



Universidad Nacional Autónoma de México

Instituto de Neurobiología

Caracterización del fenotipo de clones de línea germinal del gen *blistered* de *Drosophila melanogaster*

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

Francisco Javier Carmona Aldana

Director de tesis
Dr. Juan Rafael Riesgo Escovar

Campus Juriquilla, Querétaro. Agosto de 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Resumen

El desarrollo de metazoarios está regulado por la expresión coordinada de genes en el tiempo y el espacio. Esto hace que sea interesante el estudio de factores reguladores de la expresión génica que tienen funciones en el desarrollo. El gen *blistered (bs)* de *Drosophila* es el homólogo del gen que codifica en vertebrados para el Factor de Respuesta al Suero, un factor de transcripción con más de una función en el desarrollo. Se conocen algunas funciones de *bs* en el desarrollo de la mosca, y se sabe que hay una reserva materna de sus productos de expresión, la cual es depositada en los huevos durante la ovogénesis. En este trabajo se buscaron evidencias de una función temprana de *bs* generando embriones mutantes que además se desarrollaron a partir de una contribución materna mutante del gen, y se compararon la letalidad y las alteraciones morfológicas resultantes con las de embriones mutantes derivados de una contribución materna no alterada. Los resultados llevaron a concluir que *bs* es un gen que tiene, además de las conocidas, varias funciones en el desarrollo: a) una función temprana, que está dirigida especialmente por la contribución materna y se relaciona con la segmentación del embrión; y b) una función tardía, dirigida especialmente por la expresión de *bs* por el genoma del cigoto, relacionada con el cierre dorsal y la involución de la cabeza.

Abstract

Development in metazoans is regulated by expression of genes in their proper time and space. This makes studying factors that regulate gene expression during development an interesting issue. The *blistered (bs)* gene in *Drosophila*, the homolog to the Serum Response Factor gene in vertebrates, is known to have more than one function during development. Some *bs* functions during fly development are known, and a *bs* maternal contribution has been noted, but not studied. Therefore, in this work, we studied the role of the *bs* maternal contribution during development. We generated embryos from a mutant maternal storage of *bs*; lethality and morphological phenotypes were analyzed and compared with those obtained from *bs* zygotic mutants. Results uncovered several new *bs* functions in development: a) an early function, directed primarily by maternal contribution regulating segmentation; and b) a late function, principally by *bs* zygotic expression, regulating dorsal closure and head involution.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Becario número: 228534.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM. Número de cuenta: 508001415.

Al personal de la Biblioteca del campus UNAM Juriquilla, que era encabezado por la Lic. María del Pilar Galarza Barrios al comenzar este trabajo, y después por el Dr. Francisco Javier Valles Valenzuela, como Coordinadores, y por la Lic. Teresa Soledad Medina Malagón, encargada del Desarrollo de Colecciones y Procesos.

A la Lic. Ma. de Lourdes Lara Ayala, encargada de los servicios de videoconferencia.

Al personal de la unidad de cómputo, encabezado por el M. en C. Alberto Lara Ruvalcaba.

Al personal de la Unidad de Enseñanza, de manera muy especial a la M. en C. Leonor Casanova Rico, Jefa de la Unidad de Enseñanza y a la secretaria Yolanda Orduña Cruz.

Al Dr. Juan Riesgo, con quien he tenido oportunidad, desde mi primera estancia en su laboratorio como alumno de un Programa de Verano, de conocer el interesante mundo de la investigación científica. Agradezco la confianza que me ha brindado al dejarme participar en algunos de sus proyectos en su laboratorio, así como por el apoyo y la guía para trabajar en ellos.

A la Dra. Tere Peña, cuya asesoría constante ha sido de especial valor; por la manera en la que desempeña su trabajo, que para todos en el laboratorio resulta esencial.

Al otro “producto” del curso de esta Maestría, los amigos que he encontrado en el Instituto, de manera especial a Adriana Rodríguez, Daniel Ríos, Benjamín Velarde, María Lemini, Alma Bertadillo, Ismael Gimete, Néstor Nazario, Miguel Mendoza y Fabiola Espinoza.

Dedicatoria

Ni el más elaborado de los razonamientos me alcanza para entender completamente cómo una persona, a pesar de tantas situaciones en contra, genera el impulso para actuar de la manera más desinteresada para ofrecer cosas buenas a los que le importan. Mi agradecimiento, mi respeto y la dedicatoria de este trabajo a mi madre,
Lupita Aldana

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Becario número: 228534.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM. Número de cuenta: 508001415.

Al personal de la Biblioteca del campus UNAM Juriquilla, que era encabezado por la Lic. María del Pilar Galarza Barrios al comenzar este trabajo, y después por el Dr. Francisco Javier Valles Valenzuela, como Coordinadores, y por la Lic. Teresa Soledad Medina Malagón, encargada del Desarrollo de Colecciones y Procesos.

A la Lic. Ma. de Lourdes Lara Ayala, encargada de los servicios de videoconferencia.

Al personal de la unidad de cómputo, encabezado por el M. en C. Alberto Lara Ruvalcaba.

Al personal de la Unidad de Enseñanza, de manera muy especial a la M. en C. Leonor Casanova Rico, Jefa de la Unidad de Enseñanza y a la secretaria Yolanda Orduña Cruz.

Al Dr. Juan Riesgo, con quien he tenido oportunidad, desde mi primera estancia en su laboratorio como alumno de un Programa de Verano, de conocer el interesante mundo de la investigación científica. Agradezco la confianza que me ha brindado al dejarme participar en algunos de sus proyectos en su laboratorio, así como por el apoyo y la guía para trabajar en ellos.

A la Dra. Tere Peña, cuya asesoría constante ha sido de especial valor; por la manera en la que desempeña su trabajo, que para todos en el laboratorio resulta esencial.

Al otro “producto” del curso de esta Maestría, los amigos que he encontrado en el Instituto, de manera especial a Adriana Rodríguez, Daniel Ríos, Benjamín Velarde, María Lemini, Alma Bertadillo, Ismael Gimete, Néstor Nazario, Miguel Mendoza y Fabiola Espinoza.

Dedicatoria

Ni el más elaborado de los razonamientos me alcanza para entender completamente cómo una persona, a pesar de tantas situaciones en contra, genera el impulso para actuar de la manera más desinteresada para ofrecer cosas buenas a los que le importan. Mi agradecimiento, mi respeto y la dedicatoria de este trabajo a mi madre,
Lupita Aldana

Índice general

	página
Resumen	i
Abstract	ii
Agradecimientos	iii
Dedicatoria	iv
I. Introducción	1
II. Antecedentes	2
2.1 Desarrollo embrionario	2
2.1.1 Blastulación	2
2.1.2 Gastrulación	2
2.1.3 Organogénesis	2
2.2 <i>Drosophila melanogaster</i> ofrece características que la hacen útil como modelo experimental para estudiar el desarrollo	3
2.3 Desarrollo embrionario de <i>D. melanogaster</i>	4
2.3.1 Blastulación	4
2.3.2 Gastrulación y elongación y retracción de la banda germinal	5
2.3.3 Cerrado dorsal e involución de la cabeza	5
2.4 Contribución materna	7
2.5 El gen <i>blistered (bs)</i>	7
III. Justificación	10
IV. Hipótesis	11
V. Objetivos	12
VI. Material y métodos	13
6.1 Cepas de estudio	13

6.2	Generación de clones de línea germinal (CLG)	13
6.3	Determinación de letalidad embrionaria	15
6.4	Preparación de cutículas embrionarias	16
6.5	Análisis estadístico	16
VII.	Resultados	17
7.1	Determinación de letalidad embrionaria en mutantes para <i>bs</i>	17
7.2	Caracterización de fenotipos mutantes de <i>bs</i>	21
7.2.1	Fenotipos en embriones mutantes para <i>bs</i>	21
7.2.2	Fenotipos en CLG	23
VIII.	Discusión	25
IX.	Conclusión	28
X.	Referencias	29
XI.	Lista de figuras	32
XII.	Lista de tablas	33

I. Introducción

Los procesos celulares que ocurren durante el desarrollo embrionario tienen como base cambios en los programas de expresión génica, que están modulados en el espacio y el tiempo por proteínas reguladoras (factores de transcripción) (Sanson, 2001), y por esto su estudio constituye un tema importante para entender la dinámica del desarrollo. En este trabajo se caracterizó el papel del gen *blistered* (*bs*) de *Drosophila melanogaster* en procesos tempranos del desarrollo. Este gen codifica para una proteína homóloga al Factor de Respuesta al Suero, que es un regulador transcripcional de vertebrados (Montagne *et al.*, 1996). Se sabe que *bs* se expresa en etapas muy tempranas del desarrollo, y que hay contribución materna de este gen (ARNm y proteína), contenida en el huevo desde antes de la fecundación (Affolter *et al.*, 1994; Guillemín *et al.*, 1996; Montagne *et al.*, 1996). Alelos mutantes de *bs* muestran letalidad embrionaria, la cual se ha explorado poco. Para entender cuál es la función de la contribución materna de este gen durante el desarrollo de *Drosophila*, se generaron embriones mutantes para *bs* a partir de huevos con una contribución materna también mutante. Esto se logró mediante la fecundación de hembras en las que se indujo la formación de clones de células germinales mutantes mediante la técnica de Chou y Perrimon (1996), de manera que los huevos generados a partir de estos clones contienen una contribución materna deficiente para *bs*. Se analizó el efecto sobre el desarrollo de una contribución materna mutante determinando la letalidad en etapas embrionarias, contando cuántos individuos de la progenie murieron como embriones; también se estudió qué alteraciones en la morfología externa del embrión se presentan en condiciones mutantes mediante la observación de cutículas. Además se hizo la comparación con los efectos en embriones mutantes desarrollados a partir de una contribución materna que no es mutante. Según los resultados, una mutación en *bs* genera: 1) letalidad en etapas embrionarias, la cual es mayor cuando la contribución materna también es mutante; 2) alteraciones que se relacionan con más de un proceso durante el desarrollo, y que en condiciones en las que la contribución materna también es deficiente, son más frecuentes aquellas que muestran que *bs* tiene una función importante para la formación de segmentos en el eje antero-posterior del embrión.

II. Antecedentes

2.1 Desarrollo embrionario

Para el estudio del desarrollo embrionario, éste suele dividirse en distintas etapas tomando procesos particulares de relieve como referencia. Esta división, útil para describir el desarrollo embrionario, es sólo práctica y no natural, y no debe de perderse la perspectiva de que muchos de estos eventos se traslapan temporalmente (Campos-Ortega y Hartenstein, 1997). Además, esta división ha permitido hacer comparaciones entre fenómenos que suceden en el desarrollo de especies distintas y se han encontrado algunas similitudes entre especies, lo que hace que las etapas generales en las que se divide el desarrollo embrionario, y que se describen a continuación, sean comunes a los metazoarios (Gilbert, 2003):

2.1.1. Blastulación. Una vez que ocurre la fertilización, el cigoto se divide, y las células resultantes continúan con divisiones mitóticas seriadas para la generación de más células, los *blastómeros*, que forman la *blástula*. A partir de esta estructura, y por procesos complejos que involucran migración celular, se originarán las capas germinales.

2.1.2 Gastrulación. Durante la gastrulación se forman las capas germinales, que son láminas de células que a su vez darán origen a las distintas estructuras del organismo maduro. Son tres capas: el ectodermo, del que se derivan las células que formarán el tejido nervioso y la piel; el mesodermo, que formará músculos, huesos, células de la sangre y riñones; y el endodermo, cuyas células constituirán los primordios del tubo digestivo, sus órganos relacionados y los pulmones.

2.1.3 Organogénesis. Las células de las capas germinales pasan por fenómenos de diferenciación y migración, que después de un proceso de maduración, generan los órganos y tejidos diferenciados.

2.2 *Drosophila melanogaster* ofrece características que la hacen útil como modelo experimental para estudiar el desarrollo

La regulación de los fenómenos celulares durante el desarrollo embrionario está dada por la expresión de un conjunto de genes y por las proteínas que codifican. Algunos de estos genes y proteínas tienen homólogos, tanto estructurales como funcionales, en distintas especies (Griffiths *et al.*, 2000). La formación del eje dorso-ventral ofrece un buen ejemplo: en *Drosophila melanogaster*, la mosca de la fruta; este eje se establece por oposición de gradientes de concentración entre Decapentaplegic y Short gastrulation, y en vertebrados, por la oposición de gradientes de concentración de sus homólogos, BMP4 y Chordina, respectivamente. Es interesante señalar que la orientación del eje dorso-ventral en invertebrados es inversa a la que ocurre en vertebrados, y de la misma manera, la distribución de los factores homólogos es inversa (Holley *et al.*, 1995). Así como este ejemplo, hay otros que permiten sugerir que aunque existen diferencias anatómicas entre especies, el desarrollo puede ser entendido por el estudio de las moléculas que intervienen en este proceso (St Johnston, 2002).

Básicamente, un considerable conjunto de genes reguladores identificados en *Drosophila*, y las proteínas reguladoras cifradas por ellos, están conservados en mamíferos y parecen gobernar procesos homólogos del desarrollo en muchos grupos de animales (Griffiths *et al.*, 2000). Esto representa una característica muy valiosa que subraya la importancia de *Drosophila* como un modelo experimental en aspectos del desarrollo. Además, este modelo cuenta con las siguientes ventajas: un tiempo de generación corto con una progenie numerosa, la facilidad y el bajo costo de su cultivo en un laboratorio, muy pocos casos de redundancia en la función de los genes y un genoma relativamente sencillo, conformado por cuatro cromosomas, que pueden observarse fácilmente en preparaciones de cromosomas politénicos de glándulas salivales de larvas. Además, el genoma está totalmente secuenciado (St Johnston, 2002).

2.3 Desarrollo embrionario de *D. melanogaster*

El ciclo de vida de *D. melanogaster* comprende un periodo embrionario seguido de tres estadios larvares, uno pupario y el periodo adulto, al que se llega al décimo día después de la fertilización (Ashburner, 2005) (fig. 1).

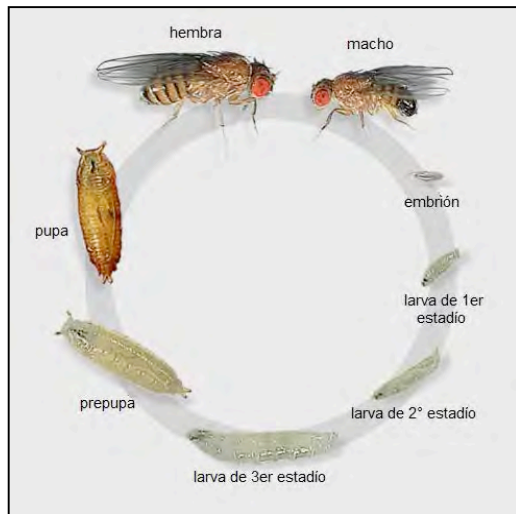


Fig. 1 Ciclo de vida de *D. melanogaster* (tomado y modificado de Weigmann *et al.*, en prensa).

El desarrollo embrionario dura alrededor de 24 horas, y para su estudio se ha dividido en las siguientes etapas (Campos-Ortega y Hartenstein, 1997):

2.3.1 Blastulación. Después de la fertilización, el núcleo del cigoto se divide trece veces sin división celular, en un tiempo aproximado de tres horas. Hacia el final de este periodo y mientras se encuentran en sus rondas de división, la mayoría de estos núcleos migra a la periferia del cigoto en el periodo conocido como *blastodermo sincitial*. Después, a partir de la membrana del cigoto se forman invaginaciones que rodean individualmente a la mayoría de los núcleos y se celularizan, y con esto se forma el *blastodermo celular* (fig. 2).

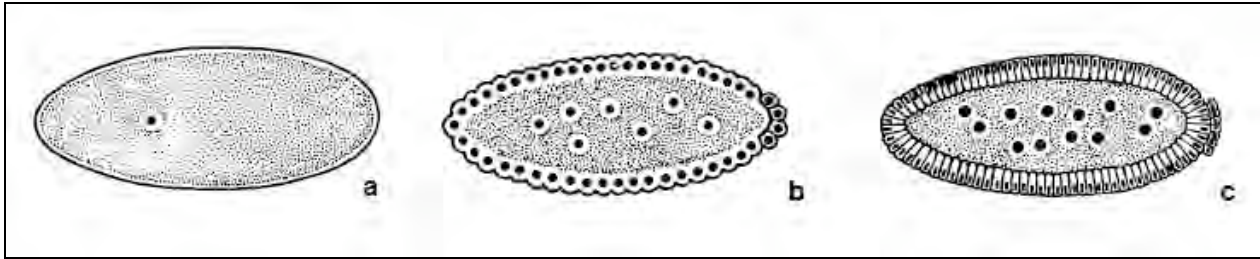


Fig. 2 Embriones de *D. melanogaster* durante la etapa de blastulación. **a.** Cigoto. **b.** Blastodermo sincitial. **c.** Blastodermo celular. La región anterior de los embriones apunta hacia la izquierda (tomado y modificado de Foe y Alberts, 1986).

2.3.2 Gastrulación y elongación y retracción de la banda germinal. La gastrulación inicia cuando en la porción ventral del embrión, un grupo de células en el eje longitudinal se invagina para formar el mesodermo. Posteriormente, células en posiciones anterior y posterior a las que formarán el mesodermo se invaginan para formar la parte anterior y posterior del endodermo (fig. 3a). Después, las células del mesodermo y del ectodermo ventral, que en conjunto se conocen como la *banda germinal*, comienzan a migrar en una dirección postero-dorsal respecto a los ejes embrionarios; a este fenómeno se le conoce como *elongación de la banda germinal*, y se continúa con la *retracción de la banda germinal* (fig. 3b). Después de la retracción de la banda germinal, en la epidermis se notan hendiduras que demarcan los 14 segmentos metaméricos del embrión. En cada uno de ellos se forma un patrón de elementos derivados del mesodermo y del ectodermo: músculos, tráqueas (componentes del sistema respiratorio), nervios periféricos y epidermis. Estos segmentos corresponden a regiones anatómicas del adulto: 3 segmentos para la cabeza, 3 torácicos y 8 abdominales. Además, las porciones terminales del embrión no son metaméricas: la parte terminal anterior es el acron, y la posterior es el telson (fig. 4).

2.3.3 Cerrado dorsal e involución de la cabeza. Después de la retracción de la banda germinal, la región dorsal del embrión se encuentra abierta, recubierta por la amnioserosa, un tejido extraembrionario. Durante los procesos finales de la embriogénesis, el primordio del epitelio dorsal se extiende y se fusiona en la línea media dorsal para cubrir esta apertura, proceso conocido como *cerrado dorsal* (fig. 3c).

Además, los segmentos metaméricos de la cabeza se internalizan, proceso conocido como *involución de la cabeza*.

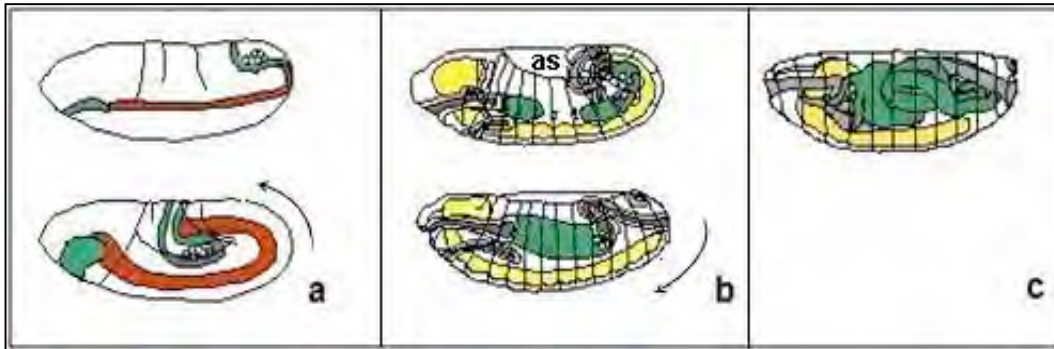


Fig. 3 Gastrulación y cerrado dorsal en embriones de *D. melanogaster*. **a.** En la parte ventral del embrión ocurre una invaginación de células que formarán el mesodermo (en rojo), y en los extremos anterior y posterior del mesodermo se invaginan células que formarán el endodermo (en verde). La capa germinal exterior, el ectodermo (no marcado con color), se encuentra rodeando al embrión. Durante la elongación de la banda germinal ocurre un movimiento de células en dirección postero-dorsal (indicado con la flecha). **b.** Después de la retracción de la banda germinal (dirección del movimiento indicado con la flecha) se evidencia el patrón de segmentos metaméricos en el eje antero-posterior, y la región dorsal queda abierta, cubierta por la amnioserosa (as). **c.** Al final del desarrollo embrionario, la amnioserosa queda cubierta por el primordio del epitelio dorsal. La región anterior de los embriones apunta hacia la izquierda, la parte dorsal apunta hacia arriba (tomado y modificado de Campos-Ortega y Hartenstein, 1997).

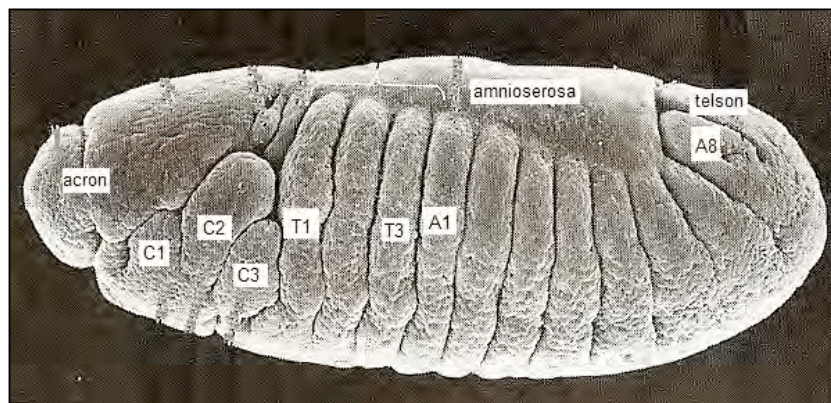


Fig. 4 Micrografía electrónica de barrido de un embrión de *D. melanogaster* durante la retracción de la banda germinal. Los segmentos metaméricos están definidos por cada uno de los surcos intersegmentarios y corresponden a regiones anatómicas que se forman en el adulto: tres corresponden a estructuras de la cabeza (C1-C3), tres corresponden al tórax (T1-T3) y ocho corresponden a la región abdominal (A1-A8); además, se indican: la amnioserosa, que es un tejido que recubre la apertura que se forma en la región dorsal tras la retracción de la banda germinal, y las porciones no metaméricas del embrión: la anterior, o acron, y la posterior, o telson. Hacia las últimas etapas del desarrollo embrionario, los segmentos de la cabeza se internalizan, por lo que al final, en el exterior del embrión sólo pueden verse los segmentos torácicos y los abdominales (modificado de Gilbert, 2003).

2.4 Contribución materna

La sucesión en el tiempo y en el espacio de los eventos durante el desarrollo embrionario depende de una serie de genes de control, o genes reguladores, que actúan de un modo jerárquico; esto es, la expresión de un grupo de genes depende de la activación previa de otro grupo de genes, siendo los primeros en esta jerarquía los genes expresados por la madre durante la ovogénesis y cuyos productos, la *contribución materna* (ARNm y proteínas) quedarán depositados en el ovocito durante su maduración en el tracto reproductor (Pankratz y Jäckle, 1993). El contenido de la contribución materna se reparte en el citoplasma celular, formando gradientes de concentración para algunos de estos productos de expresión génica. De estos gradientes dependen los primeros eventos en la formación del embrión, en los que se da el establecimiento de las regiones anterior, posterior y terminales en el eje antero-posterior, y de las regiones ventral y dorsal en el eje dorso-ventral. Así, se dice que el ARNm y las proteínas depositadas en el huevo resultan de la expresión de *genes de efecto materno* (Gilbert, 2003). Las proteínas codificadas por los genes de efecto materno, que son factores de transcripción, conducen a la expresión de los *genes de segmentación*, de los cuales hay cuatro grupos. Un grupo de genes de segmentación regula a su vez la expresión de otro grupo de genes de segmentación, en patrones de expresión cada vez más restringidos espacialmente, y cuyo resultado final es que una combinación particular de genes expresados en una región del embrión regula la formación de las estructuras específicas de la misma (Gilbert, 2003).

2.5 El gen *blistered* (*bs*)

Se ha encontrado que el gen *blistered* (*bs*) de *D. melanogaster* tiene una función importante durante el desarrollo (Affolter *et al.*, 1994; Fristrom *et al.*, 1994; Guillemin *et al.*, 1996; Montagne *et al.*, 1996). Los primeros alelos mutantes que se estudiaron presentan una viabilidad disminuida; en los adultos que logran desarrollarse se observan ampollas en las alas (*blister* es la palabra en inglés para *ampolla*) y un aumento en el número y en el grosor de las venas de las alas. Cuando se ha inducido la formación de clones celulares mutantes para *bs* en el ala en desarrollo se encuentran en ellas características de vena y no de intervena, por lo que, se sugiere, *bs* participa

en el primordio del ala como factor regulador que determina la diferenciación hacia intervenas, que son epitelios con uniones adherentes, a diferencia de las venas, que derivan de epitelios que no se adhieren (Fristrom *et al.*, 1994). Al comparar el efecto de las mutaciones en *bs* en fondos genéticos mutantes para otros genes que participan en la diferenciación de los epitelios del ala, se ha sugerido que *bs* podría estar funcionando como un regulador de la actividad de algunos de ellos, como *rhomboïd* y *Notch* (Fristrom *et al.*, 1994).

Por otra parte, se ha encontrado una función de *bs* en la formación del sistema respiratorio de la mosca (sistema traqueal). Se ha demostrado la expresión de *bs* en las células que forman la punta de las ramas traqueales principales durante la formación del sistema traqueal en etapas embrionarias (Affolter *et al.*, 1994). En alelos de *bs* que son letales en etapas larvianas, se encuentra una menor densidad de las ramas traqueales terminales (ramas finas, secundarias), que son prolongaciones de las ramas traqueales principales y que se forman para alcanzar a los distintos tejidos y proveerlos de oxígeno (Guillemin *et al.*, 1996). Además, se han reportado otros alelos de *bs* que son letales como homocigotos, tanto en etapas larvianas como en etapas embrionarias, sin que se haya ofrecido hasta el momento una explicación para ello (Fristrom *et al.*, 1994).

El interés por caracterizar el efecto de mutaciones en *bs* comenzó porque se encontró que es el homólogo en *Drosophila* del gen en vertebrados que codifica para el factor de respuesta al suero (Serum Response Factor o SRF) (Cahill *et al.*, 1996). SRF pertenece a una familia de reguladores transcripcionales, la familia de la caja MADS (por MCM1-AG-DEFA-SRF, que son cuatro de los miembros de esta familia) (Shore y Sharrocks, 1995). La caja MADS es un motivo proteico con una secuencia de 56 aminoácidos que se halla conservada en organismos filogenéticamente distantes, desde plantas hasta animales. En la mitad amino-terminal de la caja MADS se encuentran de manera predominante residuos con carga positiva (histidina, arginina y lisina), y que están implicadas en la unión a secuencias específicas en el ADN. La región carboxilo-terminal de la caja es necesaria para formar homodímeros y para interactuar con otras proteínas (Wynne y Treisman, 1992). En los sitios en los que se

une al ADN, SRF forma complejos ternarios con proteínas accesorias, cuya actividad parece estar regulada por fosforilación, a su vez modulada ésta por factores de crecimiento (Affolter *et al.*, 1994). Este último hecho parece ser común a varios de los miembros de la familia de la caja MADS (Shore y Sharrocks, 1995). Se ha mostrado también la participación de SRF en la activación de genes de respuesta temprana, como *c-fos* (Montagne *et al.*, 1996).

Se han encontrado aspectos que relacionan a SRF con funciones en el desarrollo. El homólogo en *Xenopus laevis* se expresa en el huevo no fertilizado y después en niveles cada vez mayores durante la gastrulación (Mohun *et al.*, 1991), específicamente en el mesodermo embrionario y en el músculo del renacuajo (Chambers *et al.*, 1992). En el desarrollo del ratón se ha encontrado la expresión de SRF en las células endoteliales de los vasos capilares. Cuando la expresión de SRF se bloquea específicamente en estas células se genera letalidad embrionaria en el día 14.5, obteniéndose una densidad capilar reducida y fallas en la migración de las células endoteliales, un fenómeno muy parecido al que se encuentra en mutantes de *bs* respecto a la formación del sistema traqueal, y cuyo patrón de formación es muy similar al de la vasculatura de vertebrados (Guillemin *et al.*, 1996). En experimentos *in vitro*, la angiogénesis inducida por VEGF y FGF no ocurre si se bloquea la función de SRF (Franco *et al.*, 2008).

Estos antecedentes muestran que en distintas especies, SRF y sus homólogos, incluyendo *bs*, tienen funciones importantes en el desarrollo. Además, se ha encontrado que el ARNm y la proteína codificados por *bs* se distribuyen de manera uniforme en los huevos de *Drosophila* no fecundados (Affolter *et al.*, 1994); por lo tanto, hay contribución materna del gen. Esto permite sugerir que la función de *bs* es importante para eventos que ocurren en etapas muy tempranas del desarrollo embrionario. Sin embargo, este aspecto no se ha explorado hasta ahora. La expresión de *bs* se detecta también al inicio de la embriogénesis, y desaparece gradualmente durante la celularización y la elongación de la banda germinal, para reaparecer después de la retracción de la banda germinal (Affolter *et al.*, 1994).

III. Justificación

Con base en estos antecedentes, en el presente trabajo nos dimos a la tarea de buscar evidencias sobre la función de la contribución materna de *bs*, para aportar información que ayude a entender a mayor detalle cuál es el papel de este factor de transcripción en el desarrollo embrionario de *Drosophila*. Dada la conservación evolutiva de mecanismos que intervienen en el desarrollo, *Drosophila* ha sido un modelo genético de estudio que ha permitido comprender varios aspectos del desarrollo de otras especies. En nuestro trabajo observamos el fenotipo de embriones mutantes para *bs*, determinando la letalidad y las alteraciones morfológicas resultantes, para buscar el efecto durante el desarrollo de una falla en la función de este gen y tener evidencia para conocer en qué tiempo y en cuáles estructuras se necesita de la participación de *bs*. Y después hicimos la comparación con el fenotipo de embriones mutantes que además se desarrollaron a partir de una contribución materna de *bs* también mutante, para entender cuál es la función de la contribución materna de este gen.

IV. Hipótesis

Una alteración en la contribución materna del gen *bs* produce letalidad en etapas embrionarias tempranas del desarrollo de *Drosophila melanogaster*.

V. Objetivos

General

Estudiar la función de la contribución materna de *bs* en el desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster*.

Específicos

- Analizar la letalidad en etapas embrionarias asociada al desarrollo de individuos a partir de una contribución materna mutante para *bs*.
- Analizar las alteraciones morfológicas asociadas con el desarrollo de embriones a partir de una contribución materna mutante para *bs*.
- Analizar y comparar los fenotipos de embriones mutantes para *bs* cuando se desarrollan a partir de una contribución materna también mutante con embriones mutantes con una contribución materna no alterada.

VI. Material y métodos

6.1 Cepas de estudio

Se usaron tres alelos mutantes de *bs*: bs^{P1292} , bs^{2R14} y bs^{k7} , los cuales son letales como homocigotos. Estos alelos se encuentran en heterocigosis con un cromosoma balanceador (*bal*). Este balanceador es un cromosoma modificado que es letal en homocigosis y que evita la recombinación homóloga; por lo tanto, no se pierde el alelo mutante, y además, permite el seguimiento del mismo porque también contiene una mutación dominante que produce un fenotipo fácilmente identificable (alas curvas). Para asegurar que el efecto mutante se debe específicamente a *bs*, además de generar cruza entre individuos con el mismo alelo mutante de *bs*, se efectuaron cruza entre los distintos alelos (*cruzas interalélicas*).

6.2 Generación de clones de línea germinal (CLG)

Para poder analizar embriones que se desarrollan a partir de una contribución materna mutante para *bs*, se generaron clones de células de línea germinal (CLG) homocigotos mutantes para *bs* en hembras heterocigotas, de manera que los huevos producidos por estas hembras tuvieran un contenido deficiente del gen. Esto se logró siguiendo la técnica FLP-DFS (por FLiPase target site-specific recombinase-Dominant Female Sterile), que permite la generación de CLG en hembras heterocigotas para la mutación *ovo^{D1}*. Esta mutación es dominante y causa esterilidad en hembras. Sólo las células germinales que eliminan esta mutación por eventos de recombinación, y por lo tanto que sean homocigotas para el cromosoma homólogo, conducirán a la formación de huevos. La frecuencia de eventos de recombinación se incrementa notablemente por una recombinasa sitio-específica/flipasa de sitios de recombinación (FLP) cuya expresión se halla bajo el control del promotor de *hsp70* y que reconoce y cataliza la recombinación de sitios específicos de recombinación para la FLP (FLP Recombination Target o FRT) entre cromosomas homólogos (Chou y Perrimon, 1996). Para la generación de los CLG de *bs* se utilizaron alelos mutantes de *ovo^{D1}* contenidos en el

mismo brazo del cromosoma que contiene al locus de *bs*, de modo que las únicas células de línea germinal que no tienen una copia de *ovo*^{D1}, y por lo tanto las únicas que conducen a la formación de huevos, son las homocigotas mutantes para *bs* (fig. 5).

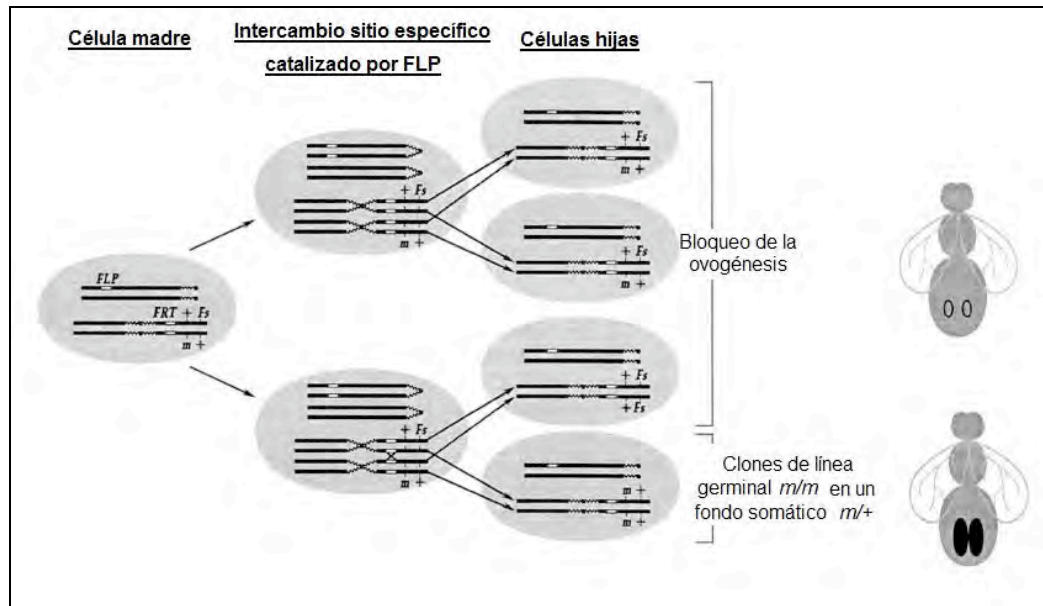


Fig. 5 Esquema en el que se representa la secuencia de eventos para generar CLG mediante la técnica FLP-DFS. FLP permite el intercambio sitio-específico de segmentos cromosomales reconociendo el sitio FRT, lo que permite la recuperación de hembras *m/+* con clones de línea germinal *m/m*. FLP, gen para la recombinasa sitio-específica/flipasa de sitios de recombinación bajo el promotor de *hsp70*; FRT, sitio de recombinación de la FLP; *F_s*, mutación que produce esterilidad en hembras; *m*, mutación recesiva letal (modificado de Chou y Perrimon, 1996).

Se cruzaron hembras vírgenes $\frac{bs}{bal}$ con machos $\frac{ovo^{D1}}{bal}$. Para inducir la expresión de la recombinasa sitio-específica/flipasa en la progenie, las larvas en el primer día del tercer estadio que resultaron de esta cruce se sometieron a un choque térmico, en un baño de agua a 36° C por 1 h. Una vez que eclosionaron, se seleccionaron hembras vírgenes $\frac{bs}{ovo^{D1}}$ (el genotipo se puede deducir por marcadores fenotípicos) y se cruzaron con machos $\frac{bs}{bal}$ para lograr obtener embriones que se desarrollaron a partir de una contribución materna mutante para *bs* (fig. 6).

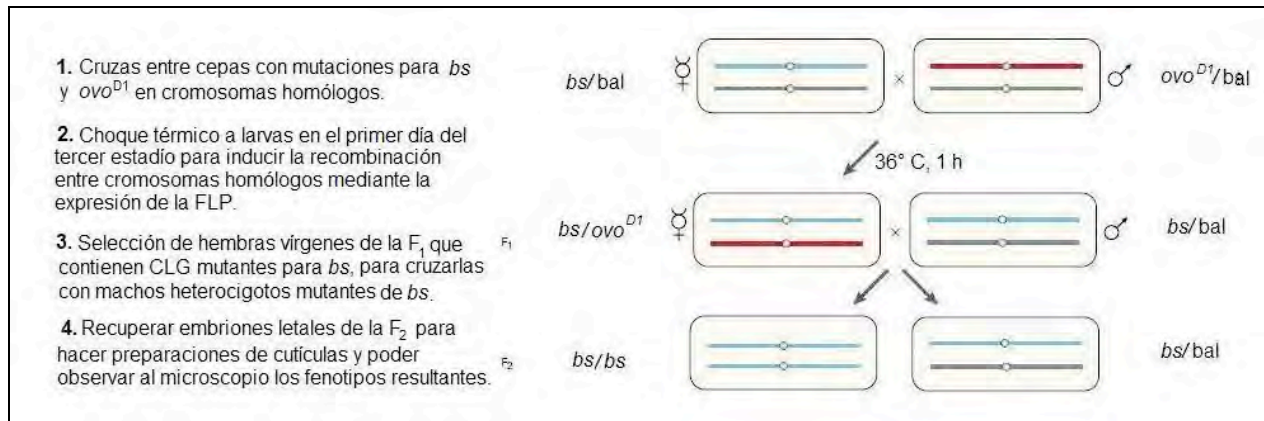


Fig. 6 Esquema en el que se resume el protocolo experimental para la generación de embriones derivados de CLG.

6.3 Determinación de letalidad embrionaria

Para determinar cuántos individuos resultantes de una cruce mueren en etapa embrionaria, se colocaron moscas adultas machos y hembras de los genotipos adecuados dentro de un vaso de plástico cuya boca se cubrió con una placa conteniendo un medio a base de agar y jugo de fruta. El vaso se colocó con la boca hacia abajo, de manera que el fondo del vaso quedó hacia arriba, y al cual se le hicieron unas pequeñas perforaciones para permitir el paso de aire. Se esperó un tiempo aproximado de 24 h para que en la placa hubiera un número suficiente de embriones. Se removió el vaso, y los embriones en la placa se mantuvieron a condiciones estándar de laboratorio (25° C y humedad relativa del 50%) para que continuaran su desarrollo por al menos dos días (el desarrollo embrionario dura sólo uno). Se revisaron las placas durante el transcurso de este tiempo y las larvas que se encontraron fueron retiradas y contabilizadas. Al término de los dos días se contabilizó cuántos huevos contenidos en las placas mostraron una coloración café característica de un embrión muerto en estado de descomposición. Al final, se determinó qué porcentaje representa el número de embriones muertos respecto a la progenie total (la suma tanto de embriones como de larvas resultantes de la cruce).

6.4 Preparación de cutículas embrionarias

El epitelio embrionario secreta una cutícula que envuelve al embrión y que está constituida por proteínas y carbohidratos. Esta cutícula constituye el exoesqueleto. Las preparaciones de cutículas son útiles para observar defectos físicos que derivan de una mutación.

Se recuperaron los embriones muertos y se sumergieron en una solución de cloro al 50% para retirar la membrana coriónica. Después, para degradar la membrana vitelina, se sumergieron en una mezcla de heptano:metanol:EGTA 0.5 M en una proporción 1:1:0.1 (v/v/v), agitándolos vigorosamente por 2 min. Este paso se repitió dos veces más utilizando sólo metanol. Enseguida, se rehidrataron los embriones en una solución de PBS con 0.1% de Triton. Se montaron los embriones en un portaobjetos, recubriéndolos con líquido de Hoyer, o alternativamente, con una preparación de polivinil alcohol (ambas sirven para degradar los tejidos blandos, de modo que se recupere únicamente la cutícula embrionaria). Se cubrieron con un cubreobjetos y se colocaron en una placa a 30° C toda la noche para dejar actuar el líquido de Hoyer (o en su caso el polivinil alcohol). Las observaciones de las cutículas se efectuaron en un microscopio óptico en campo oscuro.

6.5 Análisis estadístico

Para la comparación de las frecuencias de fenotipos entre las cutículas de embriones mutantes y embriones mutantes derivados además de CLG mutantes se llevó a cabo una prueba T de Student, con valor de $\alpha = 0.05$. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa Prism 5[®], versión 5.00, desarrollado por GraphPad Software, Inc.

VII. Resultados

7.1 Determinación de letalidad embrionaria en mutantes para *bs*

Se han reportado alelos mutantes de *bs* que resultan ser letales en distintas etapas del desarrollo, sin que se tenga una explicación clara hasta el momento sobre la causa de esto (Fristrom *et al.*, 1994). Como primer paso en este trabajo, nos dimos a la tarea de determinar si los alelos mutantes de *bs* con los que contamos son letales en la etapa embrionaria, colectando los embriones resultantes de una cruce $\frac{bs}{bal} \times \frac{bs}{bal}$ y contando cuántos mueren como embriones.

Los alelos de *bs* con los que se trabajó están mantenidos en heterocigosis con un cromosoma balanceador (*bal*) (véase Cepas de estudio en Material y métodos); por lo tanto, en el resultado de una cruce $\frac{bs}{bal} \times \frac{bs}{bal}$ se esperan individuos tanto homocigotos para *bs* como homocigotos para el balanceador (tabla 1); los dos casos producen letalidad. Para poder discriminar qué porcentaje de los embriones resultantes de esta cruce mueren únicamente por el efecto de la homocigosis de *bs*, se determinó en un experimento separado cuál es la letalidad que resulta únicamente de la homocigosis del cromosoma balanceador. Esto se llevó a cabo contando cuántos individuos que resultan de una cruce $\frac{bal}{+} \times \frac{bal}{+}$ mueren en etapas embrionarias, y se determinó que este número representa el 15.2% (fig. 7).

Tabla 1 Cuadro de Punnett en el que se analiza la letalidad teórica en embriones mutantes para <i>bs</i>		
	<i>bs</i>	cromosoma balanceador
<i>bs</i>	letal	viable
cromosoma balanceador	viable	letal

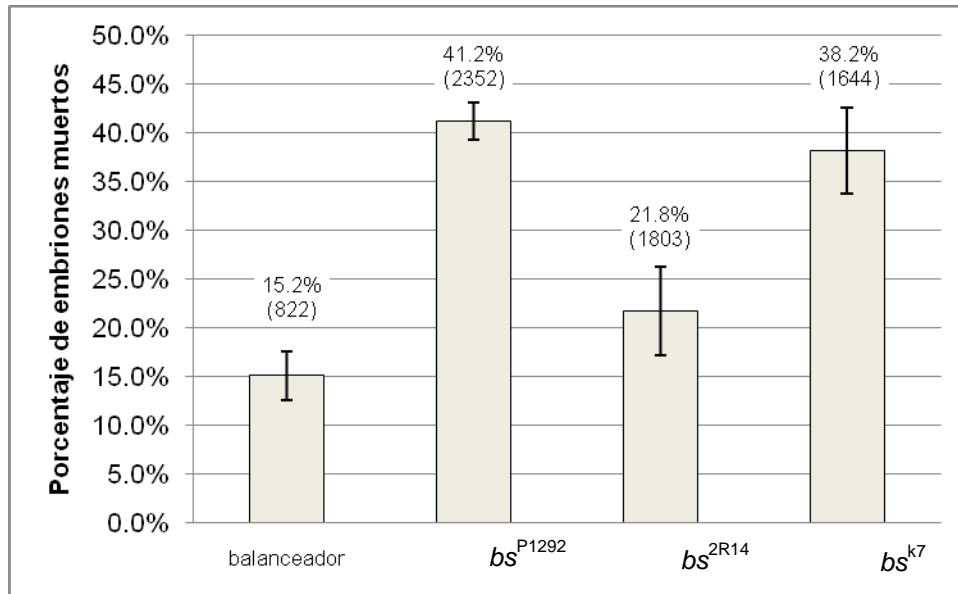


Fig. 7 Letalidad en embriones mutantes para *bs*. Se muestra el promedio de los porcentajes de embriones muertos que resultaron de cruza entre sujetos heterocigotos para cada uno de tres alelos mutantes: bs^{P1292} , bs^{2R14} y bs^{k7} . Estos alelos se encuentran en heterocigosis con un cromosoma balanceador (ver Cepas de estudio en Material y métodos). También se muestra la letalidad en embriones que resultaron de la cruza entre sujetos heterocigotos para el cromosoma balanceador, el cual se encuentra en heterocigosis con un cromosoma silvestre. Se indica el error estándar y entre paréntesis el número de embriones analizados.

Enseguida se determinó la letalidad embrionaria en cruza $\frac{bs}{bal} \times \frac{bs}{bal}$ para los tres alelos de *bs* (fig. 7). Los porcentajes de letalidad en relación con los tres alelos rebasan la letalidad esperada únicamente por homocigosis del cromosoma balanceador, con lo cual se muestra que la homocigosis de estos tres alelos de *bs* produce letalidad en embriones. El porcentaje de letalidad debido únicamente a la homocigosis de *bs*, que se obtiene restando la letalidad debida al cromosoma balanceador de la letalidad que resulta de las cruza $\frac{bs}{bal} \times \frac{bs}{bal}$, alcanza valores cercanos al 25% (tabla 2), que es el máximo teórico si todos los individuos homocigotos para *bs* murieran en etapa embrionaria (tabla 1). Esto es cierto para dos alelos, bs^{P1292} y bs^{k7} , lo cual sugiere que estos alelos se relacionan con una falla importante en la función del gen, por lo que podrían ser alelos hipomorfos fuertes o alelos nulos, a diferencia del alelo bs^{2R14} , que se relacionaría con una falla parcial, una condición hipomorfa.

Tabla 2 Letalidad en etapa embrionaria debida a la homocigosis de alelos mutantes de <i>bs</i>			
alelo mutante de <i>bs</i>	A letalidad total	B letalidad debida a $\frac{bal}{bal}$	A-B letalidad debida a $\frac{bs}{bs}$
<i>bs</i> ^{P1292}	41.2 ± 2.0%	15.2 ± 2.5%	26.0 ± 3.7%
<i>bs</i> ^{2R14}	21.8 ± 1.3%	15.2 ± 2.5%	6.6 ± 2.79%
<i>bs</i> ^{k7}	38.2 ± 4.4%	15.2 ± 2.5%	23.0 ± 5.06%

bal= cromosoma balanceador; se indica el error estándar

Existe el reporte de que hay contribución materna de *bs* (Affolter *et al.*, 1994), lo cual sugiere un requerimiento muy temprano del gen. Teniendo en cuenta que los datos de letalidad embrionaria que se presentan arriba se deben a una deficiencia en la expresión de *bs* por el genoma del cigoto, buscamos si la letalidad que encontramos en mutantes para *bs* aumenta en embriones mutantes en los que además la contribución materna del gen también está alterada, la cual depende de una deficiencia en la expresión de *bs* por el genoma de la madre. Para ello, se generaron clones de línea germinal (CLG) mutantes homocigotos para *bs* en hembras heterocigotas, de manera que los huevos que generaran estas hembras tuvieran una contribución materna mutante para *bs*. Se efectuaron cruces entre estas hembras y machos heterocigotos $\frac{bs}{+}$, para generar *mutantes derivados de CLG*, en los que la letalidad teórica debida a homocigosis de *bs* es del 50% (tabla 3).

Tabla 3 Cuadro de Punnett en el que se analiza la letalidad teórica en la etapa embrionaria de mutantes derivados de CLG de <i>bs</i>		
	<i>bs</i>	bal
<i>bs</i>	letal	viable

bal= cromosoma balanceador

Tal como se esperaba, la letalidad en embriones derivados de CLG aumenta en comparación con la letalidad debida a una deficiencia únicamente en la expresión cigótica del gen (fig. 8). Esto es cierto para los alelos bs^{2R14} y bs^{k7} . Para el alelo bs^{k7} , la letalidad superó el valor máximo teórico, revelando que todos los homocigotos murieron, e inclusive algunos de los heterocigotos, que aún teniendo una copia normal del gen, murieron debido a la deficiencia en la contribución materna del gen. Por otra parte, aunque la letalidad para el alelo bs^{2R14} en comparación a la que se obtuvo para los mutantes cigóticos fue mayor, no llegó al valor máximo, apoyando la idea de que este alelo se relaciona con una pérdida parcial de la función del gen.

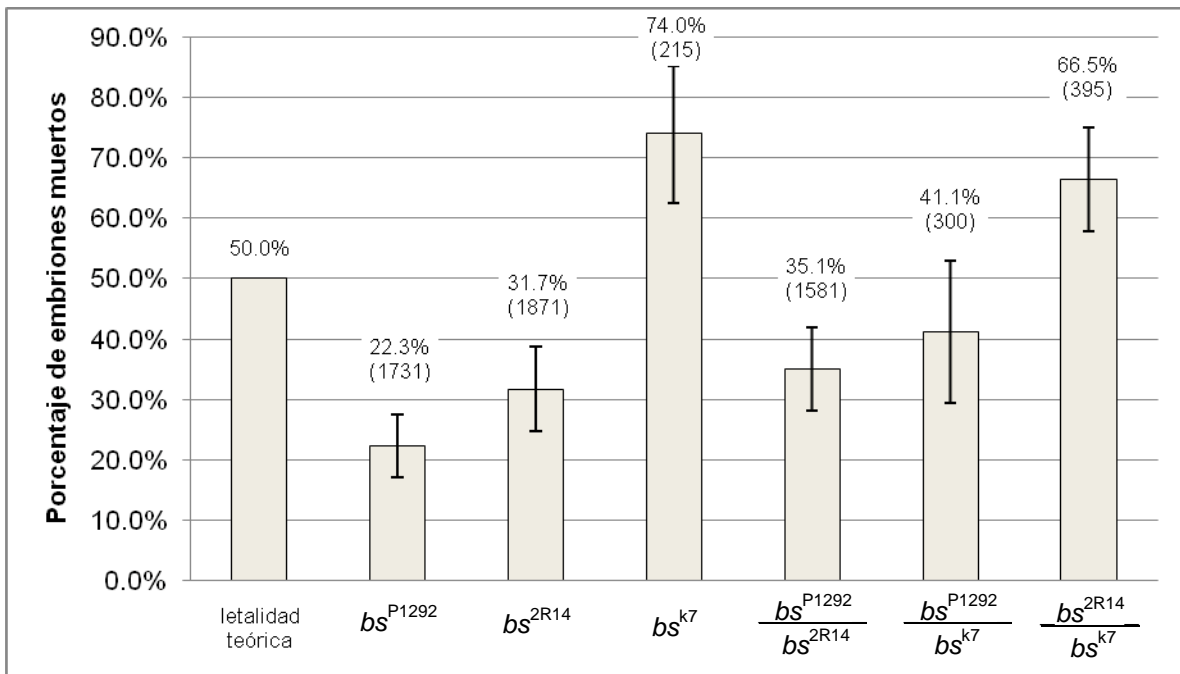


Fig. 8 Letalidad en embriones derivados de CLG mutantes para *bs*. Se muestra el promedio de los porcentajes de embriones muertos que resultaron de cruza entre hembras que fueron sometidas al tratamiento para crear CLG, con machos heterocigotos mutantes para *bs*. Se analizaron los mismos alelos de *bs* que se utilizaron para determinar la letalidad en embriones mutantes (fig. 7). Se indica el error estándar y entre paréntesis el número de embriones analizados.

Se obtuvo un resultado conflictivo para el alelo bs^{P1292} . La proporción de letalidad en embriones derivados de CLG es menor que cuando únicamente es deficiente la expresión cigótica. Como posible explicación pensamos que ocurre lo siguiente: dado que para determinar la letalidad embrionaria se contaron los huevos con una coloración

café (característica de un embrión de mosca en proceso de descomposición), y no se tomaron en cuenta los huevos que permanecieron blancos (que es característico de los huevos no fecundados), existe la posibilidad de que algunos embriones derivados de CLG mutantes para este alelo de *bs* no alcancen a llegar a la etapa de blastodermo celular, y que mueran en la etapa de blastodermo sincitial, y que en un embrión de esa etapa el proceso de descomposición no sea evidente mediante su coloración. Para esto es necesario realizar experimentos en los que se marquen con un colorante los núcleos celulares, para conocer si estos huevos que no se contaron tienen más de un núcleo, lo que indicaría que sí son embriones y que no son huevos no fecundados.

7.2 Caracterización de fenotipos mutantes de *bs*

La cutícula embrionaria de *Drosophila*, segregada por el epitelio en la etapa embrionaria, sirve como registro de la constitución externa del embrión, por lo que las alteraciones derivadas de una mutación genética pueden observarse en ella, siempre y cuando estas mutaciones produzcan una alteración obvia en la morfología externa del embrión, algo que es frecuente cuando las mutaciones afectan procesos tempranos.

7.2.1 Fenotipos en embriones mutantes para *bs*

Se hicieron preparaciones de cutículas de embriones muertos que resultaron de cruces entre individuos heterocigotos para alelos mutantes de *bs*, tales como las que se describen en la fig. 7. Los fenotipos que se encontraron con más frecuencia fueron (tabla 4, fig. 9): ausencia (fig. 9b) o desorganización de los segmentos (fig. 9c), apertura dorsal (fig. 9d) y fallas en la involución de la cabeza (fig. 9e).

Estos datos sugieren que *bs* tiene más de una función en el desarrollo: podría estar actuando en una etapa muy temprana, participando en la determinación de los segmentos metaméricos, y además podría estar actuando en las últimas etapas, durante el cerrado dorsal y la involución de la cabeza. Esto se relaciona bien con lo reportado acerca del patrón de expresión de *bs* durante el desarrollo embrionario, en el

que se observa contribución materna del gen, que sugiere actúa en etapas tempranas del desarrollo (la determinación de los segmentos metaméricos es un proceso temprano); después, una disminución de la expresión en la etapa intermedia del desarrollo, y la reaparición de su expresión justo después de la retracción de la banda germinal (en una etapa inmediatamente anterior al proceso de cerrado dorsal e involución de la cabeza) (Affolter *et al.*, 1994).

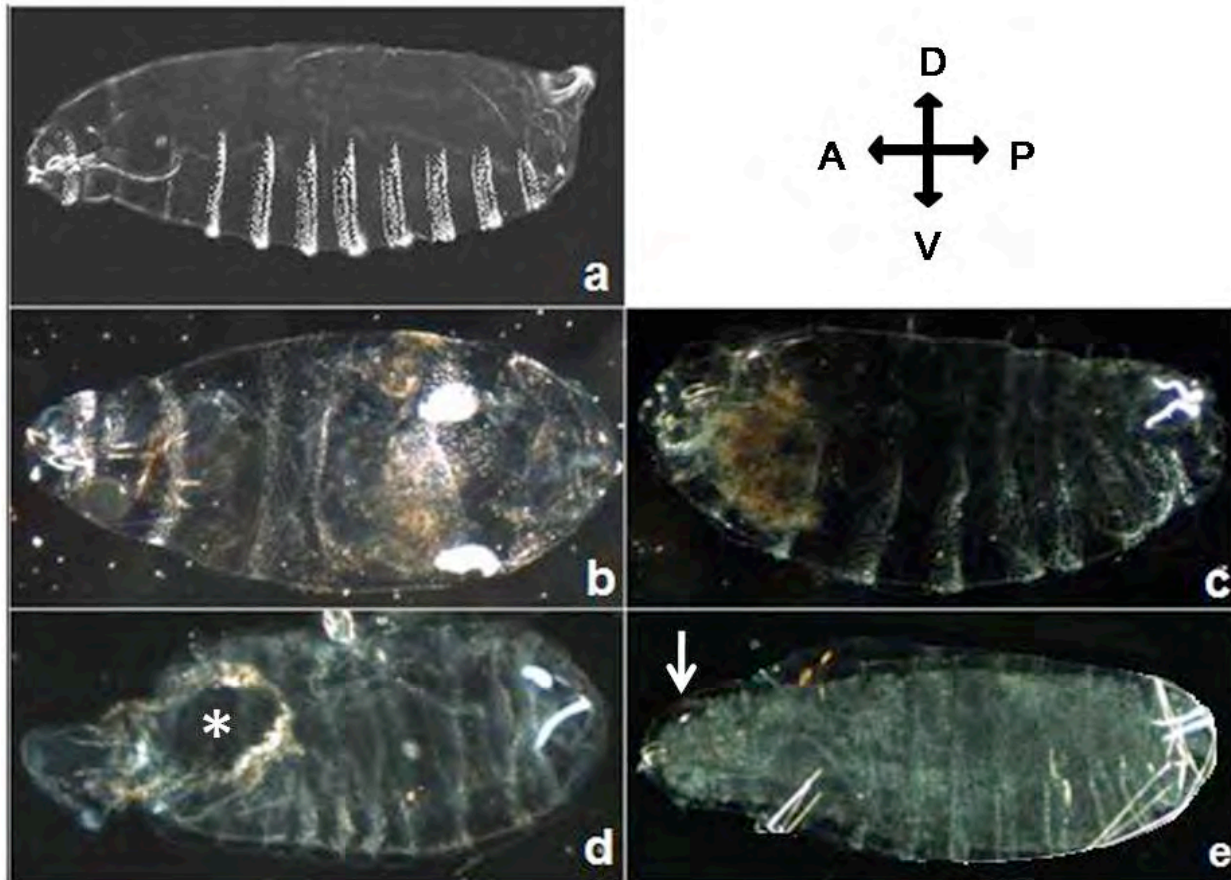


Fig. 9 Fenotipos observados en las cutículas analizadas: **a.** Cutícula embrionaria sin defectos. **b.** Ausencia de segmentos. **c.** Desorganización de segmentos. **d.** Apertura dorsal (con el asterisco se indica el agujero en la región dorsal del embrión). **e.** Falla en la Involución de la cabeza (la flecha indica la porción de la cabeza del embrión que normalmente involucre). Las fotografías son representativas de cada uno de los fenotipos.

Tabla 4 Fenotipos más frecuentes en embriones mutantes para <i>bs</i>			
fenotipo	<i>bs</i>^{P1292} (n=139)	<i>bs</i>^{2R14} (n=28)	<i>bs</i>^{k7} (n=105)
falta de segmentos	12.2%	21.4%	10.5%
desorganización de segmentos	9.4	14.3%	5.7%
apertura dorsal	13.7%	3.6%	5.7%
falla en la involución de la cabeza	48.9%	3.6%	32.4%

Se muestran los porcentajes correspondientes a n embriones con fenotipos mutantes analizados. Sólo aparecen los fenotipos con los porcentajes de ocurrencia más altos, por lo tanto la suma total no es igual a 100%.

7.2.2 Fenotipos en CLG

Aunque el número de embriones derivados de CLG analizados fue bajo en comparación a los mutantes únicamente para la expresión cigótica, se encontró que los fenotipos más frecuentes son los mismos que los encontrados en los mutantes cigóticos; sin embargo, encontramos un hecho interesante: los porcentajes correspondientes a los fenotipos de ausencia de segmentos son significativamente mayores que en los mutantes cigóticos (tabla 5, fig. 10). Esto sugiere que la contribución materna de *bs* tiene un papel funcional importante en estos procesos.

Tabla 5 Fenotipos más frecuentes en embriones derivados de CLG mutantes para <i>bs</i>			
fenotipo	<i>bs</i>^{P1292}/<i>bs</i>^{2R14} (n=7)	<i>bs</i>^{2R14}/<i>bs</i>^{k7} (n=24)	<i>bs</i>^{P1292}/<i>bs</i>^{k7} (n=27)
falta de segmentos	28.6%	25.0%	29.6%
desorganización de segmentos	14.3%	16.7%	3.7%
apertura dorsal	28.6%	4.2%	14.8%
falla en la involución de la cabeza	28.6%	0.0%	3.7%

Se muestran los porcentajes correspondientes a n embriones con fenotipos mutantes. Sólo aparecen los fenotipos con los porcentajes de ocurrencia más altos, por lo tanto la suma total no es igual a 100%.

Además, otro hecho notable es que el fenotipo de falla en la involución de la cabeza tiene porcentajes de ocurrencia levemente menores en embriones derivados de CLG, lo que sugiere que una condición en la que se combina una alteración en la contribución materna de *bs* con una alteración en la expresión del gen por el cigoto, provoca que un número mayor de embriones muera en etapas tempranas del desarrollo, debido a la falta de la función temprana del gen, y no alcancen a llegar a etapas más tardías, como en las que ocurre la involución de la cabeza.

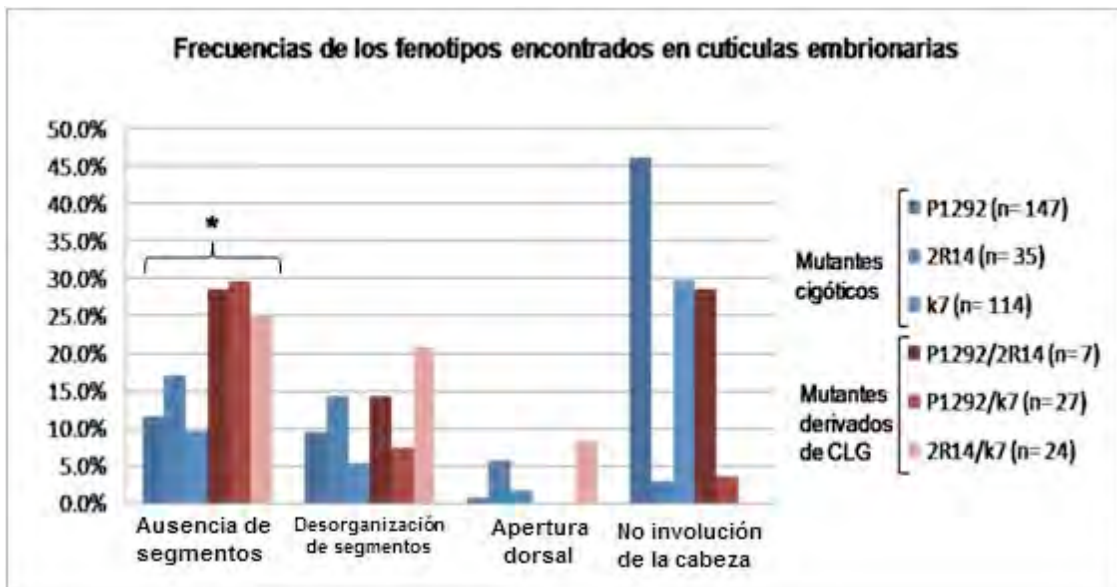


Fig. 10 Frecuencias de los fenotipos encontrados en las preparaciones de cutículas embrionarias. La comparación de las cutículas de embriones derivados de CLG y de mutantes cigóticos muestra, que para los primeros, la frecuencia de los fenotipos de ausencia de segmentos es significativamente mayor [$t(4)=5.661, p<0.05$]

VIII. Discusión

Las funciones del Factor de Respuesta al Suero (SRF) en vertebrados son diversas, y se han demostrado algunas de ellas en eventos del desarrollo embrionario, como la especificación del mesodermo, el desarrollo de los músculos esqueléticos (Arsenian *et al.*, 1998), los músculos cardíacos (Parlakian *et al.*, 2004), y la formación de los vasos capilares en el sistema vascular (Franco *et al.*, 2008).

En *Drosophila melanogaster* se ha encontrado un solo gen con homología a SRF, el gen *blistered* (*bs*) (Affolter *et al.*, 1994). Se sabe que *bs* tiene funciones en el desarrollo de la mosca, específicamente en el sistema respiratorio durante la embriogénesis (Guillemin *et al.*, 1996) y en el desarrollo del ala durante la metamorfosis (Fristrom *et al.*, 1994, Montagne *et al.*, 1996). La letalidad de algunos alelos en homocigosis y el reporte de que existe contribución materna de *bs* sugieren otras funciones, aún no exploradas, de *bs* en el desarrollo de *D. melanogaster* (Affolter *et al.*, 1994).

En este trabajo buscamos evidencias de la función de *bs* en procesos tempranos que ocurren en el desarrollo embrionario de *D. melanogaster*. Primero encontramos que dos de los alelos mutantes (bs^{P1292} y bs^{k7}) en homocigosis resultan ser letales con una penetrancia casi completa, y que otro de los alelos (bs^{2R14}) muestra letalidad parcial. Por lo tanto, la función de *bs* se necesita durante el desarrollo embrionario de *Drosophila*, y los alelos bs^{P1292} y bs^{k7} corresponden a una pérdida importante de la función del gen, lo que sugiere que estos alelos pueden ser hipomorfos fuertes o nulos, mientras que bs^{2R14} corresponde con una pérdida parcial, una condición que lo hace un hipomorfo débil. Para obtener información sobre cuál es la función de *bs* durante el desarrollo embrionario además de la que se ha demostrado en la formación del sistema traqueal (Guillemin *et al.*, 1996), se analizaron cutículas embrionarias a partir de cruces en las que se generaron embriones homocigotos mutantes para *bs*. Encontramos que los fenotipos más frecuentes relacionan a *bs* con funciones en más de una etapa del desarrollo: la segmentación metamérica, el cerrado dorsal y la involución de la cabeza. Tal como ocurre con SRF en vertebrados, *bs* es un gen pleiotrópico del desarrollo.

Además de estas funciones, la presencia de productos de expresión de *bs* en el huevo no fecundado permite sugerir que la actividad de este gen es relevante para eventos que ocurren en etapas muy tempranas del desarrollo embrionario. Buscando una evidencia de la función de la contribución materna de este gen, se generaron clones de células germinales homocigotas mutantes para *bs* en hembras heterocigotas, para que formaran huevos con una contribución materna mutante de *bs*. Los embriones desarrollados a partir de estos huevos entonces son deficientes no únicamente para la expresión cigótica del gen, sino que además lo son para la contribución materna de *bs*. Para uno de nuestros alelos fuertes, bs^{k7} , estos embriones son completamente letales en homocigosis, y más aún, algunos de los heterocigotos, aún teniendo una copia normal del gen, no sobreviven sin la contribución materna; así que *bs* es, al menos de manera parcial, haploinsuficiente, es decir, que una sola copia silvestre del gen no es suficiente para llevar a cabo su función de manera completa. Se conocen otros *loci*, como *decapentaplegic*, que presentan haploinsuficiencia (Wharton *et al.*, 1993). La letalidad del alelo débil, bs^{2R14} , también aumentó. Por lo tanto, la contribución materna de *bs* tiene una función importante durante el desarrollo.

Al analizar las cutículas de los embriones mutantes derivados de CLG, se encontraron los mismos fenotipos que cuando se altera únicamente la expresión cigótica del gen. Sin embargo, la proporción del fenotipo de ausencia de segmentos, que se relaciona con una etapa muy temprana del desarrollo embrionario, es mayor en estos mutantes en comparación con los mutantes únicamente para la expresión cigótica, lo que demuestra que una alteración en la reserva materna de *bs* provoca que un mayor número de embriones muera en etapas muy tempranas del desarrollo. Por lo tanto, se puede hablar de dos tipos de funciones de *bs* durante el desarrollo, uno muy temprano, cubierto mayoritariamente por la contribución materna, y uno posterior, dado en su mayoría por la expresión del genoma del cigoto.

Un dato conflictivo es el que se encontró para el alelo bs^{P1292} . Este alelo se comporta como un alelo fuerte en mutantes cigóticos, pero cuando además se quita la contribución materna, la letalidad resultó ser algo menor. La probable explicación es que se esté dejando fuera del conteo de embriones a aquellos huevos blancos que

normalmente se toman como huevos no fecundados, y que algunos de éstos en realidad sean embriones que murieron en una etapa muy temprana, en la que no alcanzaron a formar cutícula.

Un hecho muy interesante es que el fenotipo de ausencia de segmentos que se encontró principalmente en embriones derivados de CLG mutantes es común en mutaciones de genes gap, como el gen *Krüppel* y el gen *knirps*. Los genes gap son los primeros genes que expresa el genoma del cigoto, y son regulados por los genes de expresión materna, cuyos productos de expresión se encuentran depositados como contribución materna en el huevo durante la ovogénesis (Levine, 2008). Los genes gap codifican para factores de transcripción, y determinan la formación de zonas amplias (un número determinado de segmentos metaméricos) en el eje antero-posterior del embrión. La mutación de un gen gap genera un fenotipo de letalidad, en el que se observa que a los embriones les hace falta cierto número de segmentos metaméricos (Jürgens *et al.*, 1984). Por lo tanto, sería posible que la contribución materna de *bs* regulara la expresión de alguno de los genes gap, y que, en consecuencia, se obtenga el fenotipo de ausencia de segmentos en mutantes para *bs*. De hecho, uno de los genes gap, *hunchback*, tiene un papel doble, como gen de contribución materna, y como gen gap cigótico. El contenido de *hunchback* en el huevo no fecundado se halla disperso, en un patrón similar al que se ha encontrado para *bs* (Tautz *et al.*, 1987).

Así, con este trabajo se pudo demostrar que tanto la contribución materna de *bs* como su expresión por el genoma del cigoto se necesitan en más de un proceso del desarrollo embrionario de *Drosophila*, y que su función temprana actúa especialmente durante la segmentación del embrión, abriendo como posibilidad que esta función esté dada por la regulación de *bs* sobre genes gap.

IX. Conclusión

El gen *blistered* es importante en el desarrollo de *D. melanogaster*, en el cual tiene más de una función; se necesita para que ocurra de manera normal la segmentación metamérica, en la que es especialmente importante la contribución materna del gen, y además durante el cierre dorsal y la involución de la cabeza, en los cuales es importante su expresión por el genoma del cigoto.

X. Referencias

- Affolter, M., Montagne, J., Walldorf, U., Groppe, J., Kloter, U., LaRosa, M. y Gehring, W.J. (1994). The *Drosophila* SRF homolog is expressed in a subset of tracheal cells and maps within a genomic region required for tracheal development. *Development* 120:743-753
- Arsenian, S., Weinhold, B., Oelgeschläger, M., Rütter, U. y Nordheim, A. (1998). Serum response factor is essential for mesoderm formation during mouse embryogenesis. *EMBO J.* 17:6289-6299
- Ashburner, M. (2005). *Drosophila: a laboratory handbook*. 2nd edition. Nueva York: Cold Spring Harbor.
- Cahill, M.A., Janknecht, R. y Nordheim, A. (1996). Signalling pathways: Jack of all cascades. *Curr. Biol.* 6:16-19
- Campos-Ortega, J.A. y Hartenstein, V. (1997). The embryonic development of *Drosophila melanogaster*. (pp. 1-8, 116, 164-165, 341-358) Berlín: Springer
- Chambers, A.E., Kotecha, S., Towers, N. y Mohun, T.J. (1992). Muscle-specific expression of SRF-related genes in the early embryo of *Xenopus laevis*. *EMBO J.* 11:4981-4991
- Chou, T. y Perrimon, N. (1996). The autosomal FLP-DFS technique for generating germline mosaics in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 144:1673-1679
- Foe, V.M. y Alberts, B.M. (1986). Studies of nuclear and cytoplasmic behaviour during the five mitotic cycles that precede gastrulation in *Drosophila* embryogenesis. *J. Cell Sci.* 61:31-70
- Franco, C.A., Mericskay, M., Parlakian, A., Gary-Bobo, G., Gao-Li, J., Paulin, D., Gustafsson, E. y Li, Z. (2008). Serum Response Factor is required for sprouting angiogenesis and vascular integrity. *Dev. Cell* 15:448-461
- Fristrom, D., Gotwals, D., Eaton, S., Kornberg, T.B., Sturtevant, M., Bier, E. y Fristrom, J.W. (1994). *blistered*: a gene required for vein/intervein formation in wings of *Drosophila*. *Development* 120:2661-2671
- Gilbert, S.F. (2003). *Developmental biology*. (p. 263-285) Massachusetts: Sinauer
- Griffiths, A.J.F., Gelbart, W.M., Miller, J.H. y Lewontin, R.C. (2000). *Genética moderna*. (p. 491) Madrid: McGraw-Hill

Guillemin, K., Groppe, J., Dücker, K., Treisman, R., Hafen, E., Affolter, M. y Krasnow, M.A. (1996). The *pruned* gene encodes the *Drosophila* serum response factor and regulates cytoplasmic outgrowth during terminal branching of the tracheal system. *Development* 122:1353-1362

Holley, S.A., Jackson, P.D., Sasai, Y., Lu, B., de Robertis, E.M., Hoffmann, F.M. y Ferguson, E.L. (1995). A conserved system for dorsal-ventral patterning in insects and vertebrates involving *sog* and *chordin*. *Nature* 376:249-253

Jürgens, G., Wieschaus, E., Nüsslein-Volhard, C. y Kluding, H. (1984). Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 193:283-295

Levine, M. (2008). A systems view of *Drosophila* segmentation. *Genome Biol.* 9:207

Mohun, T.J., Chambers, A.E., Towers, N. y Taylor, M.V. (1991). Expression of genes encoding the transcription factor SRF during early development of *Xenopus laevis*: identification of a CArG box-binding activity as SRF. *EMBO J.* 10:933-940

Montagne, J., Groppe, J., Guillemin, K., Krasnow, M.A., Gehring, W.J. y Affolter, M.A. (1996). The *Drosophila* Serum Response Factor gene is required for the formation of intervein tissue of the wing and is allelic to *blistered*. *Development* 122:2589-2597

Pankratz, M.J. y Jäckle, H. (1993). Blastoderm segmentation. En: Bate, M. y Martínez Arias, A. [eds.]: The development of *Drosophila melanogaster*. (p.468) Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Parlakian, A., Tuil, D., Hamard, G., Tavernier, G., Hentzen, D., Concordet, J-P., Paulin, D., Li, Z. y Daeglen, D. (2004). Targeted inactivation of Serum Response Factor in the developing heart results in myocardial defects and embryonic lethality. *Mol. Cell. Biol.* 24:5281-5289

Sanson, B. (2001). Generating patterns from fields of cells. Examples from *Drosophila* segmentation. *EMBO Reports* 2:1083-1088

Shore, P. y Sharrocks, A.D. (1995). The MADS-box family of transcription factors. *Eur. J. Biochem.* 229:1-13

St Johnston, D. (2002). The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*. *Nat. Rev. Genet.* 3:176-188

Tautz, D., Lehmann, R., Schnurch, H., Schuh, R., Seifert, E., Kienlin, A., Jones, K. y Jäckle, H. (1987). Finger protein of novel structure encoded by *hunchback*, a second member of the gap class of *Drosophila* segmentation genes. *Nature* 327:383-389

Weigmann, K., Klapper, R., Strasser, T., Rickert, C., Technau, G., Jäckle, H., Janning, W. y Klämbt, C. (en prensa). FlyMove- a new way to look at development of *Drosophila*. *Trends Genet.*

Wharton, K.A., Ray, R.P. y Gelbart, W.M. (1993). An activity gradient of *decapentaplegic* is necessary for the specification of dorsal pattern elements in the *Drosophila* embryo. *Development* 117:807-822

Wynne, J. y Treisman, R. (1992). SRF and MCM1 have related but distinct DNA binding specificities. *Nucl. Acids Res.* 20:3297-3303

XI. Lista de figuras

	página
Figura 1 Ciclo de vida de <i>D. melanogaster</i>	4
Figura 2 Embriones de <i>D. melanogaster</i> durante la etapa de blastulación	5
Figura 3 Gastrulación y cerrado dorsal en embriones de <i>D. melanogaster</i>	6
Figura 4 Micrografía electrónica de barrido de un embrión de <i>D. melanogaster</i> durante la retracción de la banda germinal	6
Figura 5 Esquema en el que se representa la secuencia de eventos para generar CLG mediante la técnica FLP-DFS	14
Figura 6 Esquema en el que se resume el protocolo experimental para la generación de embriones derivados de CLG	15
Figura 7 Letalidad en embriones mutantes para <i>bs</i>	18
Figura 8 Letalidad en embriones derivados de CLG mutantes para <i>bs</i>	20
Figura 9 Fenotipos observados en las cutículas analizadas	22
Fig. 10 Frecuencias de los fenotipos encontrados en las preparaciones de cutículas embrionarias	24

XII. Lista de tablas

	página
Tabla 1 Cuadro de Punnett en el que se analiza la letalidad teórica en embriones mutantes para <i>bs</i>	17
Tabla 2 Letalidad en etapa embrionaria debida a la homocigosis de alelos mutantes de <i>bs</i>	19
Tabla 3 Cuadro de Punnett en el que se analiza la letalidad teórica en la etapa embrionaria de mutantes derivados de CLG de <i>bs</i>	19
Tabla 4 Fenotipos más frecuentes en embriones mutantes para <i>bs</i>	23
Tabla 5 Fenotipos más frecuentes en embriones mutantes derivados de CLG mutantes para <i>bs</i>	23