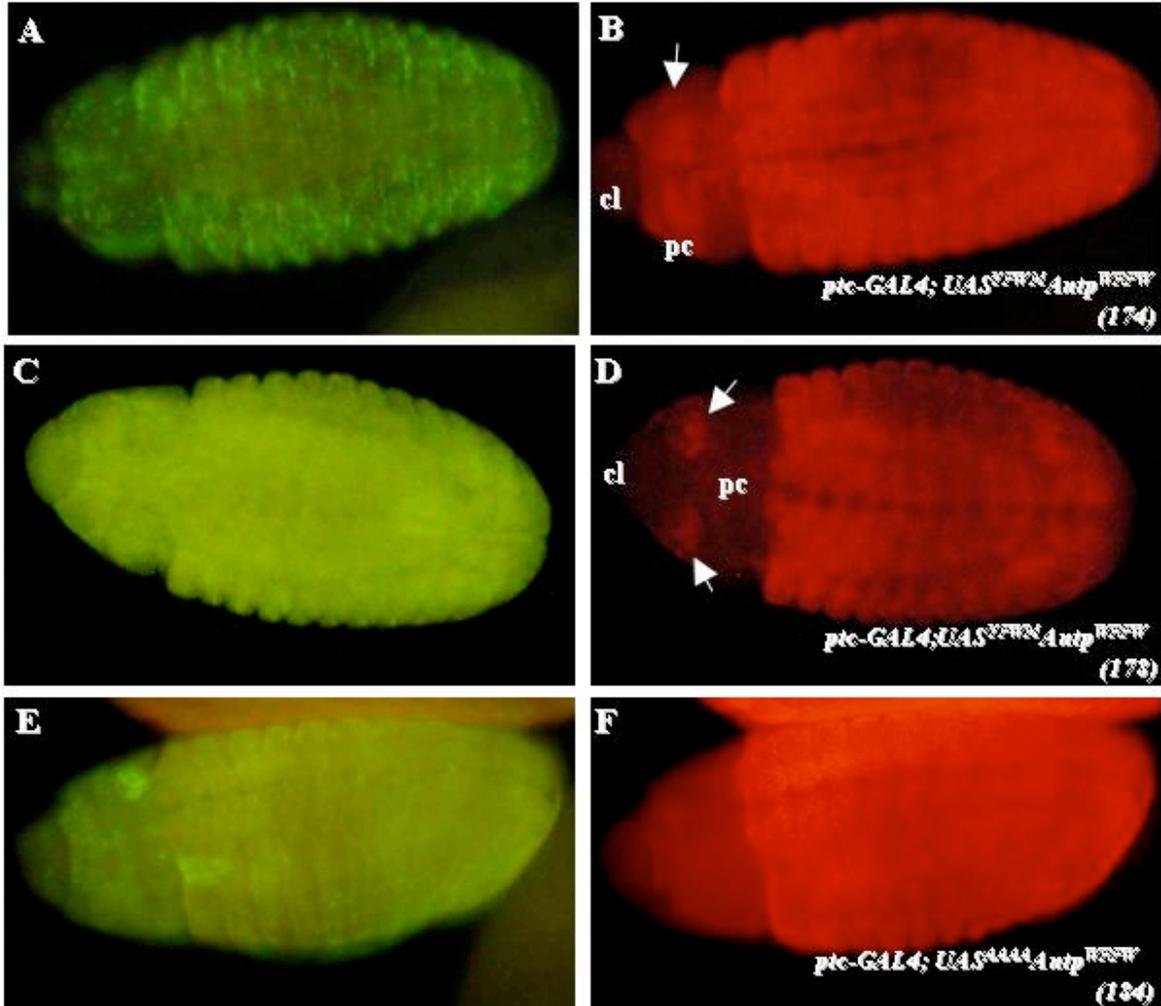
Para corroborar que realmente se estaban expresando ectópicamente las homeoproteínas <sup>YPWM</sup>Antp<sup>WRPW</sup> y de <sup>AAAA</sup>Antp<sup>WRPW</sup> se realizó una inmunofluorescencia doble para detectar simultáneamente Antp y la proteína Tsh usando los anticuerpos secundarios acoplados a los fluorocromos FITC y Alexa 546. Como se puede observar en las Figuras 24A, C y E los embriones expresaron ectópicamente las diferentes Antp mutantes. Al analizar la activación de la proteína Tsh en los mismos embriones corroboramos que la mutante <sup>YPWM</sup>Antp<sup>WRPW</sup> (línea 174) muestra la activación de Tsh en la parte anterior del cl y en todo el pc (Figura 24B). Así mismo, la línea 178 de esta misma mutante, mostró la activación de Tsh localizada en dos parches en la región del pc (Figura 24D). Por otro lado, la mutante <sup>AAAA</sup>Antp<sup>WRPW</sup> aunque muestra la expresión ectópica de <sup>AAAA</sup>Antp<sup>WRPW</sup> en la región anterior de la cabeza no logró activar Tsh en esta región (Figura 24F).



**Figura 23. Efecto de la sobreexpresión de Antp y las mutantes fusionadas a WRPW sobre el gen blanco *tsh*.** La homeoproteína Antp y sus mutantes fusionadas a WRPW con y sin YPWM fueron expresadas ectópicamente usando el potenciador *ptc*-GAL4 en embriones de *D. melanogaster* en el estadio



14. Los embriones fueron incubados con el anticuerpo contra Tsh y un anticuerpo secundario acoplado a fosfatasa alcalina para detectar la expresión de la proteína Tsh. **A.** La expresión ectópica de la mutante <sup>AAAA</sup>Antp no activa Tsh en la región anterior, mostrando solo la expresión endógena de Tsh que esta localizada en la epidermis y mesodermo de los parasegmentos 2 al 13 del embrión. **B.** La sobreexpresión de Antp activa a Tsh en la región de clypeolabrum (cl), y la parte anterior del procephalon (pc) como se indica con la flecha. **C.** La expresión ectópica de la mutante <sup>YPWM</sup>Antp<sup>WRPW</sup> (línea 174) dirige la expresión de Tsh en el cl y en toda la región del pc. **D.** La activación de Tsh en la línea 178 muestra expresión en el pc en dos parches indicados con flechas. **E y F** La expresión de <sup>AAAA</sup>Antp<sup>WRPW</sup> en las dos líneas 184 y 191 muestran que esta mutante no fue capaz de activar la proteína Tsh en la región anterior de la cabeza (Embriones en vista lateral, a 20X).



**Figura 24. Activación ectópica de Tsh por las mutantes <sup>YPWM</sup>Antp<sup>WRPW</sup> y <sup>AAAA</sup>Antp<sup>WRPW</sup>.** Embriones de *D. melanogaster* del estadio 14 fueron analizados mediante la técnica de inmunofluorescencia para la detección simultánea de la homeoproteína Antp (verde; FITC) y la proteína Tsh (rojo; Alexa). **A.** La sobreexpresión de <sup>YPWM</sup>Antp<sup>WRPW</sup> (línea 174) permitió **B** la activación de Tsh en la parte anterior de cl y en la región de pc **C.** En la línea 178 la sobre-expresión de esta misma mutante activó **D** a Tsh en dos parches en el pc, señalados con flechas. **E.** A pesar de que <sup>AAAA</sup>Antp<sup>WRPW</sup> se expresa ectópicamente en la cabeza del embrión **F**, ésta mutante no fue capaz de dirigir a Tsh en regiones más anteriores del embrión (Embriones en vista ventral, 10X).



## 8. DISCUSIÓN

El objetivo de esta tesis consistió en determinar el efecto de la presencia del motivo WRPW en la actividad funcional de la homeoproteína Antennapedia normal y mutante en el tetrapéptido YPWM durante el desarrollo del primer estadio larvario y en la activación del gen blanco *teashirt* en *D. melanogaster*. Para llevar a cabo este objetivo, se realizó la subclonación de las secuencias codificantes a <sup>YPWM</sup>Antp<sup>WRPW</sup> y la mutante <sup>AAAA</sup>Antp<sup>WRPW</sup> en el vector plasmídico pUAST y plásmidos recombinantes obtenidos fueron microinyectados para la generación de moscas transgénicas que fueron posteriormente cruzadas, utilizando el sistema de regulación de UAS/GAL4 para dirigir ectópicamente las proteínas Antp y sus mutantes. El análisis funcional de Antp y sus mutantes quiméricas fue determinado en la transformación homeótica y en la activación del gen blanco *tsh*.

La fusión del motivo WRPW en Antp se realizó en el plásmido linearizado pUAST, ya que ha sido uno de los más utilizados en la generación de moscas transgénicas (Li et al., 1999; Tour et al., 2005) por la versatilidad de su uso en el sistema binario UAS-GAL4 que dirige la expresión específica de tejido en *D. melanogaster*. Los fragmentos de 2232pb que codifican a las proteínas quiméricas <sup>YPWM</sup>Antp<sup>WRPW</sup> y <sup>AAAA</sup>Antp<sup>WRPW</sup> fueron obtenidos de los plásmidos pNPac<sup>YPWM</sup>Antp<sup>WRPW</sup> y pNPac<sup>AAAA</sup>Antp<sup>WRPW</sup> previamente construidos en nuestro laboratorio (Villanueva, 2004). La transformación en bacterias *Escherichia coli* DH5α Ca<sup>++</sup> competentes con las ligaciones mostró dos clonas positivas para cada plásmido recombinante que fueron caracterizadas con las enzimas de restricción *Bam*HI, *Eco*RI y *Sma*I. La caracterización de los fragmentos obtenidos fue similar a los visualizados con las digestiones del testigo positivo (plásmido pUASAntp) debido a que la secuencia fusionada del motivo WRPW corresponde a 12pb por lo que su presencia no modifica la migración de los fragmentos en los geles utilizados. Estos resultados confirmaron la integración de los insertos <sup>YPWM</sup>Antp<sup>WRPW</sup> y <sup>AAAA</sup>Antp<sup>WRPW</sup> en los plásmidos recombinantes en los que la fusión de las secuencias nucleotídicas habían sido verificadas previamente mediante secuenciación en los plásmidos precursores (Villanueva, 2004).

Los DNA's de los plásmidos recombinantes, así como el plásmido Helper 2-3 wc fueron purificados mediante el uso del Kit de Qiagen; debido a que la microinyección requiere la eliminación de las toxinas producidas por las bacterias *E. coli* en los DNA's a microinyectar. El plásmido Helper 2-3 wc codifica a la transposasa que permite que las secuencias codificantes a las proteínas <sup>YPWM</sup>Antp<sup>WRPW</sup> y <sup>AAAA</sup>Antp<sup>WRPW</sup> sean integradas en el DNA genómico de los embriones de *D. melanogaster* (Spradling et al., 1982). Las preparaciones de los DNA's analizadas mediante absorbancia con luz ultravioleta a 260/280nm mostraron que en todos los casos eran mayores de 1.74, lo que indicó que presentaban buena pureza para la realización de la microinyección.



Realizamos en nuestro laboratorio ensayos preliminares de microinyección para la obtención de moscas transgénicas con las secuencias de Antp purificadas, desafortunadamente el microinyector presentó problemas técnicos que impidieron tener resultados satisfactorios debido a que la presión de la microinyección no logró ser regulada y esto provocó la muerte de los embriones. Debido a esto, los DNA's recombinantes purificados fueron enviados microinyectar a la compañía BestGene Inc. (Chino Hills, California, E.U.A.) para la generación de *D. melanogaster* transgénicas. La microinyección se realizó dos veces debido a la baja sobrevivencia en los embriones, aún y cuando se repurificaron con el Kit de Qiagen. En ensayos previos de microinyección con Antp así como en la purificación de proteínas por cromatografía de afinidad; se observó toxicidad atribuida a esta homeoproteína, ya que al expresarse produce la alteración del metabolismo provocando la muerte celular (Cárdenas, 2007). El problema de toxicidad se resolvió disminuyendo la concentración de los DNA's a microinyectar a 0.2µg/µl, obteniéndose de esta forma 10 líneas transgénicas independientes para cada plásmido recombinante. La mayoría de las inserciones ocurrieron en los cromosomas 2 y 3 y solo una de las 20 líneas transgénicas presentó la inserción en el cromosoma X lo cual es poco frecuente, debido a lo reducido del tamaño de este cromosoma.

Una de las estrategias utilizadas en *D. melanogaster* para analizar la función, ya sea activadora o represora de las proteínas, es expresar la proteína de interés ectópicamente en un lugar donde normalmente no se expresa (Canales del Castillo, 2005; Duffy, 2002; Li et al., 1999; Gómez, 2006). Por ello, utilizamos el sistema de regulación UAS/GAL4 para dirigir la expresión ectópica de la homeoproteína Antp con ausencia ó presencia del tetrapéptido YPWM y fusionada al motivo de represión WRPW utilizando las moscas transgénicas previamente obtenidas.

El sistema de expresión empleado en el análisis funcional en el desarrollo larvario fue el promotor de choque térmico, el cual dirigió la expresión de Antp a todos los tejidos del embrión y los choques se realizaron específicamente a las 6.5h del desarrollo embrionario teniendo una duración de 15min (Canales del Castillo, 2002; Gibson et al., 1988). Para estos ensayos se eligieron, al azar, tres líneas transgénicas independientes, que contienen la inserción en diferentes lugares del cromosoma 3, el testigo positivo fue una línea previamente obtenida que contiene Antp y los testigos negativos fueron <sup>AAAA</sup>Antp y AntpΔHD, ésta última presenta la delección del homeodominio, el cual es el sitio de interacción con el DNA (Otting et al., 1990). Al evaluar los fenotipos obtenidos en la expresión ectópica de Antp y sus mutantes se tomaron en cuenta tres parámetros: a) pérdida de la involución de la cabeza, b) aparición de denticulas ectópicas en el dorso de la cabeza y c) la transformación homeótica del primer segmento torácico T1 por el segundo T2. Las larvas que expresaron ectópicamente el testigo positivo Antp mostraron la pérdida de involución de la cabeza y la transformación de T1 por T2 de manera intermedia y no presentaron denticulas ectópicas, mostrando que esta proteína sobreexpresada posiblemente actúa como un represor que impidió la expresión de genes que son requeridos para el desarrollo normal de la cabeza (Struhl, 1982; Gibson et al., 1988). Del mismo modo, al sobreexpresar la mutante quimérica con <sup>YPWM</sup>Antp<sup>WRPW</sup>, mostró efectos fenotípicos severos tales como bloqueo drástico de la involución de la cabeza, transformación total de T1 a T2 y la aparición de denticulas ectópicas en el dorso



de la cabeza en dos de las líneas. Estos resultados indican que la fusión de WRPW a Antp permite una mayor actividad represora en las regiones anteriores de la cabeza. Por otro lado, una de las líneas analizadas de esta misma construcción ( $^{YPWM}Antp^{WRPW}$ ) mostró un efecto parecido al obtenido en el testigo positivo (Antp wt); esto es probablemente debido a que la proteína mutante se expresa en proporciones no equivalentes a las dos líneas anteriores (Gibson et al., 1990). Por otro lado, en ensayos de activación transcripcional realizados en células Schneider con Antp fusionada a WRPW en el extremo C-terminal (Villanueva, 2004), mostraron que esta mutante mostraba una actividad represora en la actividad transcripcional; similar a los obtenidos con la proteína heteróloga GAL4 unida a WRPW que mostró también actividad represora (Fisher et al., 1996). Estos resultados en conjunto demuestran que la fusión de los cuatro aminoácidos codificantes a WRPW son los responsables de los efectos fenotípicos severos observados y sugieren que la mayor actividad funcional obtenida es probablemente debida a la unión del corepresor Groucho a WRPW en la proteína Antp quimérica (Dawson et al., 1995; Fisher et al., 1996; Parkhurst et al., 1998).

Como se esperaba, la expresión ectópica las proteínas empleadas como testigos negativos  $^{AAAA}Antp$  y Antp $\Delta$ HHD no causaron ningún efecto en el desarrollo embrionario mostrando un fenotipo normal, (Canales del Castillo et al., 2002). En contraste, los fenotipos obtenidos por las tres mutantes quiméricas  $^{AAAA}Antp^{WRPW}$  mostraron sorprendentemente, un fenotipo similar al obtenido por el testigo positivo (Antp wt), es decir un fenotipo intermedio sin la aparición de dentículas extra en el dorso de la cabeza. Estos ensayos se confirmaron realizando choques térmicos de hasta 25min de exposición, pero se obtenía el mismo resultado (resultados no mostrados). Esto indica que la presencia del motivo WRPW rescata el fenotipo de Antp mimetizando la presencia del tetrapéptido YPWM en la expresión ectópica de esta homeoproteína. Experimentos realizados en nuestro laboratorio, se expresó en células Schneider la proteína GAL4 fusionada al extremo C-terminal a un péptido de doce aa's, que incluía el tetrapéptido YPWM de Antp; y se mostró una disminución de la transactivación de un gen reportero regulado por las secuencias UAS hasta en un 55% debido a esta fusión. Por lo que estos experimentos sugieren que YPWM actúa como un motivo de represión transcripcional de manera similar a como actúa WRPW, de esta forma es posible que WRPW pueda rescatar la función de YPWM en los ensayos de cutículas embrionarias.

Adicionalmente, se confirmó el efecto de la presencia del motivo WRPW en Antp con y sin tetrapéptido YPWM a un nivel más fino, al observado en las cutículas embrionarias. Para ello, se seleccionó el análisis de la activación del gen blanco *tsh* de Antp, debido a que ha sido uno de los genes más estudiados para esta homeoproteína (Canales del Castillo, 2005; McCormick et al., 1995). Se utilizó el sistema de expresión dirigido por el potenciador *patched*, que localizó la expresión constitutiva de Antp y sus mutantes en las regiones anteriores de cada parasegmento a partir de estadios embrionarios tempranos y en niveles similares en la parte dorsal y ventral. En estos experimentos, la activación ectópica de Tsh dirigida por el testigo positivo Antp se encontró, como se esperaba; en la región anterior del embrión (Canales del Castillo, 2005; McCormick et al., 1995; Roder et al., 1992). Los resultados obtenidos al analizar dos líneas mutantes con Antp fusionadas a WRPW mostraron una mayor capacidad de activar a Tsh en regiones



anteriores de la cabeza en los embriones, específicamente en el estadio 14 del desarrollo. Esta fuerte activación del gen *tsh* es probablemente ocasionada por la presencia del tetrapéptido YPWM que en combinación con la fusión del dominio de represión WRPW potencia aún más la activación de este gen blanco. Experimentos previos han mostrado que el tetrapéptido YPWM en las homeoproteínas Deformed, Ultrabithorax y Abdominal-A es el sitio de interacción con cofactores, lo cual, ha permitido convertir a las proteínas homeóticas en activadores ó represores (Pinnsonneault et al., 1997; Li et al., 1999). Es posible sugerir que el motivo WRPW, considerado como un motivo de represión transcripcional, en presencia de YPWM modula el balance de activador y/o represor de Antp permitiendo que potencie la activación de *tsh* (Li et al., 1999).

Sorprendentemente, al probar las mutantes quiméricas  $^{AAAA}Antp^{WRPW}$  en dos líneas transgénicas, no localizamos en la región de la cabeza la activación de la proteína Tsh; el patrón de expresión fue exactamente igual que la expresión endógena y como se ha descrito previamente en nuestro laboratorio al utilizar Antp mutada en YPWM (Canales del Castillo, 2005). Para demostrar que no constituyera un falso negativo, se comprobó mediante inmunofluorescencia la presencia de ambas proteínas, Tsh y Antp en los embriones de *D. melanogaster*. Los resultados mostraron la presencia de Antp ectópicamente en la cabeza del embrión, sin embargo; la presencia de esta homeoproteína no fue capaz de activar Tsh a pesar de la presencia de WRPW en el extremo C-terminal. Esto corrobora una vez más que para que Antp realice su actividad funcional se requiere de manera indispensable de la interacción del tetrapéptido YPWM con un cofactor no determinado a la fecha, que permite regular de manera apropiada y específica la activación de este gen blanco. Experimentos similares realizados en células Schneider mostraron que esta misma proteína  $^{AAAA}Antp^{WRPW}$  es capaz de activar la transcripción al igual que Antp con el tetrapéptido mutado usando sitios oligomerizados de unión a Antp (Villanueva, 2004). Estos resultados son apoyados por estudios previos que han demostrado que para la activación de *tsh* con la proteína Ftz se necesita de la presencia del tetrapéptido YPWM; ya que ésta proteína en *D. melanogaster* no posee YPWM y es incapaz de activarlo; pero cuando el tetrapéptido YPWM es incluido en Ftz de *D. melanogaster*, ésta es capaz de lograr la activación ectópica de Tsh (Lohr et al., 2001). Además, se ha propuesto que la proteína TAFII155 posiblemente interactúe con Antp a través del tetrapéptido YPWM (Prince et al., 2007), lo cual abre la posibilidad de que Antp interactúe con proteínas específicas a través de este tetrapéptido para permitir la regulación de sus genes blanco.

Los resultados obtenidos al analizar la fusión de WRPW en Antp en dos sistemas funcionales independientes: la transformación homeótica ó en la activación transcripcional en el gen blanco *tsh* muestran que la presencia del motivo WRPW fue capaz de potenciar la actividad funcional de Antp. Este incremento de actividad en Antp indica que los dominios de represión como YPWM o WRPW tienen un papel importante en la activación funcional de Antp probablemente modulando el balance de corepresores o coactivadores. Por otro lado, la mutante de  $^{AAAA}Antp^{WRPW}$  rescató la actividad funcional de Antp en la transformación homeótica en contraste con la activación transcripcional de *tsh* que requiere necesariamente de la presencia del tetrapéptido YPWM. Esto se explicaría debido a que los ensayos realizados en las cutículas inducen la expresión de



Antp en un lugar donde normalmente no se encuentra; en este sentido se podría decir que es artificial; por ello la adición del motivo de represión WRPW rescató la función de YPWM sugiriendo un mecanismo de represión similar. En cambio, en el análisis de activación transcripcional de genes blanco, en este caso *tsh* es una función específica de Antp, donde la función de esta proteína no es rescatada por la adición de WRPW ya que no es un dominio nativo de Antp (Gibson et al., 1988), por lo que la activación de *tsh* requiere de la presencia específica de los cofactores que interactúan con YPWM.

Ensayos similares realizados con Ubx fusionada al activador VP16 mostraron que esta proteína quimérica puede funcionar como activador/represor. En ensayos sobre el gen blanco *distalless (dll)*, esta proteína quimérica presentó con una mayor represión hacia *dll*. Estos resultados muestran que la función de Ubx-VP16 es debida a los efectos represores de Ubx hacia algunos genes blanco, a pesar de la unión del dominio activador VP16. En experimentos realizados sobre las cutículas embrionarias, Ubx-VP16 transformó el segmento tóraco T1 por T2, es decir, se transformó en Antp. La nueva función causada por VP16 sugiere que las diferencias funcionales entre las proteínas Ubx y Antp en la diversificación de las dentículas pueden residir en diferencias de estados de activación y represión, pero en estos experimentos el mecanismo aún es desconocido.

La activación ó represión de las homeoproteínas en los genes blanco han mostrado la capacidad de las mismas para explicar sus múltiples funciones durante el desarrollo (Li et al., 1999). El posible mecanismo de activación/represión ha sido explicado a través de las secuencias aminoacídicas que se encuentran fuera del homeodominio, como el tetrapéptido YPWM el cual es necesario para la actividad de algunas homeoproteínas debido a que es el sitio de interacción con cofactores (Johnson et al., 1995). Estas funciones activadoras ó represoras de las homeoproteínas que interactúan con posibles activadores o represores, han permitido la gran variedad de mecanismos de regulación en los genes blanco.



## 9. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el desarrollo de esta tesis permiten concluir lo siguiente:

- ✓ La producción de las proteínas quiméricas  $^{YPWM}Antp^{WRPW}$  y  $^{AAAA}Antp^{WRPW}$  en los embriones de las líneas de *D. melanogaster* transgénicas.
- ✓ La adición del motivo WRPW en el extremo C-terminal de Antp incrementó la actividad funcional de esta homeoproteína, tanto en la transformación homeótica T1 a T2 como en la activación del gen *tsh* en los embriones de *D. melanogaster* sugiriendo la importancia de los dominios represores en la actividad funcional de Antp.
- ✓ La presencia de WRPW en Antp con ausencia del tetrapéptido YPWM rescató el fenotipo mutante en la transformación homeótica confirmando la actividad similar de los motivos YPWM y WRPW en represión transcripcional.
- ✓ El tetrapéptido YPWM de Antp mostró ser indispensable para la activación del gen blanco *tsh* en la región de la cabeza de los embriones de *D. melanogaster*; debido a que la presencia de WRPW no afectó la activación *tsh*, sugiriendo la interacción de YPWM con un cofactor específico para la selección de este gen blanco.

La importancia del análisis de las funciones activadoras ó represoras de las homeoproteínas es fundamental para entender el mecanismo por el cual éstas regulan los genes blanco. Los ensayos que se realizaron en esta tesis podrían complementarse al estudiar un mayor número de genes blanco, como es el caso de *fkh[250<sup>con</sup>]* ó *apterous*, que son regulados por Antp. Además, deberá analizarse en ensayos de interacción si realmente el corepresor Groucho esta siendo reclutando por la proteína mutante  $^{YPWM}Antp^{WRPW}$ , así como también el cofactor TAFII155 que podría ser la proteína que interacciona en la actividad de la homeoproteína Antp a través del tetrapéptido YPWM.



## 10. APÉNDICE

### 10.1. Preparación de soluciones

Solución	Componentes	Cantidad	Preparación
<i>Agarosa 0.7%</i>	Azarosa	0.7g	Agregar 100ml de buffer SB1X y calentar a ebullición
<i>Ampicilina 50mg/ml</i>	Ampicilina	0.5g	Disolver completamente en 10ml y almacenar a -20°C; en los cultivos agregar 1µl por 1ml
<i>Bromuro de Etidio (concentrado)</i>	Bromuro de Etidio	0.1g	Mezclar por inversión con 10ml de H <sub>2</sub> O bidestilada; almacenar en oscuridad; es muy tóxico
<i>Bromuro de Etidio; solución de trabajo</i>	Bromuro de Etidio (concentrado)	100µl	Mezclar con 200ml de Buffer SB 1X
<i>Buffer SB 20X</i>	NaOH	8g	Disolver completamente el NaOH en 700ml de H <sub>2</sub> O bidestilada; agregar ¾ partes del Ácido Bórico, medir el pH y agregar mas ácido bórico hasta alcanzar el pH 8, aforar a 1L
	Ácido Bórico	51g	
<i>Buffer SB 1X</i>	Buffer SB 20X	50ml	Aforar a 1L con H <sub>2</sub> O bidestilada
<i>CaCl<sub>2</sub> 0.1M</i>	CaCl <sub>2</sub>	1.47g	Disolver completamente en 80ml de H <sub>2</sub> O bidestilada; aforar a 100ml; esterilizar con autoclave
<i>Comida Estándar para D. melanogaster</i>	Jazz Mix	120g	Disolver en 1.5L de H <sub>2</sub> O bidestilada estéril, calentar a ebullición durante 10min, servir a 60°C en tubos y frascos estériles
<i>Comida de Puesta para D. melanogaster</i>	Ágar bacteriológico	12.7g	Disolver el ágar y el azúcar en 450ml de H <sub>2</sub> O bidestilada durante 15min a ebullición, enfriar a 60°C, agregar el néctar de manzana y mezclar el ácido propiónico, servir 55°C en placas petri
	Azúcar	7.5g	
	Néctar de Manzana	150ml	
	Ácido Propiónico	3.6ml	
<i>Cloro 4%</i>	Cloro 5%	400ml	Aforar a 500ml con H <sub>2</sub> O bidestilada y mezclar por agitación, almacenar en oscuridad
	Etanol	15ml	Mezclar por inversión



<i>Etanol 30% / PBS</i>	Etanol	15ml	Mezclar por inversión
<i>Etanol 30% / PBS</i>	Etanol	25ml	Mezclar por inversión
	PBS 1X	25ml	
<i>Etanol 70% / PBS</i>	Etanol	35ml	Mezclar por inversión
	PBS 1X	15ml	
<i>Jugo Azul 6X</i>	Azul bromofenol 0.25%	125µl	Mezclar y aforar con 50ml de H <sub>2</sub> O miliQ, almacenar a 4°C
	Xilencianol 0.25%	125µl	
	Glicerol 30%	15ml	
<i>Medio LB líquido</i>	Medio LB	25g	Disolver en 1L de H <sub>2</sub> O bidestilada, esterilizar con autoclave
<i>Medio LB placas</i>	Medio LB líquido	400ml	Agregar el ágar al medio LB, esterilizar con autoclave, agregar la ampicilina, servir en placas petri
	Agar bacteriológico	6.4g	
	Ampicilina	800µl	
<i>Metanol/PBS 30%</i>	Metanol	35ml	Mezclar por inversión
	PBS 1X	15ml	
<i>Metanol/PBS 50%</i>	Metanol	25ml	Mezclar por inversión
	PBS 1X	25ml	
<i>Metanol/PBS 70%</i>	Metanol	15ml	Mezclar por inversión
	PBS 1X	35ml	
<i>PBS 1X</i>	NaCl	8g	Disolver en 700ml de H <sub>2</sub> O bidestilada por agitación; ajustar el pH a 7.4; aforar a 1L; esterilizar con autoclave
	KCl	0.2g	
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44g	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24g	
<i>PBS/Glicerol 40%</i>	Glicerol	6ml	Disolver mediante vórtex
	PBS 1X	9ml	
<i>PBS/Tween 0.05%</i>	Tween20	25µl	Disolver mediante vórtex
	PBS 1X	50ml	
<i>PBT</i>	Tritón X-100	50µl	Disolver mediante vórtex
	PBS 1X	50ml	
<i>PBT/BSA</i>	BSA 10%	0.1g	Disolver mediante vórtex
	BSA 1%	0.01g	
	PBT	1ml	
<i>PIPES 0.1M</i>	EGTA 2mM	0.3744	Disolver en 300ml de H <sub>2</sub> O bidestilada, ajustar a pH 6.9; aforar a 400ml; esterilizar con autoclave
	MgSO <sub>4</sub> 1mM	0.0482	
	PIPES 0.1M	12.096	
<i>RNA'sa 10mg/ml</i>	Ribonucleasa A	0.1g	Disolver en 10ml y almacenar a -20°C, agregar 10µl por 1ml
<i>Solución I</i>	Tris-HCl (pH8.0; 25mM)	5ml de 1M	Aforar a un volumen de 200ml con H <sub>2</sub> O miliQ
	EDTA (pH8.0;	4ml de	



	10mM)	500mM	
<i>Solución II</i>	NaOH 0.2N	4ml de 10N	Mezclar por agitación y llevar a un volumen de 200ml con H <sub>2</sub> O miliQ
	SDS 1%	2g	
<i>Solución III</i>	KOAc 5M	29.4g	Disolver y llevar a un volumen de 100ml con H <sub>2</sub> O miliQ
	Acido Acético Glacial	11.5ml	
<i>Tritón X-100 / NaCl</i>	Tritón X-100 0.03%	150µl	Disolver en 500ml de H <sub>2</sub> O bidestilada por agitación
	NaCl 0.4%	2g	

## 10.2. Lista de reactivos

Reactivo	Compañía	No. de Catálogo	Peso Molecular
<i>Acetato de Potasio</i>	Research Organics	Cat.0725P	NA
<i>Ácido Acético Glacial</i>	CTR	NA	60.05
<i>Acido Bórico (Grado Molecular)</i>	USBiological	C4030101	NA
<i>Ácido Propiónico</i>	Fluka	10206218	NA
<i>Ágar bacteriológico</i>	BD Bioxon	215000	NA
<i>Agarosa (Ultrapura)</i>	INVITROGEN	C15510-027	NA
<i>Agua Bidestilada</i>	CTR	00064	18.0
<i>Ampicilina</i>	SIGMA	A-9518	NA
<i>Azul Bromofenol</i>	Research Organics Inc.	Cat.1230B	692.0
<i>BCIP/NBT Líquido</i>	SIGMA	B-1911	NA
<i>Bromuro de Etidio</i>	SIGMA	E7637-5G	NA
<i>BSA (Grado Biotecnológico)</i>	Research Organics Inc.	Cat.1333A	NA
<i>CaCl<sub>2</sub></i>	SIGMA	C-5080	147.0
<i>Cloro</i>	Clorox; (5% de cloro libre)	Comercial	NA
<i>Cloroformo</i>	CTR	NA	NA
<i>EDTA (Grado Molecular)</i>	SIGMA	E-5134	372.2
<i>EGTA</i>	SIGMA	E-8145	468.3
<i>Etanol</i>	CTR	NA	NA
<i>Etanol (HPLC/ Espectro)</i>	TEDIA Company	AS-1131	46.07
<i>Éter Etilico</i>	CTR	NA	NA
<i>Formaldehído</i>	SIGMA	F-1635	NA
<i>Glicerol (Grado Biotecnológico)</i>	AMRESCO	0854-1	NA
<i>Heptano</i>	CTR	NA	NA
<i>Isopropanol</i>	TEDIA Company	PS-2030	60.10



(HPLC/Espectro)			
<i>Jazz Mix</i>	Fisher Scientific	AS153	NA
<i>KCl</i>	Merck	Art4936	NA
<i>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></i>	Merck	Art4873	NA
<i>Marcador Lamba</i>	SIGMA	W-3110	NA
<i>Medio LB (Grado Molecular)</i>	USBiological	L1520	NA
<i>Metanol</i>	CTR	NA	NA
<i>MgSO<sub>4</sub></i>	SIGMA	M-7506	120.4
<i>NaCl</i>	Research Organics Inc.	Cat. 09265	NA
<i>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></i>	Merck	Art6586	NA
<i>NaOH (Pastillas)</i>	J.T. BAKER	3722-01	40.0
<i>PIPES (Grado Molecular)</i>	Research Organics Inc.	Cat.9624P	302.4
<i>Ribonucleasa A (RNasa)</i>	SIGMA	R-5503	NA
<i>SDS (Grado Molecular)</i>	USBiological	C4072769	NA
<i>Tris-HCl</i>	SIGMA	T-3253	157.6
<i>Tritón X-100</i>	SIGMA	X-100	NA
<i>Tween 20</i>	SIGMA	P-1379	NA
<i>Xilencianol</i>	Research Organics Inc.	Cat.7113X	554.6

NA= No Aplica



## LITERATURA CITADA

Affolter M., Percival-Smith A., Muller M., Leupin W., Gehring W. (1990). DNA binding properties of the purified Antennapedia homeodomain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 4093-4097.

Aronson B.D., Fisher A.L., Blechman K., Caudy M., Gergen J.P. (1997). Groucho-dependent and -independent repression activities of Runt domain proteins. *Mol. Cell. Biol.* 17: 5581-5587.

Beachy P., Krasnow M., Gavis E., Hogness D. (1988). An Ultrabithorax protein binds sequences near its own and *Antennapedia* P1 promoters. *Cell* 55(6): 1069-1081.

Beachy P., Varkey J., Young K.E., Von Kessler D.P., Sun B.I., Ekker S.C. (1993). Cooperative binding of an Ultrabithorax homeodomain protein to nearby and distant DNA sites. *Mol. Cell. Biol.* 13: 6941-6956.

Birnboim H.C. and Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523.

Burglin T.R. (1995). The evolution of homeobox genes. *Biodiversity and Evolution*. The National Science Museum Foundation. Tokyo: 291-336.

Bridges C.B. and Morgan T.H. (1923). The Third-Chromosome Group of Mutant Characters of *Drosophila melanogaster*. Carnegie Inst. of Washington Publ. 327-393.

Campos-Ortega J.A., Hartenstein V. (1985). The embryonic development of *Drosophila melanogaster*. Springer Verlag, Berlin and Heidelberg.

Canales-del-Castillo R. (2002). Análisis molecular y funcional del tetrapéptido YPWM en Antennapedia en el estadio larvario de *Drosophila melanogaster*. Tesis de Licenciatura. F.C.B. U.A.N.L.

Canales-del-Castillo R. (2005). Actividad funcional del tetrapéptido YPWM de Antennapedia en la regulación de los genes blanco durante el desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster*. Tesis de Maestría. F.C.B. U.A.N.L.

Capovilla M., Brandt M., Botas J. (1994). Direct regulation of *decapentaplegic* by Ultrabithorax and its role in *Drosophila* midgut morphogenesis. *Cell* 76(3): 461-475.



Capovilla M., Kambris Z., Botas J. (2001). Direct regulation of the muscle-identity gene *apterous* by a HOX protein in the somatic mesoderm. *Development* 128(8): 1221-1230.

Cárdenas-Chávez D. (2003). Análisis de la Represión Transcripcional *in vitro* del Tetrapéptido YPWM de Antennapedia. Tesis de Licenciatura. F.C.B. U.A.N.L.

Cárdenas-Chávez D. (2007). Purificación de las proteínas Antennapedia, GAL4 y mutantes en el tetrapéptido YPWM: dominio de represión transcripcional en Antennapedia. Tesis de Maestría. F.C.B. U.A.N.L.

Carroll S., Laymon R., McCutcheon M., Riley P., Scott M. (1986). The localization and regulation of Antennapedia protein expression in *Drosophila* embryos. *Cell* 47(1): 113-122.

Carroll S. (2001). *From DNA to diversity: Molecular genetics and the evolution of animal design*. Malden, Blackwell.

Chan S.K., Popperl H., Krumlauf R., Mann R.S. (1996). An Extradenticle-induced conformational change in a Hox protein overcomes an inhibitory function of the conserved hexapeptide motif. *EMBO J.* 15: 2476-2487.

Chang C., Shen W., Rozenfeld S., Lawrence H., Largman C., Cleary M. (1995). Pbx proteins display hexapeptide-dependent cooperative DNA binding with a subset of Hox proteins. *Genes and Dev.* 9(6): 663-674.

Cimbora D., Sakonju S. (1995). *Drosophila* midgut morphogenesis requires the function of the segmentation gene *odd paired*. *Dev. Biol.* 169(2): 580-595.

Core N., Charroux B., McCormick A., Vola C., Fasano L., Scott M., Kerridge S. (1997). Transcriptional regulation of the *Drosophila* homeotic gene *teashirt* by the homeodomain protein Fushi tarazu. *Mech. Dev.* 68(1-2): 157-172.

Dawson S.R., Turner D.L., Weintraub H., Parkhurst S.M. (1995). Specificity for the hairy/enhancer of split basic helix-loop-helix (bHLH) proteins maps outside the bHLH domain and suggest two separable modes of transcriptional repression. *Mol. Cell. Biol.* 15: 6923-6931.

Delidakis C., Preiss A., Hartley D.A., Artavanis-Tsakonas S. (1991). Two genetically and molecularly distinct functions involved in early neurogenesis reside within the enhancer of split locus of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 129: 803-823.

Desplan C., Theis J., O'Farrell P. (1988). The sequence specificity of homeodomain-DNA interaction. *Cell* 54(7): 1081-1090.



Duboule D., Dolle P. (1989). The structural and functional organization of the murine Hox gene family resembles that of *Drosophila* homeotic genes. *EMBO J.* 8(5): 1497-1505.

Duffy J.B. (2002). GAL4 system in *Drosophila*: A fly geneticist's swiss army knife. *Genesis* 34: 1-15.

Fasano L., Roder L., Core N., Alexandre E., Vola C., Jacq B., 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.

Fisher A.L., Ohsako S., Caudy M. (1996). The WRPW motif of the hairy-related basic helix-loop-helix repressor proteins acts as a 4-amino-acid transcription repression and protein-protein interaction domain. *Mol. Cell. Biol.* 16: 2670-2677.

Furukubo-Tokunaga K., Flister S., Gehring W. (1993). Functional specificity of the Antennapedia homeodomain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 6360-6364.

Garber R.L., Kuroiwa A., Gehring W.J. (1983). Genomic and cDNA clones of the homeotic locus Antennapedia in *Drosophila*. *EMBO J.* 2: 2027-2036

Gehring W., Qian Y.Q., Billeter M., Furukubo-Tokunaga K., Schier A.F., Resendez-Perez D., Affolter M., Otting G., Wuthrich K. (1994). Homeodomain-DNA recognition. *Cell* 78: 211- 223.

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

Gibson G., Gehring W. (1990). The specificities of Sex combs reduced and Antennapedia are defined by a distinct portion of each protein that includes the homeodomain. *Cell* 62: 1087-1103.

Gilbert, S. (2003). *Developmental Biology*. 7<sup>th</sup> Ed. Sinauer Associates, Inc. U.S.A.

Gómez-Velázquez M. (2006). Actividad funcional del motivo YPWM de Antennapedia en el potenciador dpp674LacZ. Tesis de Licenciatura. F.C.B. U.A.N.L.

Green Y., Aragnol D., Pradel J. (1997). *Drosophila* Hox complex downstream targets and the function of homeotic genes. *Bioessays* 19(5): 379-388.

Hafen E., Levine M., Gehring W. (1984). Regulation of *Antennapedia* transcript distribution by the bithorax complex in *Drosophila*. *Nature* 307(5948): 287-289.



Heuer J., Li K., Kaufman T. (1995). The *Drosophila* homeotic target gene *centrosomin (cnn)* encodes a novel centrosomal protein with leucine zippers and maps to a genomic region required for midgut morphogenesis. *Development* 121(11): 3861-3876

Hoey T., Levine M. (1988). Divergent homeobox proteins recognize similar DNA sequences in *Drosophila*. *Nature* 332(6167): 858-861.

Jaffe L., Ryoo H.D., Mann R.S. (1997). A role for phosphorylation by casein kinase II in modulating Antennapedia activity in *Drosophila*. *Genes Dev.* 11(10):1327-1340.

Johnson F.B., Parker E., 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): 739-743.

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

Kobayashi M., Goldstein R.E., Fujioka M., Paroush Z., Jaynes J.B. (2001). Groucho augments the repression of multiple Even skipped target genes in establishing parasegment boundaries. *Development* 128: 1805-1815.

Knoepfler P., Lu Q., Kamps M. (1996). Pbx-1/Hox heterodimers bind DNA on inseparable half-sites that permit intrinsic DNA binding specificity of the Hox partner at nucleotides 3' to a TAAT motif. *Nucleic Acids Res.* 24(12): 2288-2294.

Krasnow M.A., Saffman E.E., Kornfeld K., Hogness D.S. (1989). Transcriptional activation and repression by Ultrabithorax proteins in cultured *Drosophila* cells. *Cell* 57(6): 1031-1043.

Kuroiwa A., Hafen E., Gehring W. (1984). Cloning and transcriptional analysis of the segmentation gene *fushi tarazu* of *Drosophila*. *Cell* 37(3): 825-831.

Lawrence P.A. (1992). The making of the fly: The genetics of animal design. Blackwell Scientific Publications.

LeCalvez J. (1948). Mutation Aristapedia heterozygote dominante, homozygote lethal chez *Drosophila melanogaster*. *Bull. Biol. France Belg* 82: 97-113.

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

Li X., McGinnis W. (1999). Activity regulation of Hox proteins, a mechanism for altering functional specificity in development and evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 6802-6807.



Li, X., Murre C., McGinnis W. (1999). Activity regulation of a Hox protein and a role for the homeodomain in inhibiting transcriptional activation. *EMBO J.* 18: 198-211.

Lodish H., Berk A., Lawrence-Zipursky S., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. (2002). *Molecular Cell Biology*. 4<sup>th</sup> Ed. W. H. Freeman and Co. U.S.A.

Lohr U., Yussa M., Pick L. (2001). *Drosophila fushi tarazu*, a gene on the border of homeotic function. *Curr. Biol.* 11(18): 1403-1412.

McCormick A., Core N., Kerridge S., Scott M.P. (1995). Homeotic response elements are tightly linked to tissue-specific elements in a transcriptional enhancer of the *teashirt* gene. *Development* 121(9): 2799-2812.

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

McGinnis W., Garber R.L., Wirz J., Kuroiwa A., Gehring W. (1984). A homologous protein-coding sequence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoans. *Cell* 37(2): 403-408.

McGinnis W., Hart C., Gehring W., Ruddle F. (1984). Molecular cloning and chromosome mapping of mouse DNA sequence homologous to homeotic genes of *Drosophila*. *Cell* 38(3): 675-680.

Medina-Martinez O., Ramirez-Solis R. (2004). *In vivo* mutagenesis of the Hoxb8 hexapeptide domain leads to dominant homeotic transformations that mimic the loss-of-function mutations in genes of the Hoxb cluster. *Dev. Biol.* 264(1): 77-90.

Miller D., Rogers B., Kalkbrenner A., Hamilton B., Holtzman S., Kaufman T. (2001). Cross-regulation of Hox genes in the *Drosophila melanogaster* embryo. *Mech. Dev.* 102(1-2): 3-16.

Negre de Bofarull B. (2005). Caracterización genómica y funcional de las reorganizaciones del complejo de genes Hox en *Drosophila*. Tesis de Doctorado. Facultat de Ciències. Universitat Autònoma de Barcelona.

Ohsako S., Hyer J., Panganiban G., Oliver I., Caudy M. (1994). Hairy function as a DNA-binding helix-loop-helix repressor of *Drosophila* sensory organ formation. *Genes Dev.* 8: 2743-2755.

Otting G., Qian Y.Q., Billeter M., Muller M., Affolter M., Gehring W., 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: 3085-3092.



Parkhurst S.M.(1998). Groucho: making its Marx as a transcriptional co-repressor. Trends. Genet. 14: 130-132.

Paroush Z., Finley R.L.Jr., Kidd T., Wainwright S.M., Ingham P.W., Brent R., Ish-Horowicz D. (1994). Groucho is required for *Drosophila* neurogenesis, segmentation, and sex determination and interacts directly with hairy-related bHLH proteins. Cell 79: 805-815.

Passner J.M., Ryoo H.D., Shen L., Mann R.S., Aggarwal A.K. (1999). Structure of a DNA-bound Ultrabithorax-Extradenticle homeodomain complex. Nature 397(6721): 714-719.

Phelan M., Rambaldi I., Featherstone M. (1995). Cooperative interactions between Hox and Pbx proteins mediated by a conserved peptide motif. Mol. Cell. Biol. 15(8): 3989-3997.

Pinsonneault J., Florence B., Vaessin H., McGinnis W. (1997). A model for extradenticle function as a switch that changes Hox proteins from repressors to activators. EMBO J. 16: 2032-2042.

Piper D., Batchelor A., Chang C., Cleary M., Wolberger C. (1999). Structure of a HoxB1-Pbx1 heterodimer bound to DNA: role of the hexapeptide and a fourth homeodomain helix in complex formation. Cell 96(4): 587-597.

Prince F., Katsuyama T., Plaza S., Resendez-Perez D., Berry M., Kurata S., Gehring W. (2007). The YPWM-motif links Antennapedia to the basal transcriptional machinery. Development (In press).

Qian Y.Q., Billeter M., Otting G., Muller M., Gehring W., Wuthrich K. (1989). The structure of the Antennapedia homeodomain determined by NMR spectroscopy in solution: comparison with prokaryotic repressors. Cell 59(3): 573-580.

Qian Y.Q., Otting G., Furukubo-Tokunaga K., Affolter M., Gehring W., 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. 89: 10738-10742.

Qian Y.Q., Resendez-Perez D., Gehring W., 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. 91: 4091-4095.

Roder L., Vola C., Kerridge S. (1992). The role of the *teashirt* gene in trunk segmental identity in *Drosophila*. Development 115(4): 1017-1033.



Ronshaugen M., McGinnis N., McGinnis W. (2002). Hox protein mutation and macroevolution of the insect body plan. *Nature* 415: 914-917.

Ryoo H.D., Mann R.S. (1999). The control of trunk Hox specificity and activity by Extradenticle. *Genes Dev.* 13: 1704-1716.

Ryoo H., Marty T., Casares F., Affolter M., Mann R. (1999). Regulation of Hox target genes by a DNA bound Homothorax/Hox/Extradenticle complex. *Development* 126(22): 5137-5148.

Saffman E.E., Krasnow M.A. (1994). A differential response element for the homeotics at the *Antennapedia* P1 promoter of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 7420-7424.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor New York.

Schier A.F., Gehring W.J. (1993). Functional specificity of the homeodomain protein fushi tarazu: the role of DNA-binding specificity *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 15: 1450-1454.

Schneuwly S., Klemenz R., Gehring W. (1987). Redesigning the body plan of *Drosophila* by ectopic expression of the homoeotic gene *Antennapedia*. *Nature* 325: 816-818.

Shanmugam K., Featherstone M., Saragovi H.U. (1997). Residues flanking the Hox YPWM motif contribute to cooperative interactions with Pbx. *J. Biol. Chem.* 272(30): 19081-19087.

Soanes K., Bell J. (2001). The *Drosophila aeroplane* mutant is caused by an I-element insertion into a tissue-specific *teashirt* enhancer motif. *Genome* 44(5): 919-928.

Spradling A., Rubin G. (1982). Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science* 218: 341-347.

Sprecher S., Muller M., Kammermeier L., Miller D., Kaufman T., Reichert H., Hirth F. (2004). Hox gene cross-regulatory interactions in the embryonic brain of *Drosophila*. *Mech. Dev.* 121(6): 527-536.

Stern D., Sucena E. (2000). Preparation of larval and adult cuticles for light microscopy. In: *Drosophila* Protocols. Sullivan W., Ashburner M., Hawley S. (eds.). Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, pp. 601-615.

Stroeher V.L., Garber R.L. (1988). Alternative RNA splicing that is spatially regulated: generation of transcripts from the *Antennapedia* gene of *Drosophila melanogaster* with different protein-coding region. *Mol. Cell. Biol.* 8(10): 4143-4154.



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

Struhl G. (1982). Genes controlling segmental specification in the *Drosophila* thorax. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 79: 7380-7384.

Struhl G., Akam M. (1985). Altered distributions of *Ultrabithorax* transcripts in extra sex combs mutant embryos of *Drosophila*. *EMBO J.* 4(12): 3259-3264.

Struhl G., White R. (1985). Regulation of the *Ultrabithorax* gene of *Drosophila* by other bithorax complex genes. *Cell* 43 (2): 507-519.

Tour E., Todd-Hittinger C., McGinnis W. (2005). Evolutionarily conserved domains required for activation and repression functions of the *Drosophila* Hox protein Ultrabithorax. *Development* 132: 5271-5281.

Vachon G., Cohen B., Pfeifle C., McGuffin M.E., Botas J., Cohen S.M. (1992). Homeotic genes of the Bithorax complex repress limb development in the abdomen of the *Drosophila* embryo through the target gene *distal-less*. *Cell* 71: 437-450.

Villanueva-Segura O.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.

Wainwright S.M., Ish-Horowicz D. (1992). Point mutations in the *Drosophila* hairy gene demonstrate in vivo requirements for basic, helix-loop-helix, and WRPW domains. *Mol. Cell. Biol.* 12: 2475-2483.

Watson J.D., Baker T.A., Bell S.P., Gann A., Levine M., Losick R. (2006). *Biología Molecular del Gen.* 5 ed. Editorial Medica Panamericana. España.

Wiellette E., McGinnis W. (1999). Hox genes differentially regulate *serrate* to generate segment-specific structures. *Development* 126(9): 1985-1995.

Wieschaus E., Nüsslein-Volhard E. (1998). Looking at embryos. In: *Drosophila: A practical Approach*. Roberts D.B. (ed.). Oxford University Press: New York, pp. 179-214.

White R.A.H. (1998). Immunolabelling of *Drosophila*. In: *Drosophila A practical Approach*. Robert D.B. (ed.). Oxford University Press: New York, pp. 215-240.

Wirtz J., Fessler L.I., Gehring W. (1986). Localization of the Antennapedia protein in *Drosophila* embryos and imaginal discs. *EMBO J.* 12: 3327-3334.

## **RESUMEN BIOGRÁFICO**

Olga Karina Villanueva Segura

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Especialidad en Microbiología

Tesis: EFECTO DEL MOTIVO WRPW EN LA ACTIVIDAD FUNCIONAL DE ANTENNAPEDIA EN *Drosophila melanogaster*.

Campo de Estudio: Ciencias Naturales.

Datos Personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León el 30 de Julio de 1982, hija de Olga Segura Amaya y Oscar Villanueva Martínez.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Grado obtenido de Biólogo en Agosto de 2004.