

TESIS DE MAESTRÍA

-PEDECIBA-

Área Biología – Subárea Genética

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE
MUTACIONES ESPONTÁNEAS EN
*Drosophila willistoni***

Lic. Olga Cristina Parada Cabrera



Orientadora: Dra. Beatriz Goñi

Co-orientadores: Dra. Yanina Panzera

Dr. Elgion L. S. Loreto

INDICE GENERAL

RESUMEN

INTRODUCCIÓN	1
1 GENERACIÓN DE MUTACIONES ESPONTÁNEAS	1
1.1 Elementos Transponibles	1
1.1.1 Clasificación	2
1.1.2 Los Elementos transponibles como mutágenos	3
2 <i>Drosophila</i> COMO MODELO	4
2.1 Mutaciones espontáneas causadas por Elementos transponibles en <i>Drosophila</i>	4
2.2 <i>Drosophila</i> como herramienta en genómica comparada	6
3 RELACIONES FILOGENÉTICAS ENTRE LAS ESPECIES <i>D. melanogaster</i> y <i>D. willistoni</i>	7
3.1 Especies del subgrupo <i>willistoni</i>	8
3.2 <i>Drosophila willistoni</i>	9
4 GENOMA	9
5 EL GEN <i>white</i>	11
5.1 Estructura, mapa genético y mapa físico del gen <i>white</i>	12
5.2 Proteína White y Función	13
5.3 Mutantes en el locus <i>white</i>	15
5.3.1 Alelos <i>white</i> con pérdida de función	15
5.3.2 Alelo <i>white-apricot</i>	16
5.3.3 Alelo <i>white-coffee</i>	16
6 ELECCIÓN DEL TEMA	16
HIPÓTESIS DE TRABAJO	19
OBJETIVOS	19
Objetivos generales	19
Objetivos específicos	19
ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN	20
MATERIALES Y MÉTODOS	21

1	CEPAS UTILIZADAS	21
2	OBTENCIÓN DE LA SECUENCIA DEL GEN <i>white in-silico</i>	22
2.1	Ensamblaje de la secuencia	22
2.2	Anotación del gen	22
3	ANÁLISIS DE LOS ALELOS MUTANTES DEL GEN <i>white</i> DE <i>D. willistoni</i>	23
3.1	Diseño de cebadores	23
3.2	Extracción de ácidos nucleicos	23
3.3	Obtención de ADN complementario	24
3.4	Amplificación de la secuencia codificante	24
3.5	Clonación de amplicones	25
3.6	Aislamiento de ADN plasmídico	25
3.7	Secuenciación	26
3.8	Análisis de los amplicones	26
3.9	<i>Southern blot</i>	26
3.9.1	Enzimas de Restricción	26
3.9.2	Sondas	26
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
1	ANOTACIÓN DEL GEN <i>white</i> DE <i>D. willistoni</i>	27
1.1	Secuencia nucleotídica del gen <i>white</i>	27
1.2	Proteína White	37
2	ANÁLISIS DE ALELOS MUTANTES DEL GEN <i>white</i> EN <i>D. willistoni</i>	38
2.1	Análisis de las líneas mutantes mediante secuenciación	39
2.2	Análisis de las líneas mutantes mediante <i>Southern blot</i>	42
2.2.1	Región codificante y 3' del gen <i>white</i>	43
2.2.2	Región reguladora 5' del gen <i>white</i>	46
2.2.3	Región del exón 1 y primer intrón del gen <i>white</i>	47
2.2.4	Región 3' del gen <i>white</i>	47
2.2.5	Alelo w^l	50
2.2.6	Alelo w^a	51
2.2.7	Alelo w^{ef}	51

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	53
BIBLIOGRAFÍA	55
ANEXOS	64
A Difusión de los resultados obtenidos	64
B Secuencias en <i>D. willistoni</i>	64
B.1 Gen <i>white</i>	64
B.2 CDS <i>white</i>	67
B.3 Proteína White	67
B.4 Sonda Exón 1	68
B.5 Sonda Región 3-6	68
C Alelos	70
D Protocolos	71
D.1 Extracción de ARN de individuos adultos de <i>Drosophila</i>	71
D.2 Extracción de ADN de individuos adultos de <i>Drosophila</i>	72
D.3 Clonación de los productos de amplificación	73
D.4 <i>Southern Blotting</i> /ECL Kit	74

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 - Filogenia del subgénero <i>Sophophora</i>	8
FIGURA 2 - Correspondencia cromosómica en los Elementos de Müller	10
FIGURA 3 - Mapa físico del locus <i>white</i> en <i>D. melanogaster</i>	13
FIGURA 4 - Asociación entre las proteínas White y Brown y las proteínas White y Scarlet para formar transportadores de membrana	14
FIGURA 5 - Fenotipo de los alelos <i>white</i> en <i>D. willistoni</i>	18
FIGURA 6 - Selección de contigs del genoma de <i>D. willistoni</i>	29
FIGURA 7 - Alineamiento y ensamblaje de la secuencia nucleotídica del locus <i>white</i> en <i>D. willistoni</i>	30
FIGURA 8 - Estructura de la región codificante del gen <i>white</i> de <i>D. willistoni</i> y <i>D. melanogaster</i>	31
FIGURA 9 - CDS del gen <i>white</i>	33
FIGURA 10 - Anotación del promotor mínimo putativo del gen <i>white</i> de <i>D. willistoni</i>	34
FIGURA 11 - Anotación del gen <i>white</i> de <i>D. willistoni</i>	36
FIGURA 12 - Alineamiento entre la proteína White de <i>D. willistoni</i> y <i>D. melanogaster</i> .	37
FIGURA 13 - Alineamiento de la secuencia NBD de la proteína White	38
FIGURA 14 - Cebadores para el gen <i>white</i> de <i>D. willistoni</i>	39
FIGURA 15 - Electroforesis en gel de agarosa del ARN total	40
FIGURA 16 - Amplificación del ADNc <i>white</i>	41
FIGURA 17 - Amplificación de la región entre el exón 2 y 6 del locus <i>white</i>	42
FIGURA 18 - Esquema de la región del locus <i>white</i> con los cortes producidos por HindIII	44
FIGURA 19 - <i>Southern blot</i> de la región codificante y 3', utilizando la sonda <i>Región 3-6</i>	44
FIGURA 20 - Esquema de la región del locus <i>white</i> con los cortes producidos por ScaI	47
FIGURA 21 - Esquema de la región del locus <i>white</i> con los cortes producidos por NcoI	47
FIGURA 22 - <i>Southern blot</i> utilizando la sonda <i>white exón1</i>	48
FIGURA 23 - Esquema de la región del locus <i>white</i> con los cortes producidos por NcoI y HindIII	48
FIGURA 24 - <i>Southern blot</i> para el análisis del extremo 3', utilizando la sonda <i>Región 3-6</i>	49
FIGURA 25 - Alelo w^1	50
FIGURA 26 - Alelo w^{ef}	52

INDICE DE TABLAS

TABLA 1 - Información sobre las cepas utilizadas en esta Tesis	21
TABLA 2 - Lista de cebadores para el gen <i>white</i> de <i>D. willistoni</i>	23
TABLA 3 - Condiciones de PCR	25

Drosophila willistoni es una especie de interés en estudios evolutivos, motivo por el cual fue elegida para la secuenciación de su genoma completo junto a otras 11 especies de *Drosophila*. En el Laboratorio de *Drosophila* de la Sección Genética Evolutiva, se establecieron líneas mutantes en *D. willistoni* con el objetivo de generar marcadores genéticos para su empleo en diversos proyectos de investigación. En la presente tesis, se seleccionaron mutaciones en el locus *white* con el fin de investigar la naturaleza molecular de estas mutaciones espontáneas de *D. willistoni*. En una primera etapa se realizó la anotación del gen *white* de *D. willistoni* mediante el ensamblaje in-silico de la secuencia codificante completa del alelo salvaje *white*. En una segunda etapa se emprendió la caracterización molecular de tres alelos mutantes del gen *white*: *white nulo*, *white apricot* y *white coffee*, provenientes de poblaciones naturales del Uruguay y Argentina. Para ello se utilizaron dos aproximaciones: (1) un análisis de variaciones en la secuencia nucleotídica de la región codificante del gen *white* de *D. willistoni* mediante amplificación por PCR y posterior secuenciación, y (2) un análisis en busca de reordenamientos de secuencia mediante la técnica de *Southern blot*. Nuestros resultados revelaron la presencia de pequeños cambios de secuencia del tipo inserción/delección, en los alelos mutantes *white nulo* y *white coffee*, mientras que no se detectaron cambios en las regiones analizadas en el alelo mutante *white apricot*.

INTRODUCCIÓN

1 GENERACIÓN DE MUTACIONES ESPONTÁNEAS

Las mutaciones son la materia prima que da lugar a los cambios evolutivos. Estas son definidas como cambios heredables en la secuencia de nucleótidos o en la organización de la molécula de ADN. Las mutaciones pueden afectar un único par de bases, segmentos cromosómicos e incluso cromosomas enteros, incluyendo cambios en el número cromosómico o grandes reordenamientos en la estructura de los cromosomas.

Las mutaciones se pueden agrupar en distintos tipos, estos son: **(1)** mutaciones puntuales, cambian un único par de bases nucleotídicas (pb); **(2)** deleciones, remueven desde uno a miles de pb; **(3)** inserciones, agregan uno o muchos más pb; **(4)** duplicaciones, duplican una región **(5)** translocaciones, trasladan un fragmento cromosómico a un nuevo lugar en el genoma (incluyendo las translocaciones Robertsonianas: fisiones o fusiones céntricas), **(6)** Inversiones, invierten el orden de pb de un segmento de ADN, que pueden ir desde 2 pb hasta grandes extensiones cromosómicas (Johnston, 2001; Griffiths y col, 2002).

Las mutaciones pueden tener origen espontáneo o inducido. Las mutaciones espontáneas surgen por errores durante la replicación del ADN, errores durante la recombinación, lesiones espontáneas y por movilización de elementos transponibles (ETs). Mientras que las mutaciones inducidas son causadas por agentes mutagénicos específicos, físicos o químicos, tales como la radiación ultravioleta, radiaciones ionizantes, etc. que a su vez, aumentan la frecuencia de mutaciones (Lindahl, 1993; Johnston, 2001).

1.1 Elementos Transponibles

Los ETs fueron descritos por primera vez por Bárbara McClintock en el maíz (McClintock, 1929, 1931, 1950, 1953). Éstos son segmentos discretos de ADN que se distinguen por su capacidad de moverse a distintos sitios dentro de un mismo genoma “huésped” mediante un proceso llamado transposición. El análisis de las secuencias

genómicas ha revelado que las secuencias derivadas de ETs son abundantes en los genomas de muchos organismos, siendo 12% en *Drosophila*, 45% en humanos, 50% en maíz y casi el 90 % en algunas plantas, como importantes constituyentes del ADN medianamente repetido. Sin embargo, una mayor abundancia de ET no está directamente relacionada con una mayor actividad de transposición (García Guerreiro, 2012).

1.1.1 Clasificación

Los ETs pueden clasificarse según diferentes criterios. En base al mecanismo de transposición se pueden dividir en dos clases:

Clase I comprende los retrotransposones que se transponen a través de un intermediario de ARN. Los retrotransposones usan una enzima Transcriptasa Reversa para hacer una copia de ADN a partir de su transcritto de ARN y así insertarlo en un nuevo sitio en el genoma, mecanismo referido como “*copy and paste*”. Dicho modo de transposición tiene como resultado la generación de numerosas copias y parece ser el mecanismo que explicaría la gran expansión de ETs en los genomas de los organismos eucariotas (Finnegan, 1992; Piskurek y Jackson , 2012).

Clase II comprende los transposones, ADN que se transpone directamente de un lugar a otro. Codifican para la enzima transposasa que reconoce específicamente secuencias ubicadas en los extremos de los ETs, escinde el ET y lo inserta en otro lugar en el genoma del huésped, mecanismo llamado de “*cut and paste*” (Finnegan, 1992; Piskurek y Jackson , 2012).

Debido a la gran diversidad de ETs, las clases se subdividen en grupos menores entre los que se encuentran las subclases, ordenes, superfamilias, familias y subfamilias (Wicker y col. 2007).

A su vez ambas clases de ETs pueden ser clasificados como elementos autónomos y no autónomos, basados en su capacidad para dirigir su propia transposición. Los ETs autónomos codifican para la(s) enzimas requeridas para su

transposición/retrotransposición. Los ETs no autónomos sólo pueden movilizarse en *trans*, utilizando las enzimas producidas por los elementos autónomos.

1.1.2 Los Elementos transponibles como mutágenos

Por mucho tiempo, los ETs fueron considerados "ADN basura" o "ADN parásito" por su capacidad para replicarse o dispersar copias de sí mismos dentro e incluso entre los genomas sin ofrecer ningún beneficio aparente al huésped (Walkup, 2000). Sin embargo, una cantidad creciente de evidencias muestran que los ETs, al influir en la estructura y función del genoma, pueden jugar un papel importante en la evolución de los genomas. Estos se asocian a menudo con expansión del genoma y con el aumento en su diversidad, incrementando y diversificando el repertorio genético de sus huéspedes (Piskurek y Jackson, 2012).

Los ETs son una fuente intrínseca de variabilidad, ya que como consecuencia del proceso de transposición pueden generar una variedad de cambios en la secuencia de ADN. Se pueden generar nuevas mutaciones tanto a través de la inserción como de la delección del ET en el genoma. Si un ET se inserta en un gen funcional, en la región de los exones, intrones, o en regiones regulatorias, puede anular o alterar la función del gen. Las inserciones de ET en regiones génicas no traducidas se asocian frecuentemente a eventos de *splicing* alternativo, y a la generación *de novo* de exones.

Generalmente los ETs presentan distinto comportamiento de transposición según sean autónomos o no-autónomos. Los elementos autónomos suelen insertarse lejos de las áreas ricas en genes, mientras que los no-autónomos se insertan frecuentemente en proximidad a genes, encontrándose dentro de intrones, regiones UTR e incluso en exones causando mutaciones y enfermedad (Daskalova y col., 2006).

Cuando ocurre la transposición, el ET se mueve a un nuevo punto dejando una copia de sí mismo en el sitio original (transposición replicativa) o restaurando la secuencia genómica original (transposición conservativa) y llevando algunas veces parte de la región contigua. A su vez, la reparación defectuosa del sitio dejado por el ET también puede conducir a una mutación.

La presencia de una serie de copias repetidas idénticas de un ET ubicadas en diferentes loci, en el mismo u otro cromosoma, es sustrato para la ocurrencia de entrecruzamiento desigual (recombinación ectópica), fenómeno que conlleva la ocurrencia de duplicaciones, translocaciones e inversiones (Casals y col. 2003; Puig y col. 2004; Collier y Largaespada, 2007; Delprat y col. 2009).

2 *Drosophila* COMO MODELO

Drosophila se destaca por la combinación de ser un sistema de extraordinaria manipulación genética, bajo costo, con un genoma relativamente pequeño y por presentar una complejidad biológica comparable a la de los mamíferos. Las investigaciones en *Drosophila* han contribuido a la comprensión de la herencia multigénica, desarrollo, evolución, así como en la comprensión del cáncer, enfermedades neurodegenerativas, comportamiento, inmunidad y envejecimiento.

2.1 Mutaciones espontáneas causadas por Elementos transponibles en *Drosophila*

En *Drosophila*, los ETs son responsables de aproximadamente el 80% de las mutaciones espontáneas (Ashburner, 2005). Estos forman parte del ADN medianamente repetido encontrado en los genomas. El contenido de ADN genómico derivado de ETs varía considerablemente entre los genomas y está relacionado significativamente con el tamaño del genoma. En *D. willistoni* y *D. ananassae* se encontraron los niveles más altos de ETs en relación a la cantidad de secuencias repetidas contenidas en sus genomas. Las cantidades absolutas de secuencias repetidas correspondientes a ETs y de familias de ETs no se conservan a través del género *Drosophila*, por el contrario, la proporción de cada clase de ETs tiende a mantenerse estable entre las distintas especies, lo cual sugiere la existencia de mecanismos comunes en la co-evolución del huésped y ETs en *Drosophila* (*Drosophila* 12 Genomes Consortium, 2007).

Los ETs pueden ser obtenidos por transmisión vertical, heredado del progenitor a la descendencia, o por transferencia horizontal. En la transferencia horizontal, el intercambio de material genético ocurre entre dos especies que no comparten una

relación ancestro-descendiente inmediata. La propagación de ETs a través de especies portadoras divergentes puede ser facilitada por virus, bacterias o parásitos eucariotas. En estos casos, la transferencia de un ET de un genoma a otro puede desencadenar muchos eventos moleculares que pueden a su vez, influir directamente en la evolución del genoma (Piskurek y Jackson, 2012). Un ejemplo clásico de transferencia horizontal de ETs es la transferencia relativamente reciente del elemento *P* desde la especie *D. willistoni* a *D. melanogaster* (Anxolabéhère y col. 1988, Daniels y col. 1990).

En general, las tasas de transposición de ETs son bajas, entre 10^{-4} y 10^{-6} eventos de transposición por copia por generación, existiendo episodios de estallidos de transposición. Si bien la movilización espontánea de los ETs en cepas de laboratorio puede ocurrir en ausencia de algún factor inductor evidente, se ha visto que distintos factores podrían favorecerla. Entre los posibles factores que promueven la transposición de ETs en *Drosophila* se encuentran los ambientales, bióticos y abióticos, aunque la evidencia no es concluyente y a veces contradictoria. Se encontró, por ejemplo, que el estrés por temperatura puede provocar movilización de algunos, pero no de otros ETs. Entre los factores químicos, distintos agentes alcalinos activan la transposición del elemento *P* en *Drosophila*. A su vez, diferentes dosis de vapor de etanol indujeron la transposición del elemento *412* en una cepa de *D. melanogaster*. Entre los factores físicos, los efectos de la radiación sobre la transposición son variables y dependen del tipo de radiación y ETs estudiados. El estrés biótico también puede ser promotor de la movilización de ETs, encontrándose una posible asociación entre el ataque de patógenos o infecciones virales con la activación de la transposición (revisado por García Guerreiro, 2012).

El fenómeno denominado “disgénesis híbrida” (Kidwell y col. 1977), se caracteriza por un aumento en la tasa de transposición, de mutación y de reordenamientos cromosómicos, entre otros. Este se produce por el cruzamiento entre una cepa portadora de un ET con otra cepa no portadora. Aunque también se ha observado aumento en la actividad de transposición en cruces donde ambas cepas son portadoras de un ET pero con distinto background genético. Estos aspectos se han

empezado a esclarecer al conocer los distintos mecanismos de regulación de la transposición en el organismo huésped (García Guerreiro, 2012).

2.2 *Drosophila* como herramienta en genética comparada

Muchos atributos de los genomas son compartidos entre especies, por esta razón, la aplicación de comparaciones interespecíficas permite identificar características genómicas que presentan diferentes grados de conservación. La genómica comparada es un campo de investigación biológica en el cual los genomas de diferentes especies son comparados a distintos niveles; tales como el tamaño del genoma, número de genes y número cromosómico, como también la conservación de mapas físicos y genéticos o la comparación directa de las secuencias de ADN entre especies. Es una herramienta muy útil para la anotación de genes funcionales y de elementos reguladores, así como para el estudio de cambios evolutivos entre organismos (Clark y col., 2003).

Se pueden formular distintas preguntas específicas cuando las comparaciones entre genomas se realizan a diferentes distancias filogenéticas. Así, a distancias filogenéticamente cercanas, la genómica comparada es idónea, entre otros, para discriminar secuencias de ADN codificantes y localizar sitios regulatorios en los genes. Por otro lado, organismos distantemente relacionados presentarán una menor similitud de secuencias. En estos casos, el orden de los genes y las secuencias que regulan su expresión generalmente no se conservan (Hardison, 2003; Touchman, 2010). La especie *D. melanogaster* no es sólo la especie más empleada en investigación dentro del género *Drosophila*, sino que también es considerada la especie de referencia en estudios de genómica comparada por la gran disponibilidad de datos informativos. La investigación en *D. melanogaster* ha aportado a la investigación en especies tan lejanas como el ser humano, revelando que alrededor del 60% de los genes se hallan conservados entre ambas especies (Adams y col. 2000).

El Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano (NHGRI) emprendió la secuenciación de 11 especies de *Drosophila* (2007) que se sumaron a la especie ya secuenciada *D. melanogaster*. A través de este abordaje se buscó facilitar el

análisis comparativo de secuencias para mejorar las anotaciones, la comprensión de la evolución del genoma, describir la variación de los genomas a gran escala, identificar genes no codificantes y elementos reguladores, e investigar especies que presentan especiación incipiente (“*Drosophila* White Paper 2012, en FlyBase). El análisis de las secuencias genómicas de estas 12 especies de *Drosophila* evidenció que muchos atributos de sus genomas están muy conservados entre especies. El tamaño total del genoma, el número de genes, la distribución de las clases de ETs, y los patrones de uso de los codones son muy similares entre estas especies. Entre las 12 especies secuenciadas *D. willistoni* presentó valores excepcionalmente atípicos en relación a la especie de referencia, como el inusual sesgo en el uso de codones, y una mayor proporción de ETs en relación al contenido total de ADN repetido, ésta última característica compartida con *D. ananassae*. A su vez, el número de cambios estructurales y de reordenamientos en *D. willistoni* es mucho más grande que los reportados en las otras especies de *Drosophila*; un ejemplo de ello es la observación de diferentes tipos de reordenamientos de genes en el grupo Hox (*Drosophila* 12 Genomes Consortium, 2007).

3 RELACIONES FILOGENÉTICAS ENTRE LAS ESPECIES *Drosophila melanogaster* y *D. willistoni*

El género *Drosophila* es el mayor entre los géneros de drosophilidos, incluyendo todas las especies mejor conocidas por los biólogos experimentales. Cuenta con más de 1000 especies distribuidas en 9 subgéneros. Entre los cuales, el subgénero *Sophophora* cuenta con siete grupos de especies. Los términos “grupo” y “subgrupo” de especies son ampliamente usados por los drosofilistas para describir grupos homogéneos de especies cercanamente relacionadas, pero a diferencia de lo que pasa en otros niveles taxonómicos, no se puede asumir que dos grupos de especies tengan un estatus equivalente (Ashburner y col. 2005). Entre los grupos del subgénero *Sophophora* se encuentran, entre otros, el grupo *melanogaster*, al que pertenece la especie cosmopolita *D. melanogaster* y el grupo *willistoni* al que pertenece la especie neotropical *D. willistoni* (FIGURA 1). Estos grupos divergieron a partir de un ancestro común en el

período oligoceno medio, hace unos 30 millones de años (Clark y col., 2003; Markow y O'Grady; 2006).

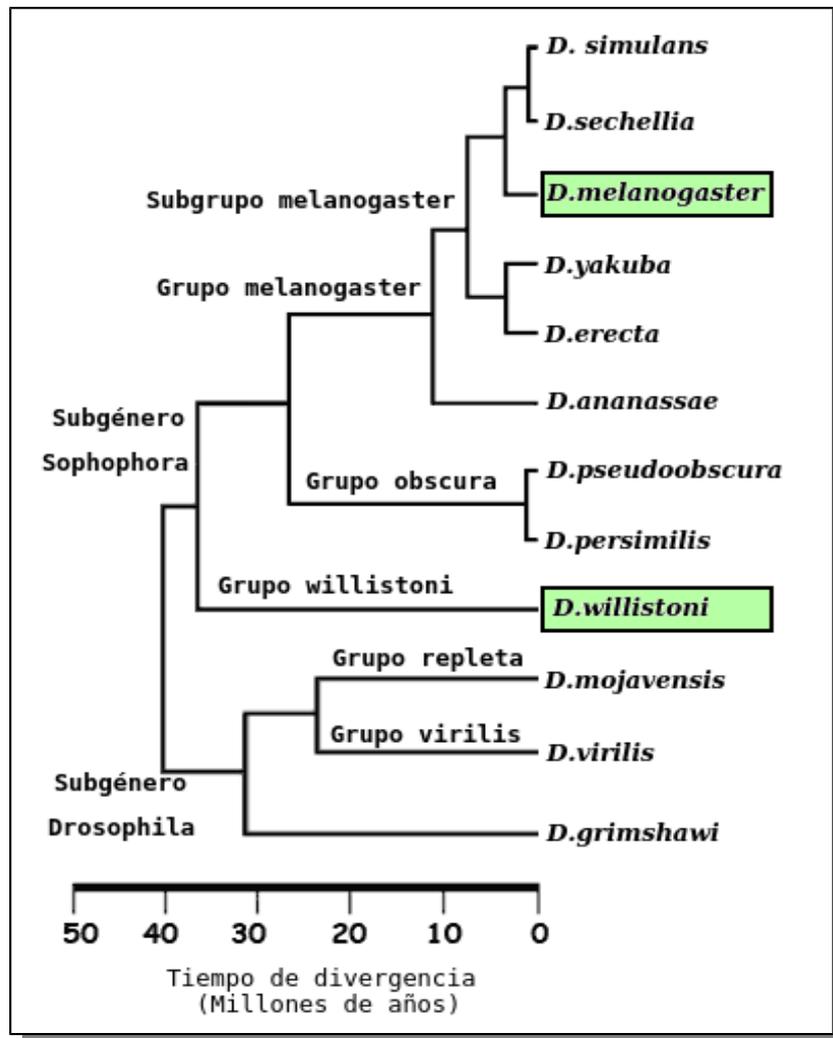


FIGURA 1- Filogenia del subgénero *Sophophora*. Incluye las 12 especies secuenciadas en el Proyecto Genoma (Ver más adelante). Imagen modificada de FlyBase.

3.1 Especies del subgrupo *willistoni*

El subgrupo *willistoni*, perteneciente al grupo *willistoni*, está formado por un conjunto de 6 especies “crípticas” que incluyen subespecies, semiespecies, poblaciones endémicas de islas y continentales (Robe y col. 2010, FlyBase)¹.

¹ FlyBase incluye una séptima especie dentro del subgrupo *willistoni*, *D. fumipennis* (no incluida anteriormente).

Las especies del subgrupo *willistoni* pueden ser diferenciadas por la genitalia de los machos, por los cromosomas politénicos de glándulas salivares, isoenzimas, aloenzimas y por su comportamiento (Spassky, 1957; Dobzhansky y Powell, 1975; García y col. 2006). Es de destacar que el conjunto de especies del subgrupo *willistoni* se encuentra claramente bajo un proceso de especiación incipiente lo que lo convierte en un material ideal para investigar los procesos evolutivos (Cordeiro y Winge, 1995; Robe y col. 2010).

3.2 *Drosophila willistoni*

Drosophila willistoni es la especie que posee la más amplia distribución dentro del subgrupo *willistoni*, presentando principalmente una distribución Neotropical, se encuentra desde la Florida (EEUU) hasta el sur Argentino (revisado por Ehrman y Powell, 1982; Cordeiro y Winge, 1995) y además es la única especie del subgrupo que habita en el Uruguay, habitando tanto en ambientes naturales como modificados (Goñi y col. 1998).

D. willistoni ha sido una especie pionera en estudios de genética comparada y evolutiva. Una de las características genéticas más sobresalientes de sus poblaciones naturales es su alto grado de polimorfismo cromosómico en forma de inversiones paracéntricas (Valente y col. 2001, 2003; Da Cunha y Dobzhansky 1950; Cordeiro y Winge 1995). El valor adaptativo del polimorfismo cromosómico, ha sido discutido en relación con disturbios ambientales bajo diferentes grados de urbanización en poblaciones de la ciudad de Porto Alegre (Valente y col, 1993).

4 GENOMA

A fines de los 1930s Sturtevant, Tan, y Novitski, mediante estudios de mapeo genético comparativo, mostraron que los brazos cromosómicos de diferentes especies de drosophilidos tienen un contenido génico similar y propusieron que los genes eran sinténicos, o sea, que grupos de genes se mantienen asociados físicamente en el cromosoma (Sturtevant and Novitski 1941; Sturtevant and Tan 1937). Luego Müller (1940) desarrolló un sistema de nomenclatura de 6 elementos, nombrados con las letras

A a F (FIGURA 2), correspondientes a los brazos cromosómicos en *D. melanogaster*, más tarde denominados Elementos de Müller en su honor. No hay una correspondencia simple uno-a-uno para todos los brazos cromosómicos de cada especie con un único elemento de Müller. Esta falta de correspondencia se asocia con eventos de fusión, fisión o inversión que reasocian la totalidad o porciones de los brazos cromosómicos en seis especies en relación con *D. melanogaster*. El estudio de los 12 genomas ha confirmado que la asociación entre el contenido génico y los elementos de Müller se conserva entre estas especies del género *Drosophila*, con sólo algunas excepciones (Schaeffer y col. 2008).

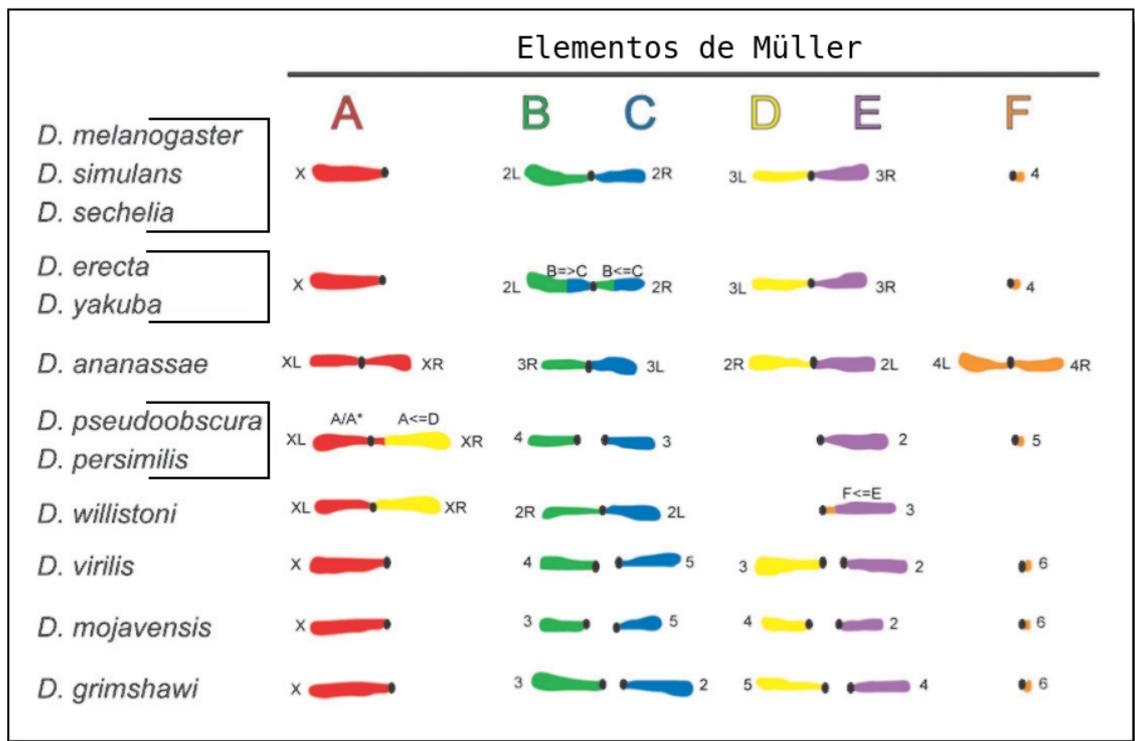


FIGURA 2- Correspondencia cromosómica en los Elementos de Müller. En la figura se muestra la correspondencia entre los Elementos de Müller (A a F) con los brazos cromosómicos de cada especie. En la imagen los colores se corresponden a los distintos elementos de Müller y los brazos cromosómicos se nombran con su nomenclatura tradicional. Brazos cromosómicos R (Right) y L (Left). Imagen modificada de Schaeffer, 2008.

El genoma de *D. melanogaster* se caracteriza por tener cuatro grupos de ligamiento, tres pares de autosomas (cromosomas II, III y IV) y un par de cromosomas sexuales (X e Y). Los cromosomas II y III son metacéntricos y los cromosomas X e IV

son acrocéntricos. El genoma de *D. willistoni* se caracteriza por tener tres grupos de ligamiento, dos pares de autosomas (cromosomas II, y III) y un par de cromosomas sexuales (X e Y). Sturtevant y Novisky (1941) propusieron homologías cromosómicas entre *D. willistoni* y *D. melanogaster*. Como se distingue en la FIGURA 2, el cromosoma II es equivalente para ambas especies (compuesto por los mismos elementos de Müller). El cromosoma X de *D. willistoni* es metacéntrico y corresponde a la fusión entre el brazo cromosómico XR, homólogo al cromosoma X de *D. melanogaster*, y el brazo XL homólogo del brazo III L de *D. melanogaster*. En *D. willistoni* el elemento F, homólogo al cromosoma “dot” (cromosoma IV) en *D. melanogaster*, se halla fusionado al extremo proximal del elemento E de varias especies del subgrupo *willistoni* (Papaceit and Juan, 1998; Pita y col, 2014).

5 EL GEN *white*

El gen *white* de *Drosophila* ha tenido un rol destacado en el desarrollo de los conceptos de la genética siendo uno de los genes más intensamente estudiados en las áreas citológica, genética, bioquímica y de biología molecular, lo que ha generado un extenso soporte informativo. En la base de datos *online* de *Drosophila* FlyBase citan más de 3600 artículos relacionados al gen *white*. El fenotipo evidente de falta de pigmentación en los ojos en individuos con el alelo nulo, motivó desde su hallazgo, que fuera un gen ampliamente utilizado como marcador genético.

En una revisión sobre los avances en el conocimiento en genética favorecidos por el empleo del gen *white* en *D. melanogaster*, M. Green (2010), nos presenta un resumen de la complejidad de este gen. El primer alelo mutante hallado para el gen *white* (*white nulo*), descubierto por Morgan (1910), fue empleado como prueba experimental de la herencia ligada al sexo. El uso de mutantes *white* ha sido clave para el estudio en temas como el fenómeno de variegación genética por efecto de posición, el fenómeno de compensación de dosis, la primera detección de elementos transponibles en *Drosophila*, detección de entrecruzamiento desigual, entre otros.

5.1 Estructura, mapa genético y mapa físico del gen *white*

En *D. melanogaster* el locus *white* presenta una longitud de 14247 pb (GenBank, número de acceso X02974) y se encuentra ligado al cromosoma X, a 2.790 Mb del telómero. El cromosoma X de *D. melanogaster* es acrocéntrico y tiene una longitud aproximada de 23.500 Mb. El gen *white* es de copia única, con 6 exones y 5 intrones (FlyBase).

En la construcción del mapa físico del gen, se estableció como punto “cero” al sitio de inserción del elemento transponible *copia* que da lugar al alelo *white apricot* (FIGURA 3) debido a que sirvió como punto de inicio en la técnica *Chromosome walking* (Levis y col. 1982; Pirrota y Bröckl, 1984). En este mapa, al igual que en el mapa genético, se le da valor positivo a las distancias ubicadas hacia el centrómero (proximal) y valor negativo a las ubicadas hacia el telómero (distal).

Se describió el sitio de inicio de la transcripción en la posición 3,7 Kb del mapa físico del locus *white*. El promotor carece de la secuencia conservada TATA (promotor *TATA-less*) y presenta la secuencia DPE (*Downstream Promoter Element*)², ubicada entre los pares de bases 26 y 32 *downstream* al punto de inicio de la transcripción (Kutach y Kadonaga 2000). El gen *white* codifica para un ARNm de 2352 pb (FlyBase).

Mediante el análisis de recombinación intralocus, un gran número de alelos mutantes del gen *white* en *D. melanogaster* han sido asignados a por lo menos 7 grupos o “sub-loci”, donde la característica principal es la existencia de recombinación intralocus entre alelos pertenecientes a grupos distintos, y la ausencia de recombinación para aquellos alelos pertenecientes a un mismo grupo. Estos grupos de alelos, caen a su vez, en dos dominios principales por lo cual se puede pensar en el gen *white* como una estructura bipartita. Un dominio se ubica en dirección hacia el centrómero (proximal) y otro dominio hacia el telómero (distal)(FIGURA 3):

2 DPE- El elemento DPE junto al elemento InR (que contiene el sitio de inicio de la transcripción) forman el promotor mínimo, secuencia de ADN mínima suficiente para iniciar la transcripción.

- el dominio en la región proximal o **Región reguladora** del gen *white*, contiene las secuencias reguladoras, el promotor y parte del primer exón. Alelos mutantes en esta región se ven afectados en la distribución del pigmento, compensación de dosis y la interacción con *zeste* (un factor de transcripción).
- el segundo dominio en la región distal o **Región estructural** del gen *white*, se encuentra separado del primero por un gran intrón (de 3108 pb). Presenta el resto de la secuencia ubicada *downstream* y comprende los exones (2 al 6) e intrones (Judd, 1976; Pirrotta y Bröckl, 1984).

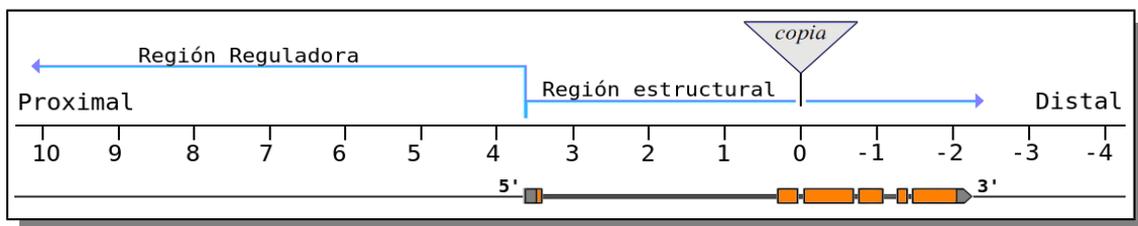


FIGURA 3- Mapa físico del locus *white* en *D. melanogaster*. Se presenta el esquema del gen *white*, exones (naranja), UTR (gris). La regla detalla el sitio de inserción del elemento transponible *copia* para dar el alelo *white apricot*. Cada unidad corresponde a 1 Kb.

5.2 Proteína White y Función

La proteína White de 687aa forma parte de la superfamilia de transportadores ABC (Ames, 1986; Mount, 1987), proteínas transmembrana, con dos dominios citosólicos que unen e hidrolizan ATP (NBD) y dos dominios transmembrana (TMD). En una sola proteína pueden presentarse los cuatro dominios o, como es el caso de la proteína White, pueden presentar sólo dos: NBD y TMD (Dermauw y Van Leeuwen, 2014).

La proteína White forma heterodímeros con función de transportador transmembrana y su especificidad es determinada principalmente por la proteína con la cual dimeriza (Ewart, 1998). En los ojos de *Drosophila* actúa como importador de precursores de pigmentos visuales (FIGURA 4). El heterodímero entre la proteína White y la proteína Brown tiene como función el transporte de guanina (Sullivan, 1979), precursor de las pteridinas o pigmentos rojos. Mientras que el heterodímero entre

la proteína White y la proteína Scarlet tiene como función la absorción de triptofano y quinurenina (Sullivan, 1975), precursores de los omocromos o pigmentos marrones del ojo (Dreesen, 1988; Mackenzie, 2000) y precursor de la serotonina en neuronas serotoninérgicas.

White ha mostrado ser una proteína de transporte muy versátil presentando múltiples roles biológicos. Los transportadores White-Brown y White-Scarlet, ubicados en las vesículas sinápticas, en neuronas del cerebro de *Drosophila*, tienen funciones como importadores de precursores de neurotransmisores (Borycz, 2008), asociados al aprendizaje y la adquisición de memoria (Diegelmann, 2006, Sitaraman y col. 2008).

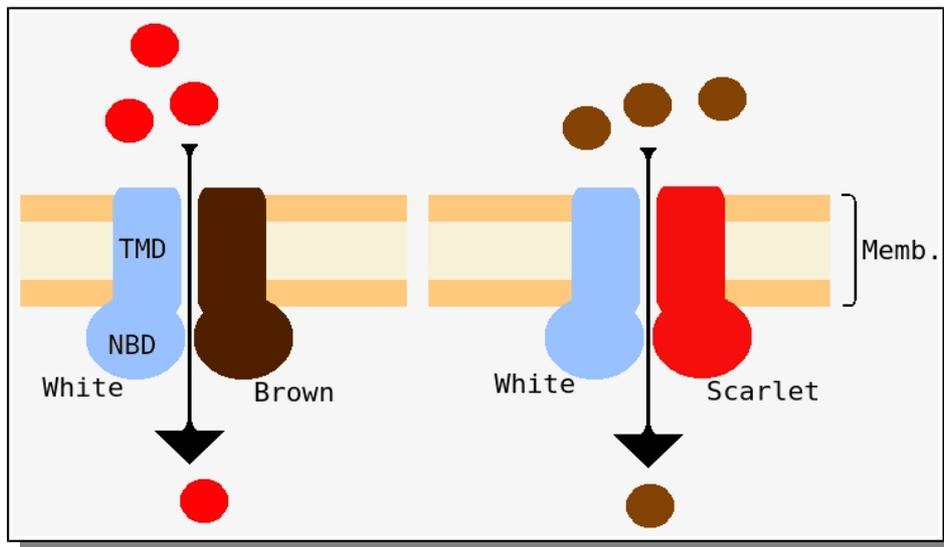


FIGURA 4- Asociación entre las proteínas White y Brown y las proteínas White y Scarlet para formar transportadores de membrana. El heterodímero White-Brown participa en el transporte de precursores de pigmentos rojos. El heterodímero White-Scarlet participa en el transporte de precursores de pigmentos marrones. Memb.- membrana, TMD- Dominio Transmembrana, NBD- Dominio de unión a ATP.

La proteína White se expresa también en los túbulos de Malpighi, estructuras críticas para la supervivencia y que desempeñan un papel esencial en la osmorregulación, la homeostasis y la función inmune. Se encontró que White se expresa

en vesículas intracelulares en las células principales del túbulo y que participa en el transporte transepitelial vesicular de GMPc³ (Evans y col. 2008).

Cambios cuantitativos en la expresión, así como, la expresión ectópica de la proteína White en los machos de *Drosophila*, inducen comportamientos de cortejo macho-macho, implicando al gen *white* en el control del cortejo (Anaka, 2008, Krstic y col.2013).

5.3 Mutantes en el locus *white*

En *D. melanogaster* existen 2309 alelos reportados para el locus *white*, originados por mutaciones espontáneas o inducidas (1060) y a aquellos transportados en construcciones transgénicas (1249). Los alelos *white* extremos, así como la falta de expresión del gen *white* no producen pigmentos oculares. Así, el alelo w^1 (*nulo*) tiene muy poco, si alguna, pteridina. Los alelos hipomórficos producen color de ojos visiblemente más claro en combinación con el alelo w^1 que cuando están presentes en homocigocis. Los alelos *white* intermedios resultan en la pérdida parcial de omocromos y pteridinas; algunos alelos también afectan a la distribución de estos pigmentos en las omatidios⁴ de los ojos compuestos. Los alelos de tipo salvaje no son completamente dominantes sobre los alelos mutantes, ej. los individuos heterocigotos w^1/w^+ , aunque visiblemente indistinguible de los individuos w^+/w^+ , tiene, sin embargo, menos pigmento rojo. Se describen los alelos *white nulo*, *white apricot* y *white coffee* de *D. melanogaster* (revisión extraída de FlyBase).

5.3.1 Alelos *white* con pérdida de función

Existen varios mutantes descritos en *D. melanogaster* con pérdida de función del gen *white*, ya sea de origen espontáneo o inducido. Entre los alelos para los que existe información de la naturaleza molecular de la lesión se encuentra el alelo nulo w^1 . Este se debe a la inserción del elemento transponible *Doc* en la región promotora. Otro alelo

3 GMPc (Guanosina 3'-5' monofosfato cíclico) es un importante regulador de la función celular y tisular.

4 Omatidio- Unidad funcional del ojo compuesto de artrópodos. Cada ojo posee muchos omatidios, consistiendo cada uno en un grupo de fotorreceptores rodeado de células de sostén y pigmentadas.

con pérdida de función, w^{118} se debe a la delección parcial de la secuencia codificante del gen *white* (elimina el primer exón), y del extremo 5'. La pérdida de función lleva, entre otros, a la pérdida mayoritaria o total de pigmentos en los ojos (ojos color blanco).

5.3.2 Alelo *white-apricot*

El alelo mutante *white apricot* (w^a) en *D. melanogaster* presenta, como vimos en la FIGURA 3, una inserción del elemento transponible *Copia* en el segundo intrón. Se pueden producir deficiencias y duplicaciones para w^a como resultado de intercambios no homólogos dentro de la región *white*. La cantidad de pigmento formado por w^a es una función de la dosis génica. Individuos mutantes w^a presentan ojos de color anaranjado amarillento opaco. Hembras heterocigotas w^a/w^0 presentan menos pigmento que machos con una copia w^a y éstos a su vez, presentan menos pigmento que hembras homocigotas para w^a . Pirrotta (1984) propuso que en individuos con el alelo w^a se producen 3 tipos de ARNm: (1) desde inicio del gen *white* hasta el elemento *copia*, (2) desde inicio del gen *white* hasta su final (el elemento *copia* se perdería durante el *splicing* dando un ARNm wild-type), (3) desde el promotor del elemento *Copia* hasta final del gen *white* (Pirrotta y Bröckl, 1984).

5.3.3 Alelo *white-coffee*

El alelo mutante w^{cf} en *D. melanogaster* fue obtenido por irradiación con rayos X. Presenta dos mutaciones puntuales que llevan, cada una, al reemplazo de un aminoácido (L49R y G589E), uno cerca del extremo amino terminal y otro en el extremo carboxilo terminal. El color de ojos de los individuos w^{cf} es marrón rojizo. El cambio fenotípico se debe principalmente a una disminución del nivel de las drosopterinas, pigmento rojo (ver FIGURA 5).

6 ELECCIÓN DEL TEMA

La primera información sobre mutantes en *D. willistoni* fue comunicada por Lancefield y Metz (1922) y Ferry y col. (1923) los cuales describieron 53 fenotipos mutantes. Posteriormente, Spassky y Dobzhansky (1950) describieron 54 fenotipos mutantes y propusieron un mapa genético, que es hasta el momento el mapa de

referencia de esta especie. Las marcas genéticas empleadas para el establecimiento del mapa, fueron usadas para orientar los scaffolds del genoma de *D. willistoni* luego de su secuenciación (Schaeffer et al 2008). Sin embargo, todas esas cepas se han perdido, por lo cual se inicia la selección de mutantes en *D. willistoni* en la Sección Genética Evolutiva, con el objetivo de utilizar estas mutantes en estudios genéticos y evolutivos.

En mi Tesina de grado titulada “Selección y caracterización genética de mutaciones espontáneas en *D. willistoni*”, se aislaron, seleccionaron y establecieron líneas mutantes, incluyendo para muchos de ellos los análisis de ligamiento, alelismo y mapeo. Parte de estos resultados fueron publicados en la revista anual *Drosophila Information Service* (Goñi y col, 2002; Parada y Goñi, 2003). Las líneas mutantes han sido mantenidas en el Laboratorio de *Drosophila* y utilizadas en proyectos de grado de varios estudiantes: Lic. Ana María Soler (Soler y Goñi, 2012), Br. Sebastián Rodríguez, Br. Sebastián Mateo y Lic. Yanina Leone.

En el presente Proyecto de Tesis de Maestría se propuso comenzar la caracterización molecular de los alelos mutantes en *D. willistoni*. En primer lugar se seleccionaron aquellas líneas mutantes para las cuales se tuviera una hipótesis de cuál era el locus afectado. Para la asignación del locus de las mutaciones seleccionadas, se consideraron los siguientes aspectos: (1) datos fenotípicos de la mosca adulta (variaciones en el color de los ojos, color del cuerpo, forma de las alas, etc.) y (2) datos de ligamiento y alelismo para *D. willistoni* reportados por nuestro laboratorio.

En base a esto se seleccionaron aquellos alelos mutantes con características fenotípicas similares a las encontradas para genes de *D. melanogaster* y que pertenecen al mismo grupo de ligamiento. Esta búsqueda fue facilitada por la gran cantidad de información genética disponible para *D. melanogaster*.

En segundo lugar se realizó una búsqueda de la información disponible en *D. melanogaster* para los genes preseleccionados, utilizando la base de datos de *Drosophila* en la página web *FlyBase*, de tal modo de acotar nuestra selección a mutaciones de genes de copia única, con gran soporte informativo, especialmente, en

relación a la naturaleza molecular de los alelos mutantes (con mutaciones puntuales, inserciones / deleciones, etc.).

De la evaluación de 80 cepas mutantes puras de *D. willistoni* disponibles en nuestro laboratorio se seleccionaron las variantes alélicas del locus *white*. Por la similitud fenotípica con algunos alelos *white* de *D. melanogaster*, se asignaron los siguientes nombres a los alelos *white* de *D. willistoni*: w^1 (alelo *white nulo*), w^a (alelo *white apricot*), w^{cf} (alelo *white coffee*) (FIGURA 5).

Al comenzar este proyecto de Maestría la secuenciación del genoma de *D. willistoni* estaba llevándose a cabo por el Instituto Venter, USA y sólo se encontraban disponibles los contigs restando el ensamblaje de los mismos. En base a esto se planteó la estrategia de investigación para cumplir con los objetivos del proyecto.



FIGURA 5- Fenotipo de alelos *white* en *D. willistoni*. Izquierda arriba- *salvaje*, Izquierda abajo- *white nulo*. Derecha arriba- *white apricot*. Derecha abajo- *white coffee*.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

La alta conservación de secuencias codificantes y de función génica entre especies de *Drosophila*, nos permitirá emplear a *D. melanogaster* como especie de referencia para el estudio y caracterización molecular de los distintos alelos del gen *white* en *D. willistoni*.

OBJETIVOS

Objetivos generales

Caracterizar la naturaleza molecular del alelo salvaje y tres alelos mutantes espontáneos del gen *white* en *Drosophila willistoni* para determinar los eventos asociados a las causas generadoras de las mutaciones espontáneas presentes en poblaciones naturales de *D. willistoni*.

Objetivos específicos

- Realizar la anotación del gen *white* en *D. willistoni* mediante herramientas bioinformáticas.
- Investigar cuál o cuáles alteraciones genéticas a nivel molecular se encuentran asociadas a los alelos mutantes en el locus *white*: *white nulo*, *white apricot* y *white coffee*.

ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN

Primer objetivo: Anotación in-silico del gen *white* en *D. willistoni*.

La estrategia para llevar a cabo este primer objetivo consistió de los siguientes pasos: (1) Empleo de la secuencia del gen *white* de *D. melanogaster* para identificar aquellos contigs⁵ ya publicados del genoma de *D. willistoni* con homología de secuencias. (2) Ensamblado de las secuencias de los contigs para obtener una secuencia consenso para *D. willistoni*. (3) A partir del alineamiento y comparación de la secuencia consenso de *D. willistoni*, con la secuencia del gen *white* de *D. melanogaster*, anotación de la secuencia del gen *white* en *D. willistoni*. (4) Análisis de los resultados obtenidos.

Segundo objetivo: Investigación de la presencia de alteraciones a nivel molecular asociadas a los alelos mutantes del gen *white* de *D. willistoni*.

La estrategia para llevar a cabo este segundo objetivo consistió de los siguientes pasos: (1) Diseño de cebadores a partir de la secuencia anotada del gen *white* de *D. willistoni* (en el primer objetivo), unos que cubran la región del primer exón, y otros que cubran el resto de la región codificante (exones 2 al 6). (2) Obtención de la secuencia del ARN mensajero de las líneas salvaje y mutantes mediante: extracción de ARN total; obtención del ADNc por retrotranscripción; amplificación por PCR y análisis de las secuencias amplificadas para los distintos alelos. (3) Obtención de la secuencia de la región codificante de las líneas salvaje y mutantes mediante: extracción de ADN genómico; PCR, secuenciación y análisis de las secuencias amplificadas. (4) Análisis mediante *Southern blot* para detectar la presencia de grandes inserciones y/o deleciones en los alelos mutantes para el gen *white*. (4) Análisis de los resultados obtenidos.

5 **Contigs** (de *contiguous*) en este contexto se refiere a segmentos solapantes de secuencias, contenidas en clones. Éstos son usados para guiar el secuenciamiento y ensamblaje de secuencias y forman un mapa físico del genoma.

MATERIALES Y MÉTODOS

1 CEPAS UTILIZADAS

La TABLA 1 detalla las características de las líneas mutantes puras de *D. willistoni* utilizadas, así como otras especies incluidas como grupos externos para la técnica de *Southern blot*.

TABLA 1- Información sobre las cepas utilizadas en esta Tesis.

Especie	Cepa (código)	Origen	Alelo
<i>D. willistoni</i>	Ey10.00	Uruguay	w^{cf} : <i>white coffee</i>
	Q14.F11	Argentina	w^a : <i>white apricot</i>
	EM1.00	Uruguay	w^1 : <i>white nulo</i>
	Q14.F1	Argentina	y^1 : <i>yellow nulo</i>
	WIP4	Brasil	Salvaje, cepa control
	17A2	Brasil	Salvaje, cepa control
<i>D. melanogaster</i>		Uruguay	Salvaje, grupo externo
<i>D. immigrans</i>	Q37.06	Argentina	Salvaje, grupo externo
<i>D. nebulosa</i>	Q10.06	Argentina	Salvaje
<i>Zaprionus indianus</i>		Uruguay	Salvaje, grupo externo

Las líneas fueron cultivadas a temperatura constante de 25°C en un medio de cultivo estándar compuesto por maíz, levadura, glucosa y agar.

2 OBTENCIÓN DE LA SECUENCIA DEL GEN *white* IN-SILICO

Al comenzar este proyecto de Maestría no contábamos con la secuencia completa del genoma, ni información sobre el gen *white* en *D. willistoni*. La secuenciación estaba llevándose a cabo por el Instituto Venter, USA y sólo se encontraban disponibles los contigs restando el ensamblaje de los mismos. Para obtener la secuencia del alelo salvaje del gen *white* de *D. willistoni*, utilizamos las secuencias de dichos contigs.

2.1 Ensamblaje de la secuencia- Se empleó la secuencia nucleotídica publicada del gen *white* de *D. melanogaster* (ID=FBgn0003996) como secuencia “*query*” para seleccionar aquellos contigs que incluyeran regiones del gen *white* de *D. willistoni*. La secuencia en *D. melanogaster* se obtuvo desde la base de datos FlyBase, mientras que la secuencia de los contigs se encontraban publicadas en Cross-Species Mega BLAST (septiembre 2005). Para la búsqueda de homología sobre los contigs de *D. willistoni*, se utilizó el programa de alineamiento BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Las secuencias seleccionadas de los contigs fueron alineadas y posteriormente ensambladas utilizando el programa SeqMan II (DNASTAR).

2.2 Anotación del gen- La anotación del gen *white* se realizó utilizando los programas MEGA 3 (Kumar y col. 2004) y Artemis (Rutherford y col. 2000). Para la delimitación de los exones se tuvo en cuenta la conservación tanto de las secuencias nucleotídicas como de la secuencia aminoacídica putativa, en relación a la especie *D. melanogaster*.

3 ANÁLISIS DE LOS ALELOS MUTANTES DEL GEN “*white*” EN *D. willistoni*

3.1 Diseño de cebadores- Se diseñaron cebadores específicos para la secuencia nucleotídica del gen *white* de *D. willistoni* anotada en esta Tesis, empleando el programa PrimerSelect (DNASStar). Se mandaron construir (IDT DNA Technologies Inc.) cinco cebadores (TABLA 2) los que se emplearon tanto para el análisis por secuenciación como para la amplificación de las sondas utilizadas en el análisis por *Southern blot* de los distintos alelos del gen *white* de *D. willistoni*.

TABLA 2- Lista de cebadores para el gen *white* de *D. willistoni*.

Nombre	Secuencia (5' a 3')	T _m (°C)	Ubicación
w.fE2 (Forward)	GAGAATCTTACCTATGCCTGGCAC	64	2° exón
w.int f (Forward)	CTAATGGCAGAGGGACGTGTG	64	3° exón
w.r (Reverse)	CAATCGAAGAGCCACATAAGCGAATC	64	6° exón
w.RegF (Forward)	GTTGGGTTGCTTATTTGTCT	56	5' al 1° exón
w.RegR (Reverse)	GTTTGGCTTGGCTCTACTC	58	3' al 1° exón

3.2 Extracción de ácidos nucleicos

ARN- La extracción del ARN total de moscas adultas de la cepa salvaje WIP-4 y la cepa mutante Ey10.00 *w^{ef}*, se realizó con Tiocianato de guanidinio en base a una modificación del protocolo de Chomczynski y Sacchi (1987). Se maceran

aproximadamente 0,5 gramos de moscas adultas, lo que produce varios microgramos de ARN total. El ARN total fue sometido a tratamiento con DNasa previo a la retrotranscripción. Se confirmó su integridad mediante electroforesis en gel (agarosa al 1 %) y se realizó una cuantificación mediante el uso de espectrofotómetro (Protocolo detallado en ANEXO D1).

ADN- Se realizó la extracción de ADN genómico correspondiente a las líneas salvaje, *w¹*, *w^a*, *w^{ef}* así como de cepas pertenecientes a grupos externos *D. melanogaster*, *D. immigrans*, *D. nebulosa* y *Zaprionus indianus*. Se utilizaron moscas adultas, anestesiadas con trietilamina y trituradas en buffer de lisis ((Tris-HCl, pH=8 1M; EDTA, 0,5M; NaCl 5M) con homogeneizador en hielo. El ADN fue extraído con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), precipitado con etanol, y el pellet resultante fue resuspendido en agua. Posteriormente fueron analizados en gel de agarosa y cuantificados por espectrofotometría (Protocolo detallado en ANEXO D2).

3.3 Obtención del ADN complementario- Esta técnica se realizó con la enzima RT SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) según sus especificaciones, utilizando oligo dT.

3.4 Amplificación de la secuencia codificante- El ADNc y el ADNg obtenidos de las diferentes cepas de *D. willistoni* fueron utilizados como molde en reacciones de PCR. Dicha amplificaciones se llevaron a cabo en condiciones estándar, las que se resumen en la TABLA 3. Se utilizaron temperaturas de “annealing” adecuadas a cada par de cebadores utilizados (TABLA 2), las que fueron calculadas con el programa OligoAnalyzer 3.1 publicado en la página www.idtdna.com.

TABLA 3- Condiciones de PCR.

	Tiempo	Temperatura (°C)
Desnaturalización inicial	3 min.	94
30 ciclos	Desnaturalización	94
	Annealing	(TABLA 2)
	Extensión	72
Extensión final	5 min	72

3.5 Clonación de amplicones- Se concentraron y purificaron los productos de PCR mediante una corrida en gel de agarosa (Kit de purificación Qiagen) y corte de banda, según sus especificaciones. Se realizó la ligación con un vector de tipo pJET1.2 (CloneJET PCR Cloning Kit, Fermentas). Dicha ligación se utilizó para la realización de una transformación en una cepa bacteriana competente (XL1-Blue) (Protocolo detallado en ANEXO D3). Las colonias fueron analizadas y seleccionadas mediante screening por PCR utilizando los cebadores específicos del inserto. Las colonias confirmadas por PCR y secuenciación como positivas para la presencia del inserto se replaquearon, reislaron y congelaron en glicerol al 50 % en un freezer a -80°C hasta su uso. Se clonaron dos fragmentos correspondientes a la región del primer exón y a la región entre el exón 3 al 6

3.6 Aislamiento de ADN plasmídico- Aquellas colonias conteniendo los ADNc de interés fueron utilizadas para la purificación del plásmido conteniendo el inserto, mediante la realización de una miniprep utilizando un kit de purificación (Kit para purificación de plásmidos, High Purity Plasmid Miniprep System- Marligen, Bioscience).

3.7 Secuenciación- Se secuenciaron los amplicones pertenecientes a los alelos salvaje y mutantes del gen *white* de *D. willistoni*, en la Universidad de Santa María (ver más adelante).

3.8 Análisis de los amplicones- Para el análisis de las secuencias (salvajes y mutantes) se utilizaron el programa web BLASTn y los programas bioinformáticos PreGap, Gap, GeneDoc y ClustalW.

3.9 Southern Blot

Para investigar la presencia de posibles inserciones o deleciones en el locus *white* en las líneas estudiadas, el ADN genómico fue analizado por la técnica de *Southern blot* (Protocolo detallado en ANEXO D4).

3.9.1 Enzimas de restricción- Las enzimas de restricción (ER) se eligieron mediante análisis del mapa de restricción del locus *white* de *D. willistoni* (anotado en esta Tesis), utilizando el programa GeneRunner v3.05. Se utilizaron aproximadamente 15 µg de ADN genómico de cada cepa, analizado en gel de agarosa y cuantificado por espectrofotometría. Este fue purificado con vidrio molido (según protocolo de De Oliveira y col. 2009) o tierra de diatomeas, procedimiento necesario previo al tratamiento con enzimas de restricción. La eficacia de la digestión fue corroborada en gel de agarosa.

3.9.2 Sondas- Se utilizaron dos sondas específicas para *D. willistoni*, obtenidas por PCR de los fragmentos clonados.

Luego de la digestión del ADNg, los fragmentos de ADN se separaron por electroforesis en gel de agarosa 0,8% y se transfirieron a una membrana de nylon (Hybond-N + - GE Healthcare). Se utilizó una de las sondas descritas, la cual se marcó directamente con peroxidasa de rábano, HRP (ECL Labeling and Detection Systems, Amersham). La detección se llevó a cabo por la generación de luz mediante la

descomposición de luminol catalizada por HRP. Las películas de autorradiografía se expusieron primero a la membrana durante 2 horas y, dependiendo de la señal obtenida, se sometieron a períodos más largos.

Parte de estos análisis mediante *Southern blot* así como la secuenciación de los alelos salvaje y mutantes para el gen *white*, se llevaron a cabo en la Universidad de Santa María, Río Grande do Sul bajo la tutoría del Dr. Elgion Loreto del Departamento de Biología, Centro de Ciências Naturais e Exatas, quien ha colaborado con nuestro grupo en técnicas de genética molecular en *Drosophila*.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

1 ANOTACIÓN DEL GEN *white* DE *D. willistoni*

1.1 Secuencia nucleotídica del gen *white*

Se comenzó realizando el ensamblado in-silico de la secuencia nucleotídica del gen *white*. Para esto se llevó a cabo una búsqueda de homología mediante alineamiento de secuencias (blastn), utilizando como “*query*” la secuencia de 5868 pb correspondiente a la región génica⁶ del gen *white* de *D. melanogaster* (ID=FBgn0003996) adquirida de FlyBase. Se obtuvieron aquellos contigs de *D. willistoni* cuya secuencia nucleotídica presentó similitud significativa con la secuencia de *D. melanogaster* (FIGURA 6). La longitud promedio de los contigs fue de 1032 pb y los podemos distinguir en la FIGURA 6, agrupados en la región correspondiente a los exones 2 al 6 del gen *white* de *D. melanogaster*. No se obtuvieron contigs con homologías significativas a la región del primer exón y primer intrón del gen *white* de *D. melanogaster* (primeros 3338 pb).

Las secuencias de los contigs presentaban regiones solapantes que permitieron el alineamiento de un contig con el siguiente, y el ensamblaje para obtener una secuencia nucleotídica consenso para *D. willistoni*. Posteriormente, se empleó la región de los extremos de esta primera secuencia consenso para realizar una nueva búsqueda de contigs mediante alineamiento de secuencias. A través de la repetición de este procedimiento obtuvimos un total de 120 contigs, cuyo ensamblaje empleando el programa Seqman II (DNASTAR) dio una secuencia consenso de 17.292 pb (FIGURA 7). A partir de ésta última, se realizó la anotación del gen *white* de *D. willistoni*.

6 **Región Génica** (*Gene Region*) definida por Flybase como la región del gen comprendida entre el principio y el fin del transcritto más largo

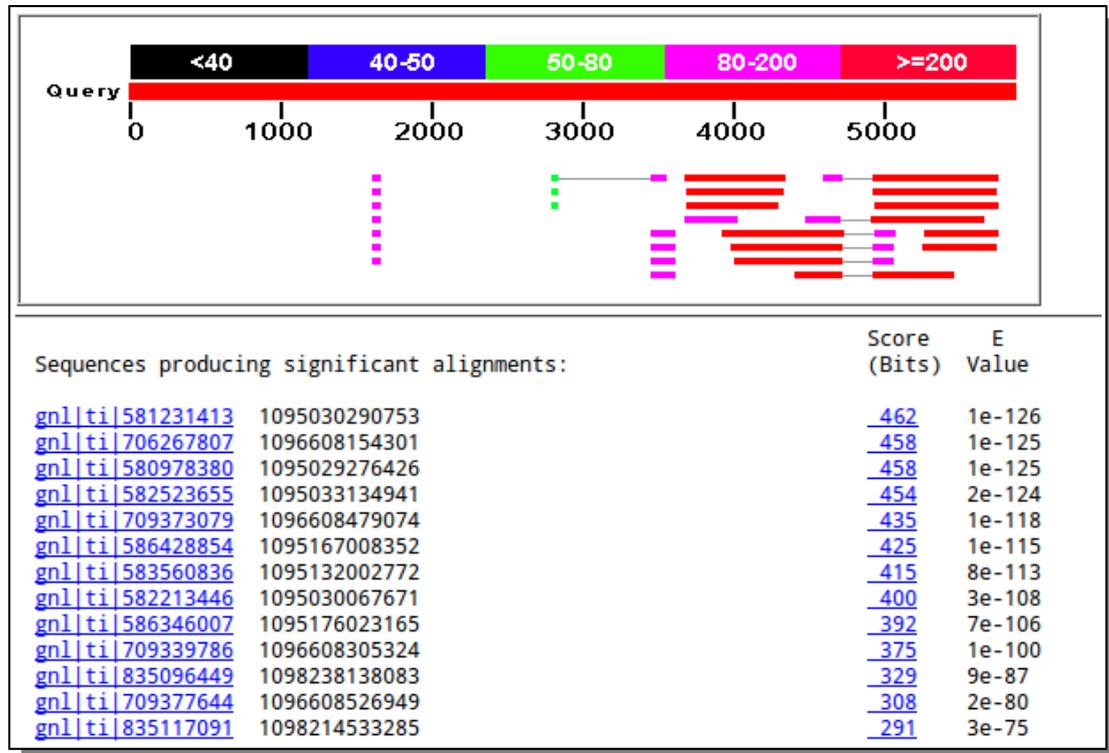


FIGURA 6- Selección de contigs del genoma de *D. willistoni*. La imagen se obtuvo del alineamiento de la secuencia de la región codificante del gen *white* para *D. melanogaster* con las secuencias de los contigs del genoma de *D. willistoni*. La lista debajo corresponde a los contigs con similitud significativa para dicha región.

La identificación de la secuencia de codificación (CDS) es un paso importante en la anotación de los genes. El CDS es una secuencia nucleotídica que se corresponde con la secuencia de aminoácidos en la proteína. Un CDS típico comienza con el codón de inicio de la traducción ATG y termina con un codón STOP.

Para la determinación del CDS del gen *white* de *D. willistoni* primero se delimitaron los límites putativos de cada exón individualmente. El procedimiento para determinar los límites y composición de los exones consistió en emplear la secuencia nucleotídica de un único exón por vez del gen *white* de *D. melanogaster* y alinearlo con la secuencia consenso completa para *D. willistoni*.

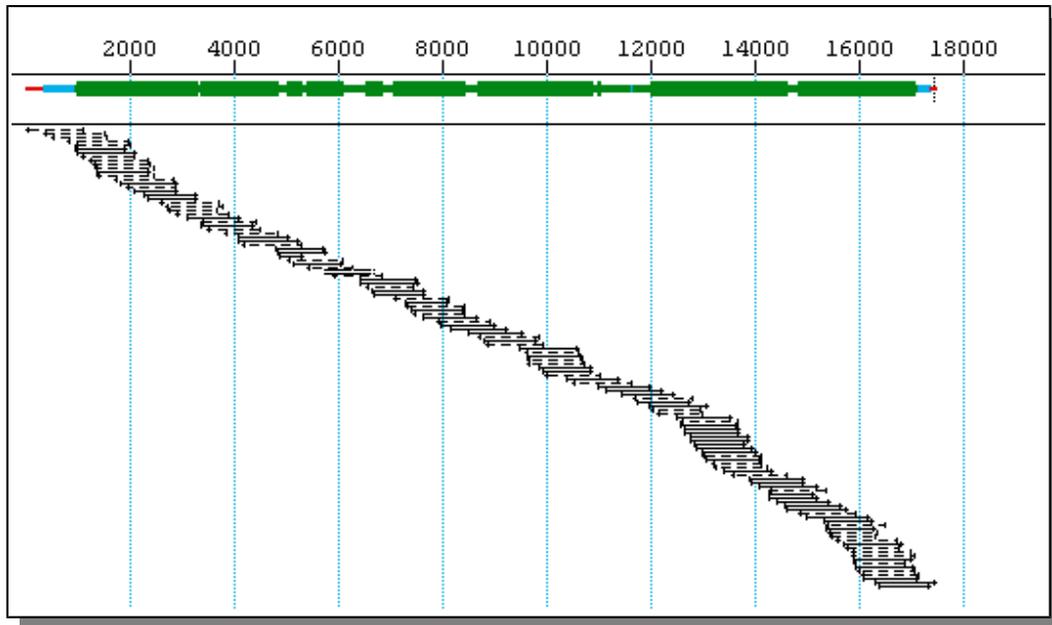


FIGURA 7- Alineamiento y ensamblaje de la secuencia nucleotídica del locus *white* en *D. willistoni*. En verde se esquematiza la secuencia consenso obtenida. La regla indica la longitud en pb de la secuencia. Las líneas horizontales (abajo) indican la extensión que cubre cada uno de los 120 contigs.

El programa utilizado (MEGA3) no detectó, en primera instancia, los límites de la región codificante del primer exón para *D. willistoni*, que en *D. melanogaster* cuenta sólo con 72 pb. Por lo tanto, en este caso la búsqueda comparativa se realizó utilizando las secuencias aminoacídicas. Se alinearon la secuencia de aminoácidos codificada por el primer exón de *D. melanogaster* contra la secuencia consenso de *D. willistoni* traducida en los tres posibles marcos de lectura. Esto permitió determinar los límites putativos de la secuencia aminoacídica codificada por el primer exón y delimitar la secuencia nucleotídica que en *D. willistoni* es de 72 pb. Existe un 76% de similitud entre las secuencias nucleotídicas de la región codificante del primer exón de *D. melanogaster* y *D. willistoni*, y una similitud del 83% entre las secuencias aminoacídicas de dichas especies.

Los límites de los exones restantes (2 al 6) se determinaron sin dificultad empleando directamente las secuencias nucleotídicas a través del mismo procedimiento. Las longitudes obtenidas de los exones 2 al 6 son 287 pb, 655 pb, 316 pb, 132 pb y 612

pb respectivamente. Dichos exones presentan un 77 % de similitud de secuencia nucleotídica entre estas dos especies, mientras que al analizar la proteína putativa se encontró un 94% de similitud entre las secuencias de aminoácidos. Existe un 77% de similitud entre las secuencias nucleotídicas del CDS completo de *D. melanogaster* y el de *D. willistoni* (FIGURA 9).

Una vez determinada la secuencia y extensión del CDS, el cual presenta una longitud de 2076 pb, se ubicaron todos los exones en la secuencia consenso de *D. willistoni* (FIGURA 8) para luego determinar la extensión de los intrones. La estrategia empleada permitió anotar la región codificante (exones e intrones) completa del gen *white* de *D. willistoni*, la que presenta una longitud de 8238 pb (ver secuencia completa mostrada en el ANEXO B1).

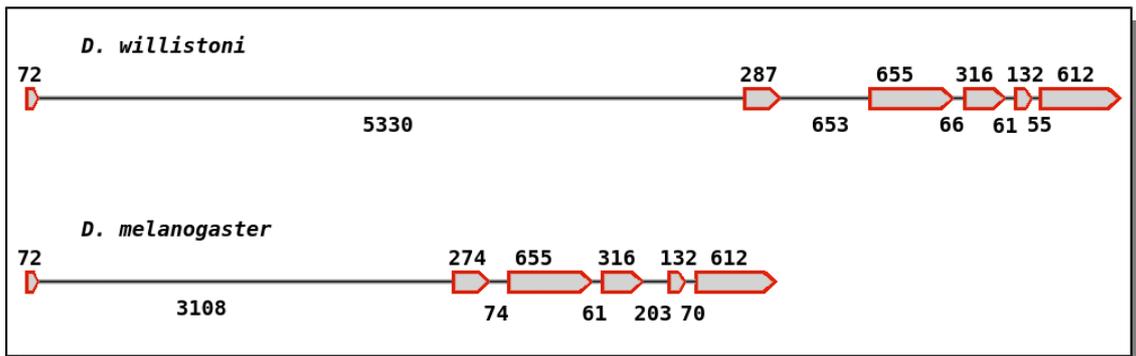


FIGURA 8- Estructura de la región codificante del gen *white* de *D. willistoni* (arriba) y *D. melanogaster* (abajo). Exones del 1 al 6 (en rojo), de izquierda a derecha). Se detalla la longitud en pb de los exones (encima) y de los intrones (debajo).

Drosophila melanogaster white (w), mRNA
 Sequence ID: [ref|NM_057439.2](#) Length: 2352 Number of Matches: 1

Range 1: 159 to 2221 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1606 bits(1780)	0.0	1603/2081(77%)	24/2081(1%)	Plus/Plus
Query 1	ATGGGT	CAGGAGGATCAAGAGCTATTAATACGCGGCAATAGTAAAAACCTCAGCCGAG		60
Sbjct 159	ATGGGCCAAGAGGATCAGGAGCTATTAATTCGCGGAGGCAGCAAAACCCCATCTGCCGAG			218
Query 61	CATTTGCATAATGGTGATACAACAACCCTGCTGGTGGTGCCACCTCCCAGAGCTGCATT			120
Sbjct 219	CATCTGAACAATGGTGACA-----GCGGAGCGGCTTCGAGAGCTGCATT			263
Query 121	AATCAGAGCTTTGGACAAAGCAAAAACCTACGGAAACCTAAATACACCGCCACAGCCCGAT			180
Sbjct 264	AACCAGGGCTTCGGGCAGGCCAAAAACTACGGCACGCTCCGGCCACCCAGTCCGCCGAG			323
Query 181	GATGGCAACAGTTCAACG-----CAATTGGCCGAGAATCTTACCTATGCCTGGCACAAAT			234
Sbjct 324	GA---CTCCGGTTCAGGGAGCGGCCAACTAGCCGAGAACCTCACCTATGCCTGGCACAAAT			380
Query 235	CTGGATATATTTGGGGCTGTTAATCAGCCCGGCTCTGGCTGGCGTCAATTGGTCAATCGT			294
Sbjct 381	ATGGACATCTTTGGGGCGGTCAATCAGCCGGGCTCCGGATGGCGGCAGCTGGTCAACCGG			440
Query 295	ACACGTGGCCTCTTCTGCAATGAACGTATATACCAGCGCCACGAAAAATTTACTCAAA			354
Sbjct 441	ACACGCGGACTATTCTGCAACGAGCGACACATACCAGCGCCACGAAAAATTTGCTCAAG			500
Query 355	AACGCTGCGGTGTGGCCTATCCCGGTGAACTATTGGCAGTTATGGGTAGCTCTGGAGCT			414
Sbjct 501	AACGTTTGCGGCGTGGCCTATCCGGGCGAACTTTGGCCGTGATGGGCAAGTCCGGTGCC			560
Query 415	GGTAAGACAACCTTTGCTGAATGCTTTGGCCTTTCGTTACCCGCAAGGCATTGAGGTGTCA			474
Sbjct 561	GGAAAGACGACCCTGCTGAATGCCCTTGCCTTCGATCGCCGAGGGCATCCAAGTATCG			620
Query 475	CCATCGGGAATGAGACTACTTAATGGTCAGCCGGTCGATGCCAAAGAGATGCAGGCTCGA			534
Sbjct 621	CCATCCGGGATGCGACTGCTCAATGGCCAACTGTGGACGCCAAGGAGATGCAGGCCAGG			680
Query 535	TGTGCTTATGTGCAGCAAGATGATCTATTTATGGTTTCGCTGACAGCTCGCGAACATTTG			594
Sbjct 681	TGCGCCTATGTCCAGCAGGATGACCTCTTTATCGGCTCCCTAACGGCCAGGGAACACCTG			740
Query 595	ATATTCATGCCATGGTCCGAATGCCCGCAATTTGACATACAACAGCGTGTGGCACGA			654
Sbjct 741	ATTTTCCAAGCCATGGTCCGGATGCCACGACATCTGACCTATCGGCAGCGAGTGGCCGCG			800
Query 655	GTGGATCAGGTAATACAGGAATTGTCGTTGAGCAAGTGCCAGAATACGATAATCGGTGTT			714
Sbjct 801	GTGGATCAGGTGATCCAGGAGCTTTCGCTCAGCAAATGTCAGCACACGATCATCGGTGTG			860
Query 715	CCGGGTCGTGTGAAGGGTCTTTCGGGTGGCGAGCGAAAACGTTTGGCCTTCGCCTCAGAA			774
Sbjct 861	CCCGGCAGGGTGAAGGTCTGTCCGGCGGAGAAAGGAAGCGTCTGGCATTGCTCCGAG			920
Query 775	GCTCTACCCGATCCACCGCTGTTGATATGCGATGAACCCACCTCGGGACTGGATTCATTT			834
Sbjct 921	GCTCTAACCGATCCGCCGCTTCTGATCTGCGATGAGCCACCTCCGGACTGGACTCCTTT			980
Query 835	ACAGCCCATAGTGTGGTCAAGTACTGAAGAAGCTATCGCAAAGGGCAAAAACCTGTCATT			894
Sbjct 981	ACCGCCACAGCGTCGTCCAGGTGCTGAAGAAGCTGTCGAGAAGGGCAAGACCGTCATC			1040
Query 895	CTAACCATACATCAGCCGTCCTCGGAATTATTTGAGCTATTTGACAAGATCTTCTAATG			954
Sbjct 1041	CTGACCATTATCAGCCGCTTCCGAGCTGTTGAGCTCTTTGACAAGATCTTCTGATG			1100
Query 955	GCAGAGGGACGTGTGGCCTTCTCGGCACACCCAGCGAGGCAGTGGACTTCTTCTCATA			1014
Sbjct 1101	GCCGAGGGCAGGGTAGTTTTCTTGGGCACTCCAGCGAAGCCGTCGACTTCTTTTCTAC			1160
Query 1015	GTGGGAGCTCAGTGTCCAACAAAACATAATCCAGCTGATTTCTATGTCCAAGTGTGGCT			1074
Sbjct 1161	GTGGGTGCCAGTGTCTACCAACTACAATCCGGCGGACTTTACGTACAGGTGTTGGCC			1220

continuación...

Query	1075	GTTGTGCCTGGCAGGGAGTTAGAATCGCGTGATCGCATTGCCAAAATTTGCGATAACTTC	1134
Sbjct	1221	GTTGTGCCCCGGACGGGAGATCGAGTCCCCTGATCGGATCGCCAAGATATGCCACAATTTT	1280
Query	1135	GCCATTAGTAAGGTGGCTAGGGATATGGAGCAATTGCTGGCAGCCAAGACCAATCGCAG	1194
Sbjct	1281	GCCATTAGCAAAGTAGCCCGGATATGGAGCAGTGTGGCCACCAAAAATCTGGAGAAG	1340
Query	1195	CCGCTGGAGCAACCAGAGAATGGATACACCTATAAGGCCACCTGGTTATGCAATTCGGA	1254
Sbjct	1341	CCACTGGAGCAGCCGGAGAATGGGTACACCTACAAGGCCACCTGGTTATGCAAGTCCGG	1400
Query	1255	GCTGTATTATGGCGTTCATGGTTATCCGTGCTTAAGGAACCATTGTTGGTTAAAGTGGCA	1314
Sbjct	1401	GCGGTCCTGTGGCGATCCTGGCTGTCCGTGCTCAAGGAACCCTCCTCGTAAAAGTGGCA	1460
Query	1315	CTCATTCAAACGACGATGGTTGCCATACTCATTGGATTAATCTTTCTGGGTGAGCAACTG	1374
Sbjct	1461	CTTATTGAGCAACGATGGTTGCCATCTTGATTGGCCTCATCTTTTGGGCCAACAACTC	1520
Query	1375	ACCCAAGTCGGTGTGATGAATATCAATGGAGCCATCTTTCTGTTTTGACCAATATGACG	1434
Sbjct	1521	ACGCAAGTGGGTGTGATGAATATCAACGGAGCCATCTTCTCTTCTGACCAACATGACC	1580
Query	1435	TTTCAGAATGTATTTGCCACCATAAATGTCTTACATCCGAACTGCCTGTCTTTATGAGG	1494
Sbjct	1581	TTTCAAAACGCTTTGCCACGATAAATGTGTTCACTCAGAGCTGCCAGTTTTATGAGG	1640
Query	1495	GAATCTCGTAGCCGTTTGTATCGTTGTGATACGTATTTCTGGGCAAGACTATAGCCGAA	1554
Sbjct	1641	GAGGCCCGAAGTCGACTTTATCGCTGTGACACATACTTCTGGGCAAAACGATTGCCGAA	1700
Query	1555	CTGCCACTGTTTCTACTGTTCCACTGGTTTTACAGCGATTGCCTATCCCATGATTGGA	1614
Sbjct	1701	TTGCCGCTTTTCTCACAGTGCCACTGGTCTTACGGCGATTGCCTATCCGATGATCGGA	1760
Query	1615	TTACGGGCCGGAGTTGGCATTCTTTAATTGTTGGCCCTGGTCACTTTGGTGGCGAAT	1674
Sbjct	1761	CTGCCGGCCGGAGTGTGCACTTCTTCAACTGCCTGGCGTGGTCACTCTGGTGGCCAAT	1820
Query	1675	GTTTCCACATCGTTTGGCTATCTCATCTCCTGTGCCAGCTCATCCACATCAATGGCGCTG	1734
Sbjct	1821	GTGTCAACGTCCTTCGGATATCTAATATCCTGCGCCAGCTCCTCGACCTCGATGGCGCTG	1880
Query	1735	TCGGTGGGCCACCAGTGATTATACCATTCTTCTGTTTGGTGGTTTTCTTTTGAATTCC	1794
Sbjct	1881	TCTGTGGGTCCGCCGTTATCATACCATCTCTGCTCTTGGCGGCTTCTCTTGAACCTG	1940
Query	1795	GGCTCAGTGCCTATTTATCTGAAATGGTTGTCAATTTATCCTGGTCCGTTATGCCAAC	1854
Sbjct	1941	GGCTCGGTGCCAGTATACCTCAAATGGTTGTGCTACCTCTCATGGTCCGTTACGCCAAC	2000
Query	1855	GAGGGCCTACTCATCAATCAATGGGCCGATGTGGAGCCGGGCGAGATTACCTGCACCTCA	1914
Sbjct	2001	GAGGGTCTGCTGATTAACCAATGGGCCGACGTGGAGCCGGGCGAAAATTAGCTGCACATCG	2060
Query	1915	TCAAACACCACATGCCCCAGTTCGGGTAAAGTTATATTGGAGACATTGAACTTTTCTGCT	1974
Sbjct	2061	TCGAACACCACGTGCCCCAGTTCGGGCAAGGTATCCTGGAGACGCTTAACTTCTCCGCC	2120
Query	1975	GCCGATTTACCGCTGGATTATGTGGGATTGGCTTACTTATTATAAGTTTCCGAGGATTC	2034
Sbjct	2121	GCCGATCTGCCGCTGGACTACGTGGGTCTGGCCATTCTCATCGTGAGCTTCCGGGTGCTC	2180
Query	2035	GCTTATGTGGCTCTTCGATTGCGAGCCAGGCGCAAGGATTA	2075
Sbjct	2181	GCATATCTGGCTCTAAGACTTCGGGCCCGACGCAAGGAGTA	2221

FIGURA 9- CDS del gen *white*. Resultado de la búsqueda por Blastn empleando la secuencia anotada para el CDS del gen *white* como “*query*”. La secuencia “*subject*” corresponde al CDS del gen *white* de *D. melanogaster* publicada en FlyBase.

El promotor mínimo (*core promoter*) del gen *white* de *D. melanogaster* fue caracterizado por Kutach y Kadonaga (2000). Éste comprende las secuencias de ADN que dirigen la maquinaria transcripcional al sitio de inicio de la transcripción. Presenta el elemento Inr, secuencia conservada que incluye el sitio de inicio de la transcripción; y el elemento DPE, secuencia conservada que permite la unión de TFIID (factor de transcripción IID).

Para la caracterización del promotor mínimo en *D. willistoni* se analizó una región de 500 pb *upstream* al primer exón, mediante búsqueda de homologías de secuencias nucleotídicas con la secuencia de *D. melanogaster*. De esta forma se pudo determinar la localización del elemento Inr y el elemento DPE pertenecientes al promotor mínimo putativo en *D. willistoni* (FIGURA 10). Estos dos elementos son idénticos en ambas especies, y la secuencia entre ellos es altamente conservada.

		Inr			DPE			
<i>D. melanogaster</i>	CCT	TCAGTT	GCAC	TTTGT	CAGCG	TTTCGTGAC	GAAG	CTCCAAGC
<i>D. willistoni</i>	ACC	TCAGTT	GCAT	TTTGT	CAGCG	TTTCGTGAC	GAAG	TTCATACG

FIGURA 10- Anotación del promotor mínimo putativo del gen *white* de *D. willistoni*. Se delimitan los elementos Inr y DPE. Sitios conservados se señalan con puntos azules. La flecha indica el sitio de inicio de la transcripción.

La comparación de secuencias entre genes ortólogos evidenció la presencia de dos regiones altamente conservadas en el primer intrón del gen *white*. Una primera región de 54 pb la cual presenta un 98% de similitud entre las secuencias de *D. willistoni* y *D. melanogaster*. Una segunda región de 44 pb, la cual presenta un 95% de similitud entre las secuencias de dichas especies (FIGURA 11, ver secuencias mostradas en el ANEXO B1). Estas regiones de secuencia no han sido caracterizadas en la especie *D. melanogaster*. Su alta conservación, incluso mayor que la presentada por los exones, sugiere la posibilidad de que cumplan una función importante, pero su determinación requerirá de nuevos estudios.

En la FIGURA 11 se presenta la anotación del gen *white* de *D. willistoni*.

En 2008 se publicó la secuencia putativa del CDS del alelo salvaje del gen *white* de *D. willistoni* (*Drosophila 12 Genomes Consortium*). Esta secuencia lleva el código de identificación "Dwil\GK25399"(Accesion Number [XM_002070905.1](#)). Se realizó un alineamiento con el programa Blastn. Al comparar la secuencia del CDS que se presenta en esta Tesis con la secuencia publicada en FlyBase, se encontró que son idénticas.

1.2 Proteína White

La proteína White putativa obtenida para *D. willistoni* contiene 691 aminoácidos (aa), presentando en total, 4 aa adicionales a la secuencia reportada en *D. melanogaster*. Al comparar ambas secuencias aminoacídicas se encontró que la proteína en *D. willistoni* presenta 5 aa más en las posiciones 28 a 32 y uno menos en la posición 62, contenidos en la región codificada por el segundo exón (FIGURA 12).



FIGURA 12- Alineamiento entre la proteína White de *D. willistoni* y *D. melanogaster*. Se recuadraron los sitios que presentan diferencia de secuencias.

La proteína White, al igual que otros transportadores ABC, presenta dos tipos de dominio, TMD (Transmembrane domain) y NBD (Nucleotide binding domain). Sólo los dominios NBD son homólogos a lo largo de toda la familia de transportadores ABC, portando varios motivos conservados característicos (Linton, 2007). El análisis de la proteína White de *D. willistoni* reveló la presencia de motivos conservados propios del dominio NBD. Los motivos encontrados son: Walker A, Q-Loop, ABC signature, Walker B y D- Loop. Para la caracterización del dominio NBD utilizamos secuencias anotadas del gen *white* de otras especies de dípteros (FIGURA 13).

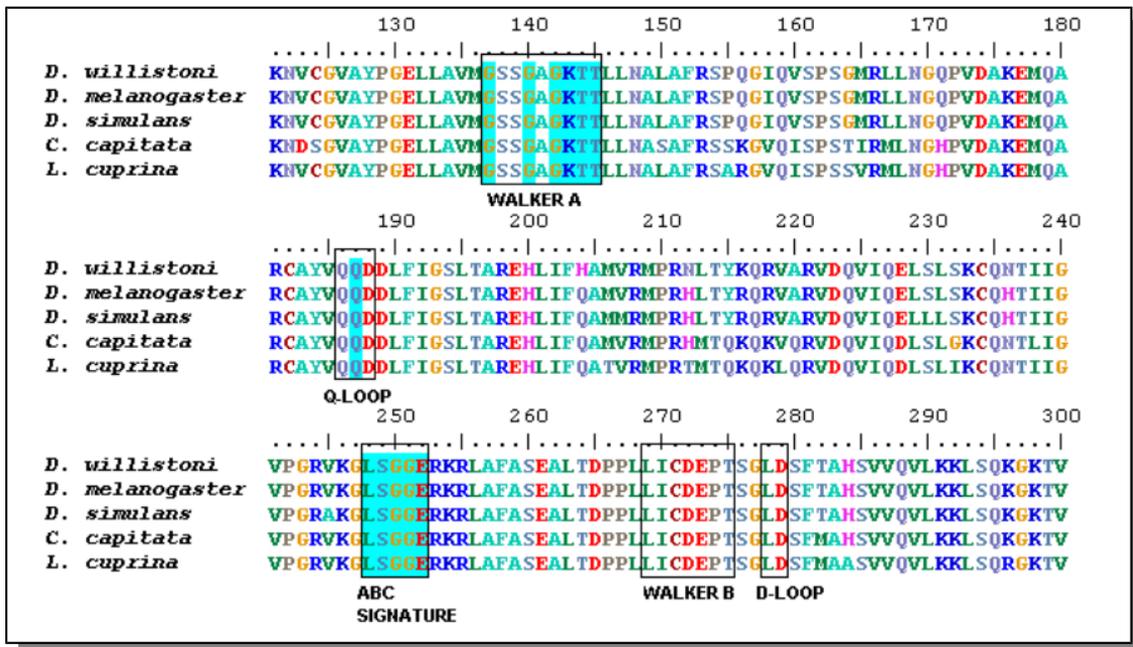


FIGURA 13- Alineamiento de la secuencia NBD (dominio de unión a nucleótido) de la proteína White. Se encuadraron las secuencias de los motivos conservados.

2 ANÁLISIS DE ALELOS MUTANTES PARA EL GEN “white” EN *D. willistoni*

Entre las líneas puras con alelos mutantes de *D. willistoni*, se seleccionaron aquellas que por homología fenotípica y de ligamiento genético con *D. melanogaster*, corresponderían a alelos del gen *white*. Cabe destacar que durante la realización del análisis de las líneas mutantes, la línea w^1 EM1.00 se envió al Dr. Thomas Kaufman

(EEUU) y se encuentra disponible en *The Drosophila Species Stock Center* (DSSC), University of California, San Diego. Esta línea fue genéticamente manipulada para ensayos de transformación, empleándose como gen reportero el gen *mini-white*, versión truncada del gen *white* (falta parte del primer intrón). Este gen se utiliza como marcador seleccionable en construcciones de transformación certificando que la transformación ha sido exitosa. En un individuo homocigota para el alelo *white* nulo, una copia del transgén produce ojos anaranjados y dos copias da un color más oscuro, restableciendo (parcial o totalmente) el fenotipo salvaje. Por lo que se confirmó que la línea con la cual se trabajó en esta tesis, porta el alelo nulo para el gen *white*. [**Construct:** pBac(3xP3-EGFPafm)::nos-Gal4::(pW8-mini-white) **Stock Number:** 14030-0811.37].

2.1 Análisis de las líneas mutantes mediante secuenciación

En base a la secuencia anotada (en esta Tesis) del gen *white* de *D. willistoni* se diseñaron los cebadores (TABLA 2, en Materiales y Métodos). Éstos se emplearon para amplificar la mayor parte de la región codificante a la que se llamó **Región 2-6** (del exón 2 al exón 6) con una longitud esperada de 2683 pb para el alelo salvaje (FIGURA 14). Un nuevo primer se empleó para amplificar el extremo 3' de la región codificante, a la que se llamó **Región 3-6** (del exón 3 al exón 6) con una longitud esperada de 1289 pb. La Región 3-6 se encuentra incluida en la Región 2-6 y para su amplificación se empleó el mismo cebador *reverse*. Una tercer región que incluye al primer exón, **white exón1**, con una longitud esperada de 1085 pb. Los cebadores se diseñaron para la región no codificante debido a que la región codificante del exón 1 es muy pequeña (72 pb).

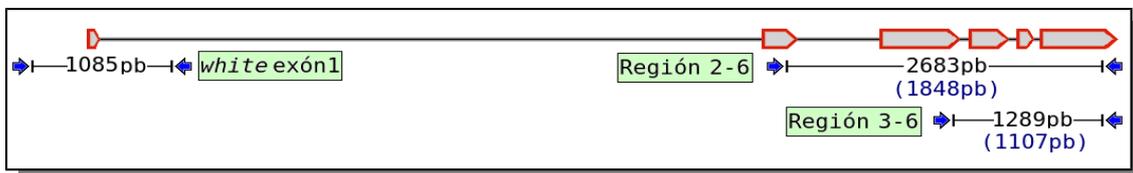


FIGURA 14- Cebadores para el gen *white* de *D. willistoni*. Las flechas indican la ubicación de los cebadores. Se detalla la longitud en pb de la región amplificada con molde ADN genómico (negro) y ADN complementario (azul).

Se inició el estudio realizando la extracción de ARN total a partir de moscas adultas de *D. willistoni* de la cepa salvaje y de la cepa mutante *w^{cf}* para el gen *white* en estudio (FIGURA 15) y posterior retrotranscripción para obtener el ADN complementario.

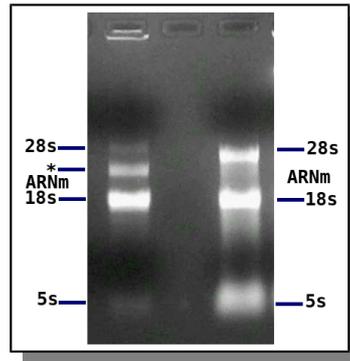


FIGURA 15- Electroforesis en gel de agarosa del ARN total (ARNr 28s, ARNr18s, ARNr 5s y ARNm) de *D. willistoni* en el primer carril y de mamífero en el último carril. El ARN total de *Drosophila* tiene un perfil distintivo en una corrida electroforética debido al procesamiento diferencial del ARN ribosomal 28S durante su maduración en el citoplasma, también observado en varias especies de insectos (Jordan y col 1976). *ARNr 28s procesado.

Se determinaron las condiciones para la extracción de ARN y retrotranscripción de modo de obtener ADNc en cantidades detectables (FIGURA 16), aunque existieron inconvenientes en la amplificación posterior con cebadores para el gen *white*. Se descartó que pudiera deberse a una mala conservación del ARN o a la eficiencia de la retrotranscripción, ya que no hubo problema en la obtención del ADNc para el gen de Actina y su posterior amplificación (datos no presentados). Si bien la técnica de extracción de ARN utilizada produjo altas cantidades de ARN total puede no haber sido la más idónea para trabajar con genes de copia única, como es este caso. Se postula que la extracción a partir de moscas enteras pudo disminuir mucho la proporción del ARN buscado, y por lo tanto, las concentraciones de ADNc para el gen *white* hayan sido muy bajas, teniendo en cuenta que el ARN mensajero para el gen *white* probablemente se expresa, como ocurre en *D. melanogaster*, solo en ciertos tejidos del individuo adulto. En *D. melanogaster* la expresión del ARNm predomina en los túbulos de Malpighi, en

los ojos es alrededor de 8 veces menor y aún menor en otros tejidos (Fjose y col 1984, FlyBase).



FIGURA 16- Amplificación del ADNc *white*. Se señala el producto de amplificación del ADNc *white* (1848 pb, Región 2-6) para la cepa salvaje (flecha) y para la cepa mutante *white^{ef}* (punta de flecha) de *D. willistoni*, los cuales presentan el peso molecular esperado. Corrida electroforética en gel de poliacrilamida, los dos últimos carriles corresponden a pesos moleculares

Debido a los inconvenientes encontrados en el análisis del ADN complementario se emprendió la caracterización de los alelos mutantes para el gen *white* a partir de ADN genómico.

Se amplificó la **Región 3-6** (descrita en la FIGURA 14) del gen *white* a partir de ADN genómico y se envió a secuenciar el amplicón, obteniendo una secuencia de 537 pb correspondiente a la banda de 1289 pb (cepa salvaje). Su análisis confirmó que dicho producto se trataba del gen *white* previamente anotado. Esta secuencia se registró en el GenBank con el número de acceso EF015882.

Se realizó la amplificación por PCR a partir de ADNg de las líneas salvaje y mutantes, de la región **Región 2-6**, la cual abarca la mayor parte de la región codificante del gen *white* (FIGURA 17). Su secuenciación se llevó a cabo en el Laboratorio del Dr. Elgion Loreto (Universidad Federal de Santa María, Brasil), durante una pasantía. Se utilizaron los tres cebadores esquematizados en la FIGURA 14. Hubieron problemas de

amplificación con un cuarto cebador (no se muestra). Se obtuvo una secuencia parcial de la región codificante del gen *white* analizada. No se encontraron diferencias entre las secuencias nucleotídicas obtenidas de los alelos mutantes *white* y el alelo salvaje.

Al amplificar por PCR las muestras a secuenciar, se observó que las bandas obtenidas a partir de las cepas mutantes tienen igual tamaño que la obtenida de la cepa salvaje (2683 pb, FIGURA 17) por lo que se concluyó que estas cepas no presentan ni inserciones ni deleciones detectables (de gran tamaño) en la región amplificada. Se retomará este dato en la interpretación de los resultados del análisis por *Southern blot*.

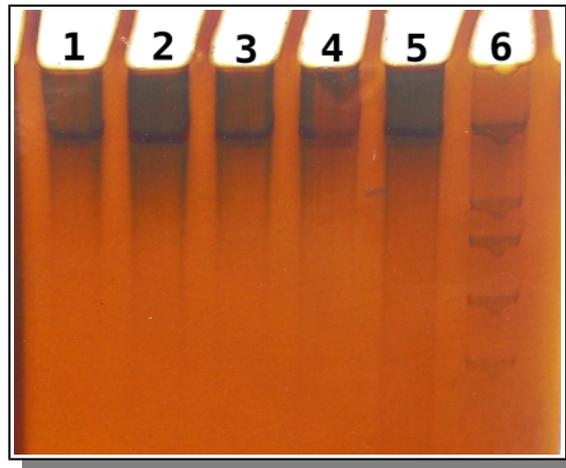


FIGURA 17- Amplificación de la región entre el exón 2 y 6 del locus *white* en las cepas mutantes w^1 (1) w^a (2) w^{cf} (3y4) y *salvaje* (5) de *D. willistoni*. (6) PM, bandas superiores 3015 pb y 2564 pb. Electroforesis en gel de poliacrilamida.

2.2 Análisis de las líneas mutantes mediante *Southern Blot*

Se estima que aproximadamente el 80% de las mutaciones espontáneas son debidas a la movilización de ETs. En *D. melanogaster* se han encontrado inserciones de ET como causantes de diversos alelos mutantes a todo lo largo del gen *white* (FlyBase), entre ellos el alelo *white apricot* debido a la inserción del elemento *Copia* en el segundo intrón.

En el establecimiento de las líneas mutantes en *D. willistoni* se encontró que la línea portadora del alelo nulo para el gen *white* (EM1.00) presentaba una mayor

frecuencia de mutaciones de origen espontáneo, proponiéndose como hipermutable (Parada y Goñi, 2003). Las líneas hipermutables en *Drosophila* se caracterizan, entre otros, por la aparición de varias mutaciones espontáneas como producto de la movilización de ETs.

Teniendo en cuenta estos antecedentes decidimos investigar si el origen de los alelos mutantes en el locus *white* de *D. willistoni* se halla relacionado con la movilización de ET(s). Para ello empleamos la técnica de *Southern blot*, en donde se analizaron posibles variaciones de longitud de los fragmentos de restricción entre los genomas de las líneas mutantes en relación a la línea salvaje para el gen *white*.

En un primer *Southern* se analizó gran parte del locus *white*, y en base a los resultados de éste, se planificaron los siguientes análisis por *Southern blot* cubriendo las regiones *upstream* y *downstream*.

Dos fragmentos fueron clonados para generar las sondas. Estos son: **(1) *white* Región 3-6**, amplicón obtenido por PCR del alelo salvaje *white* a partir de ADNc del alelo salvaje *white*, cepa WIP4. Este presenta una longitud de 1108 pb. **(2) *white* exón1**, amplicón obtenido por PCR a partir de ADNg del alelo salvaje *white*, cepa WIP4, con una longitud de 1085 pb (FIGURA 14).

2.2.1 Región codificante y 3' del gen *white*

En el primer *Southern* se utilizó una sonda de 1108 pb que reconoce la región comprendida entre los exones 3 al 6 del gen *white* de *D. willistoni* (descrito en la FIGURA 14 como **Región 3-6**). Ésta fue obtenida mediante amplificación por PCR del fragmento clonado ***white* Región 3-6**, descrito anteriormente. Los diferentes ADN blanco fueron digeridos con la enzima de restricción Hind III, esperando un fragmento de aproximadamente 11.200 pb para el alelo salvaje (FIGURA 18).

Se observaron pequeñas diferencias en el tamaño de las bandas, para los alelos w^1 y w^f , en relación al alelo salvaje, tal cual se señala en la imagen del *Southern* (FIGURA 19) Se propone que la variación de longitud en la región de 11.242 pb pueda

deberse a una pequeña inserción en el locus *white* en los alelos mutantes analizados. No se encontró una variación detectable en la banda para el alelo w^a .

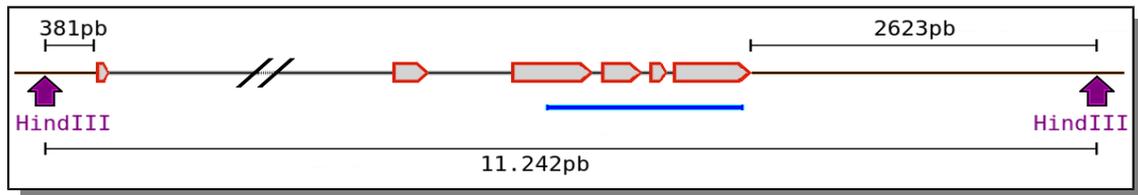


FIGURA 18- Esquema de la región del locus *white* con los cortes producidos por HindIII (flechas violetas) en relación a la sonda *white* (en azul).

Si existiera tal inserción cabría preguntarse dónde se encuentra, cómo podría afectar la función génica y si dicha inserción está relacionada con la movilización de un ET. Alternativamente, si el cambio del tamaño de banda observada en los alelos mutantes no está relacionada con una inserción, cuál(es) serían las propuestas alternativas. A continuación se desarrollan y discuten estas propuestas.

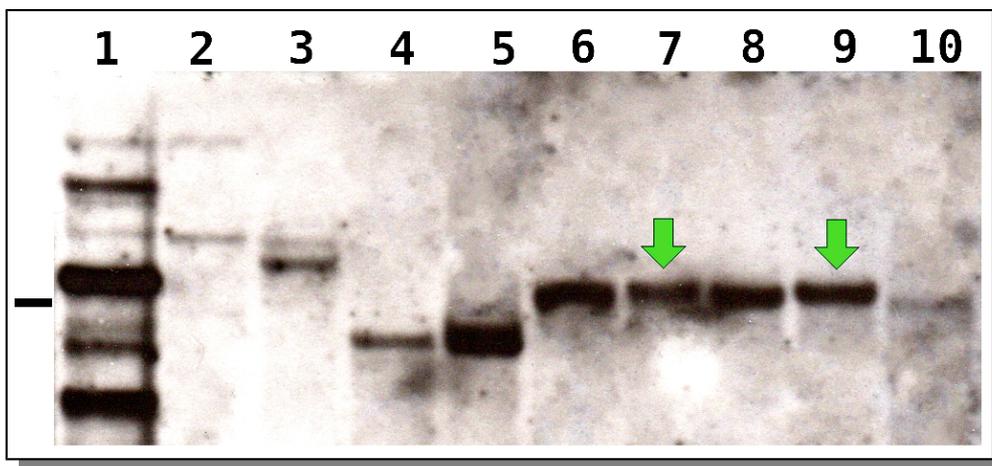


FIGURA 19- *Southern blot* de la región codificante y 3', utilizando la sonda **Región 3-6**. Carriles: **1-** Control positivo (plásmido con inserto *white*), **2-** Plásmido con Elemento *copia*, **3 al 5-** *D. immigrans*, *D. melanogaster*, *D. nebulosa*, **6-** *D. willistoni* salvaje WIP4, **7 al 9-** Alelos mutantes del gen *white* de *D. willistoni*, w^1 ; w^a ; y w^f , respectivamente **10-** *D. willistoni* mutante *yellow* (salvaje para el gen *white*). Las flechas verdes señalan pequeñas diferencias en cada banda. Barra a la izquierda de la imagen 11.000 pb.

Teniendo en cuenta la región analizada en este *Southern blot*, si se considera la existencia de una inserción, ésta podría encontrarse en la región 3' del gen (*downstream*

al exón 6) o en la región 5' (*upstream* al exón 2), ya que como vimos anteriormente, la región codificante analizada (desde el exón 2 al 6) en las líneas mutantes no presenta diferencia de longitud en relación con la salvaje (FIGURA 17).

Una de las posibles causas de la pequeña inserción hallada en los alelos mutantes de *D. willistoni* reportada aquí, puede ser la inserción de un ET pequeño. En *D. willistoni*, está bien documentada la presencia de elementos transponibles activos, muy pequeños, denominados *Vege* y *Mar* (Holyoake y Kidwell, 2003; Deprá y col. 2012). Estos son clasificados como MITEs (Miniature Inverted-repeat Transposable Elements). Los MITEs son ETs no-autónomos, con intermediario de ADN (Clase II) derivados de ETs autónomos, presentan una longitud entre 50 y 500 pb, y suelen presentarse en regiones eucromáticas ricas en genes, cerca o incluso dentro de un gen, afectando su expresión (Fattash y col. 2013).

Otra familia de elementos transponibles pequeños fue detectada a partir del análisis de la secuencia completa de los genomas de 12 especies de *Drosophila*. Se encontró que todas las especies presentan DINE1 (*Drosophila interspersed element 1*), elementos no autónomos pequeños de entre 50 y 500 pb. Aunque sólo en dos especies, *D. willistoni* y *D. ananassae*, mostraban indicio de actividad. Se postuló que dicha actividad se debe a eventos de transferencia horizontal reciente o a la reactivación de copias ancestrales, mostrando también que las inserciones DINE-1 se presentaban en intrones y en regiones adyacentes a genes codificantes de proteínas (Yang y Barbash, 2008).

Se han reportado otros ETs pequeños, no autónomos, que se insertan preferentemente en la región 3' UTR (Daskalova y col. 2006), y estas pequeñas inserciones pueden estar asociadas a modificaciones en la regulación de la transcripción (Li y col, 2014).

Alternativamente, la variación en longitud de las bandas detectadas para los alelos mutantes del gen *white* en *D. willistoni*, podría deberse a la pérdida del sitio de restricción ubicado en el extremo 3'. La enzima de restricción HindIII reconoce y corta

en la secuencia palindrómica A/AGCTT. Si existiera una variación en la secuencia de reconocimiento de HindIII que lleve a su pérdida, ya sea debido a una mutación puntual o una pequeña deleción, existe otro sitio de restricción a 350 pb *downstream* del anterior. Así la pérdida del sitio de restricción del extremo 3' produciría una banda un poco más grande que podría estar asociada a los cambios observados para una o ambas cepas mutantes. Este punto será retomado en el análisis de la Región 3' del gen (Sección 2.2.4).

2.2.2 Región reguladora 5' del gen *white*

Con el segundo *Southern* se analizaron las posibles variaciones en la región reguladora 5', primer exón y parte del primer intrón. No se esperaban cambios en la región 5' del gen para los alelos w^{ef} y w^a debido a que estos mutantes presentan variación en la cantidad de pigmento en los ojos y a su vez no existe diferencia de pigmentación entre macho y hembra. Este tipo de variaciones fenotípicas han sido asociadas a cambios en la región estructural (codificante) del gen *white* en *D. melanogaster* (Judd, 1976). En cuanto al alelo w^1 , si tenemos en cuenta que las mutaciones reportadas en *D. melanogaster* están asociadas a mutaciones en la región promotora (alelo w^1) y en la región del primer exón (alelo w^{1118}) (FlyBase) se podrían esperar variaciones en dicha región para el alelo w^1 de *D. willistoni*, sin descartar otros cambios posibles que comprometan la expresión del gen.

Para analizar la región reguladora 5' del gen *white*, utilizamos una sonda de 1085 pb que abarca el exón 1 del gen *white* de *D. willistoni* y regiones 5' y 3' (ver FIGURA 14). Ésta se obtuvo por amplificación por PCR con los cebadores **w.RegF** y **w.RegR** (TABLA 2) del fragmento clonado ***white* exón1**. Los diferentes ADN blanco fueron digeridos con la enzima de restricción ScaI, esperando un fragmento de 13.909 pb para el alelo salvaje (FIGURA 20).

El resultado obtenido no revela diferencias de tamaño de bandas entre los alelos mutantes y salvaje para el gen *white* de *D. willistoni* (FIGURA 22).

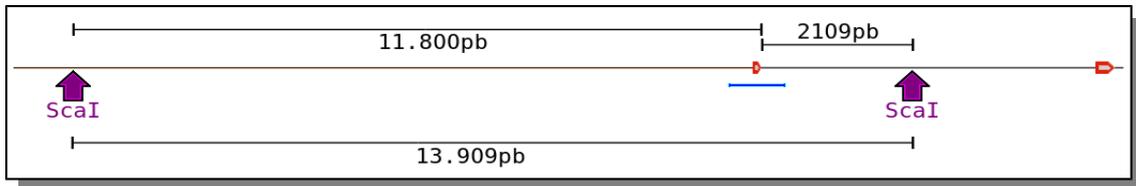


FIGURA 20- Esquema de la región del locus *white* con los cortes producidos por *ScaI* (flechas violetas) en relación a la sonda *white* (en azul). Según el análisis de restricción, se espera un fragmento de 13.909 pb. Se esquematiza en rojo el exón 1 (izquierda) y el exón 2 (derecha).

2.2.3 Región del exón 1 y primer intrón del gen *white*

En el tercer *Southern* se analizó una región del locus *white* que incluye al primer y segundo exón y al primer intrón. Se utilizó, al igual que en el anterior, la sonda ***white* exón1** correspondiente a la región del exón 1 del gen *white* de *D. willistoni*. Los diferentes ADN blanco fueron digeridos con la enzima de restricción *NcoI*, esperando un fragmento de 9498 pb (FIGURA 21).

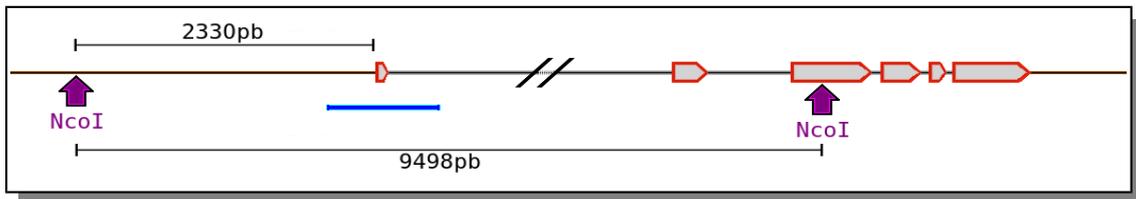


FIGURA 21- Esquema de la región del locus *white* con los cortes producidos por *NcoI* (flechas violetas) en relación a la sonda *white* (en azul). Según el análisis de restricción, se espera un fragmento de 9.498 pb.

Las bandas obtenidas en este *Southern* quedaron difusas, sin embargo, no se detectaron grandes diferencias de tamaño de bandas entre los alelos mutantes y salvaje para el gen *white*. aunque no se puede descartar la existencia de pequeñas variaciones en el tamaño de las bandas (FIGURA 22).

2.2.4 Región 3' del gen *white*

Con el último *Southern* se analizó la región 3' del gen *white* con el fin de analizar la posibilidad de una inserción en la región 3' UTR, posibilidad planteada tras los resultados del primer *Southern*. Se utilizó la sonda ***white* Región 3-6**, que cubre los exones 3 al 6 del gen *white* de *D. willistoni*. Los diferentes ADN blanco fueron

digeridos con las enzimas de restricción NcoI y HindIII, esperando un fragmento de aproximadamente 4.272 pb (FIGURA 23)

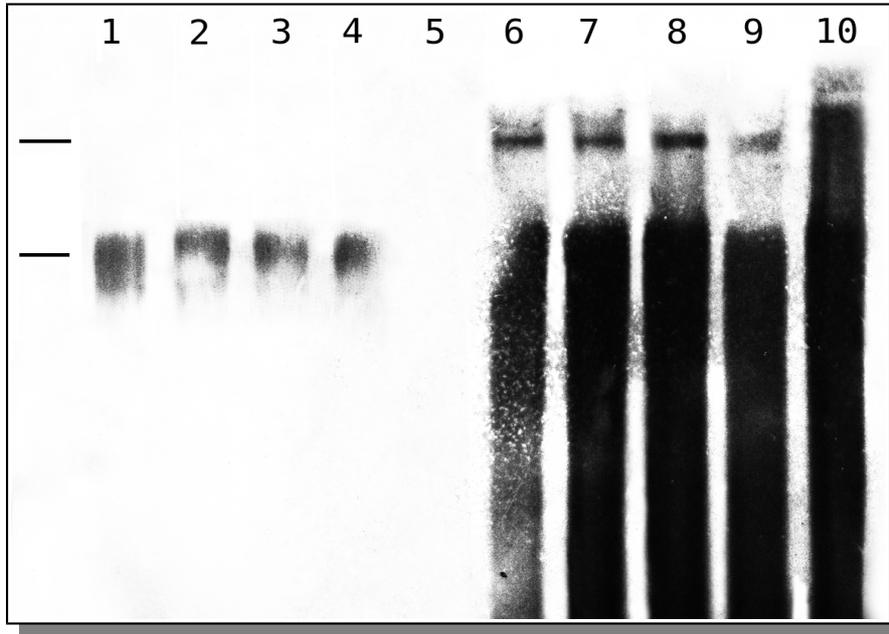


FIGURA 22- *Southern blot* utilizando la sonda *white* exón1. Carriles: **1 al 5 Análisis de la región del exón1 y primer intrón:** 1- *D. willistoni* w^{cf} , 2- *D. willistoni* w^a , 3- *D. willistoni* w^l , 4- *D. willistoni* salvaje, 5- *Zaprionus indianus*, Carriles: **6 al 10 Análisis de la región 5':** 6- *D. willistoni* w^{cf} , 7- *D. willistoni* w^a , 8- *D. willistoni* w^l , 9- *D. willistoni* salvaje, 10- *Zaprionus indianus*. A la izquierda de la imagen la barra superior corresponde a la banda de 13.909 pb, la inferior a la banda de 9498 pb. Control positivo (plásmido con inserto *white*) quedó fuera de la imagen.

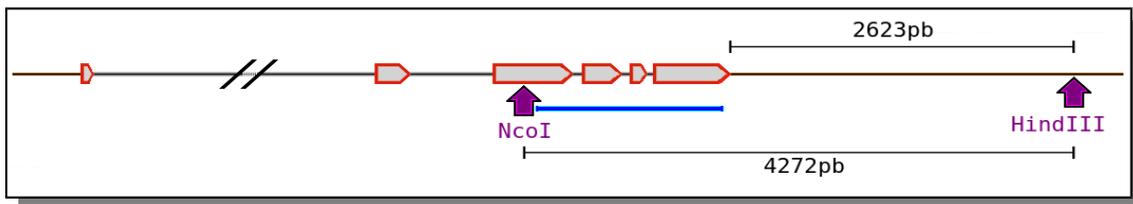


FIGURA 23- Esquema de la región del locus *white* con los cortes producidos por NcoI y HindIII (flechas violetas) en relación a la sonda *white* (en azul). Según el análisis de restricción, se espera un fragmento de 4.272 pb.

En este *Southern* se detectó una pequeña diferencia en la banda del alelo mutante w^{cf} con respecto al alelo salvaje, teniendo la primera un menor peso molecular. La

banda correspondiente al alelo w^l no presenta una diferencia significativa (FIGURA 24).

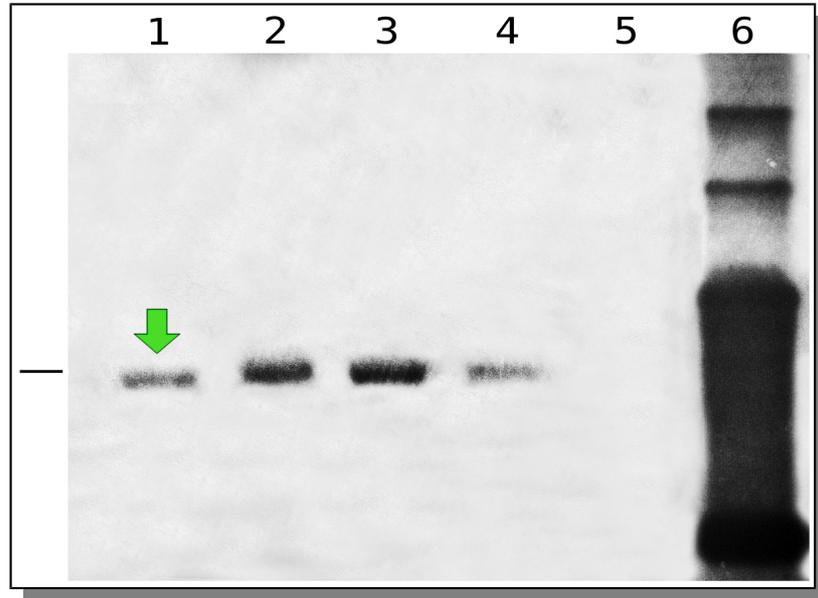


FIGURA 24- *Southern blot* para el análisis del extremo 3' utilizando la sonda **Región 3-6**. Carriles: **1 al 4** Alelos del gen *white* de *D. willistoni* w^{ef} , w^u , w^l , y salvaje respectivamente, **5-** *Zaprionus indianus*, **6-** Control positivo (plásmido con inserto *white*). La flecha verde señala una pequeña diferencia en banda para el alelo w^{ef} . Barra a la izquierda de la imagen 4.272 pb.

Considerando los resultados obtenidos para todos los análisis por *Southern blot* en conjunto, se discuten a continuación los resultados para cada alelo mutante del gen *white* en *D. willistoni*.

En la interpretación de los resultados se tuvo en cuenta que un cambio en la longitud de los fragmentos de restricción puede ser explicado por varias hipótesis. Una disminución en el tamaño de banda puede deberse a: **(1)** la aparición de un nuevo sitio de restricción por cambio en la secuencia nucleotídica, interno al fragmento esperado; **(2)** la ocurrencia de una deleción; o **(3)** una inversión que acerque el sitio de corte. En el caso de un aumento en el tamaño de banda las hipótesis podrían ser: **(1)** la eliminación de un sitio de corte por cambio de secuencia; **(2)** una inserción, o **(3)** una inversión que aleje el sitio de corte.

Alelo w^1 : En la FIGURA 25 se resumen los resultados para el alelo w^1 . Al evaluar en el primer *Southern*, la región comprendida desde 381 pb *upstream* del primer exón hasta 2623 pb *downstream* del último exón, se detectó una diferencia en el tamaño de bandas, entre este alelo y el salvaje, siendo la banda del alelo con pérdida de función, de mayor tamaño (FIGURAS 18 y 19). En el cuarto *Southern* (FIGURAS 21 y 22), se analizó una región menor, incluida dentro de la región analizada en el primer *Southern*, no encontrándose diferencias. Ésta comprendía desde el tercer exón hasta 2623 pb *downstream* del último exón.

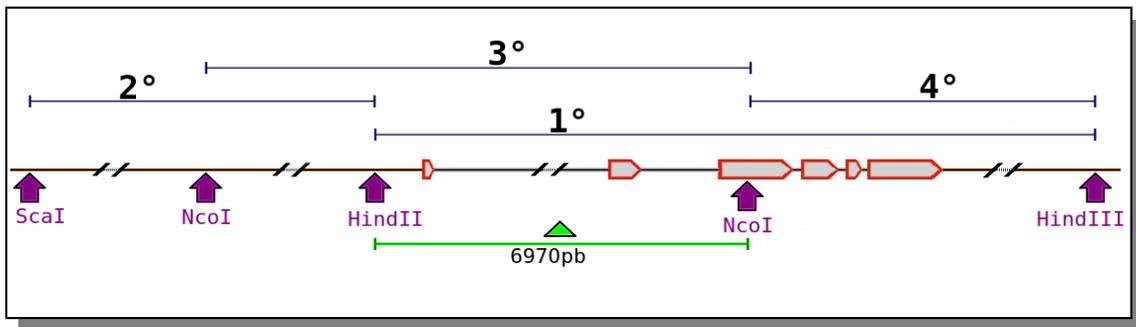


FIGURA 25- Alelo w^1 . Esquema del locus *white* con la región (6979 pb) en donde posiblemente se ubicaría la inserción en el alelo w^1 , deducido del análisis del primer y tercer *Southern*. Sitios de corte de HindIII y NcoI (flechas violetas). Las barras sobre el esquema del gen indican las regiones analizadas en los distintos *Southern*s. Cabeza de flecha verde (▲) posible inserción. // indican regiones en que el esquema no está a escala.

De dichos resultados: (1) Se descarta que se haya perdido el sitio de corte HindIII en el extremo 3', como se había propuesto previamente. Las dos regiones analizadas, incluyen el mismo sitio de corte HindIII en el extremo 3' y si se hubiera perdido el sitio de restricción se detectaría una diferencia de banda en los dos análisis. (2) Se descarta la ocurrencia de una inversión que involucre el sitio de corte para NcoI o el sitio de corte para HindIII en posición 3', porque en dichos casos debería detectarse un aumento en la longitud de banda en ambos *Southern*s mencionados, y sólo se detecta una diferencia en uno de ellos. (3) Se descarta también, la ocurrencia de una inversión que involucre el sitio de corte para HindIII en posición 5', porque en dicho caso debería detectarse un disminución en la longitud de banda para el alelo w^1 en el segundo

Southern (4) Se propone la presencia de una pequeña inserción en la región no solapante de las bandas obtenidas en el primer y cuarto *Southern* (marcada en verde en la FIGURA 25). Si bien esta región también fue analizada en el tercer *Southern*, la baja calidad de las bandas obtenidas no aportó información para evaluar dicha posibilidad. Es sabido que la ausencia del primer intrón no afecta la expresión del gen, esta característica se ha utilizado en la construcción y empleo del alelo *mini-white* como marcador en técnicas de transformación (Silicheva, 2010). A su vez, teniendo en cuenta que los alelos mutantes con pérdida de función para el gen *white* en *D. melanogaster* presentan cambios en la región promotora (inserción - w^1) y del primer exón (delección - w^{1118}), sería posible plantear la hipótesis de que pudiera existir una inserción en esta región en el alelo nulo para el gen *white* de *D. willistoni*.

Alelo w^a : El análisis por *Southern* no reveló variación en el tamaño de banda en el alelo w^a en relación al alelo salvaje. Se propone que el alelo w^a no sería equivalente al alelo w^a descrito en *D. melanogaster*, cuyo fenotipo mutante es producido por una inserción de un ET (*copia*) en el segundo intrón que lleva a la producción de una menor cantidad de ARNm. Se propone que la variante alélica asignada como w^a podría deberse a la presencia de mutaciones puntuales u otras variaciones en la secuencia que lleven a una disminución en la expresión del gen *white* en *D. willistoni*.

Alelo w^{af} : En la FIGURA 26 se resumen los resultados para el alelo w^{af} . Se encontraron dos tipos de variación para este alelo a través del análisis por *Southern*. Una banda de mayor tamaño en la región comprendida entre el primer exón y el extremo 3' del gen (FIGURAS 18 y 19) y una banda de menor tamaño en la región comprendida desde el segundo exón hasta 2623 pb *downstream* del último exón en la región 3' del gen (FIGURAS 21 y 22). Estas variaciones en el tamaño de las bandas pueden deberse a eventos de inserción y delección, cambios en la secuencia del sitio de restricción e incluso a la presencia de una pequeña inversión. Si existiera una inversión que acerque el sitio de corte, ésta debería ser pequeña porque el gen continúa siendo funcional para este alelo hipomórfico. Considerando estos datos en conjunto, no podemos discriminar

entre los eventos propuestos más arriba, en donde una combinación de estos eventos llevaría a varios cambios posibles, pero no podemos explicar el origen de este alelo mutante por un único cambio de secuencia.

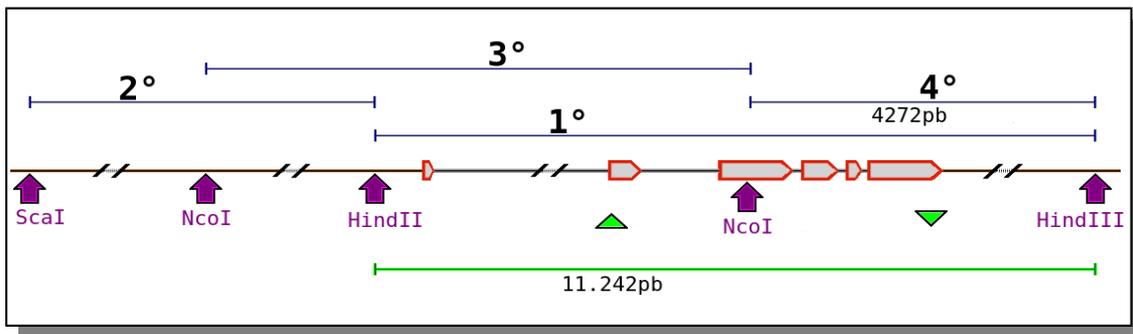


FIGURA 26- Alelo w^{cf} . Esquema del locus *white* con las variaciones detectadas para el alelo w^{cf} , datos obtenidos del primer y tercer *southern*. Con cabezas de flecha verdes se representan la inserción (izquierda ▲) y la delección (derecha ▼). Sitios de corte de HindIII y NcoI (flechas violetas).

El alelo w^{cf} descrito en *D. melanogaster* presenta dos mutaciones puntuales en los exones codificantes, segundo y sexto. Dichas mutaciones puntuales llevan al reemplazo de dos aminoácidos en la proteína White, uno de ellos en la región de interacción con la proteína Brown, para formar el transportador heterodimérico (Mackenzie y col. 1999). Por analogía con la mutación presente en *D. melanogaster*, se esperaría que los cambios observados en *D. willistoni* estuvieran en la región cercana al sitio de corte para NcoI, donde se encuentran los exones. Sin embargo, no se puede descartar que se encuentren hacia los extremos de la región detectada en el *Southern*. Esto último podría explicar los resultados observados, aunque dichos cambios no necesariamente fueran los responsables de la alteración en la función génica en el locus *white*.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Este trabajo empleó la gran cantidad de información genética y genómica en *D. melanogaster* para plantear la hipótesis de que la similitud entre las especies *D. willistoni* y *D. melanogaster* puede ser empleada como punto de partida para la caracterización molecular del gen *white* de *D. willistoni* y la caracterización de las líneas mutantes de este gen, aisladas en nuestro laboratorio.

En base a los objetivos planeados se puede concluir que:

Anotación del gen *white* de *D. willistoni*

1. La metodología empleada fue la idónea para la anotación del gen *white*, pudiéndose caracterizar el promotor mínimo, la región 5' UTR y la región codificante.
2. La secuencia del CDS anotada en este trabajo de tesis es igual a la publicada posteriormente en FlyBase.
3. La secuencia aminoacídica de la proteína White putativa de *D. willistoni* es idéntica a la publicada posteriormente en FlyBase.
4. Se ha evidenciado la hipótesis planteada.

Caracterización de los alelos mutantes w^1 , w^a y w^{cf} para el gen *white* de *D. willistoni*

5. En cuanto a la caracterización de los alelos mutantes para el gen *white* de *D. willistoni*, w^1 , w^a y w^{cf} , la secuencia nucleotídica analizada no presentó diferencias. Se hace necesario continuar la secuenciación, completando en primer lugar, la secuencia de la región codificante.
6. Se descartó la presencia de grandes inserciones o deleciones en la región del locus *white*.

7. El alelo mutante w^l presenta una posible inserción en la región reguladora o al inicio de la región estructural
8. El alelo mutante w^{cf} presenta pequeñas variaciones en la longitud de los fragmentos de restricción en la región codificante del gen *white*. Los datos obtenidos son insuficientes para plantear una hipótesis relacionada a la causa de la mutación.
9. El alelo w^e no presenta variaciones de secuencia, con respecto al salvaje, detectables por *southern blot*
10. Se hacen necesarios nuevos análisis para caracterizar las variaciones observadas.

En resumen, se descartó la presencia de grandes cambios de secuencia en los alelos mutantes del gen *white* en *D. willistoni* examinados, encontrándose pequeñas variaciones de secuencia en dos de ellos. A su vez, se avanzó en la secuenciación de parte de la región codificante de los alelos mutantes. Considerando estos resultados, se propone continuar el análisis mediante secuenciación, empezando por completar la secuencia del CDS.

A futuro, estudios dirigidos a la caracterización de alelos mutantes de *D. willistoni*, incluyendo mutantes del gen *white*, contribuirán a revelar información importante del (o de los) factores que inciden en los cambios genéticos en las poblaciones naturales en esta especie. La experiencia recabada en esta tesis, así como la información de ligamiento genético y mapeo genético de mutaciones espontáneas en *D. willistoni* (en curso en el Laboratorio de *Drosophila*), junto con la información actualmente disponible de secuencias de muchos genes ortólogos, será fundamental para emprender futuros estudios que contribuyan al conocimiento de la genética evolutiva de *Drosophila*.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, M. D., Celniker, S. E. et al. 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. Science 287, 2185-2195.
- Ames, G. F. L. 1986. The basis of multidrug resistance in mammalian cells: homology with bacterial transport. Cell 47: 323-324.
- Anaka, M, MacDonald C. D., Barkova E, Simon K, Rostom R, Godoy R. A, Haigh A. J, Meinertzhagen I. A and Lloyd V. 2008. The *white* gene of *Drosophila melanogaster* encodes a protein with a role in courtship behavior. J. Neurogenet. 22(4): 243-76.
- Anxolabéhère D, Kidwell M.G. and Periquet G. 1988. Molecular characteristics of diverse populations are consistent with the hypothesis of a recent invasion of *Drosophila melanogaster* by mobile P elements. Mol. Biol. Evol. 5(3): 252-69.
- Ashburner, M., Golic, K. G. and Hawley, R. S. 2005. *Drosophila: A Laboratory Handbook*. pp. ColdSpring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Bächli G. 2014. TaxoDros: the database on taxonomy of *Drosophilidae*, v.1.04, Database 2014/09. Disponible en <http://www.taxodros.uzh.ch/>
- Borycz, J., Borycz, J. A., Kubów A., Lloyd. V. and Meinertzhagen, I. A. 2008. *Drosophila* ABC transporter mutants *white*, *brown* and *scarlet* have altered contents and distribution of biogenic amines in the brain. J. Exp. Biol. 211: 3454-66.
- Campbell, J. L. and Nash, H. A. 2001. Volatile general anesthetics reveal a neurobiological role for the *white* and *brown* genes of *Drosophila melanogaster*. J. Neurobiol. 49: 339-349.
- Casals F; M. Caceres and A. Ruiz . 2003. The Foldback-like Transposon Galileo Is Involved in the Generation of Two Different Natural Chromosomal Inversions of *Drosophila buzzatii* . Mol. Biol. Evol. 20(5):674-685.

Bibliografía

- Cáceres M; J. M. Ranz; A. Barbadilla; M. Long and A. Ruiz. 1999. Generation of a Widespread *Drosophila* Inversion by a Transposable Element. *Science*, 285 (5426): 415-418. DOI: 10.1126/science.285.5426.415
- Chomczynski P. and Sacchi N. 1987. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry*, 162:156-159.
- Clark A., G. Gibson, T. Kaufman, B. McAllister, E. Myers and P. O'Grady. 2003. Proposal for *Drosophila* as a Model System for Comparative Genomics. Disponible en <http://www.genome.gov/Pages/Research/Sequencing/SeqProposals/Drosophila.pdf>.
- Collier L. S and D. A Largaespada. 2007. Transposable elements and the dynamic somatic genome. *Genome Biology*, 8(Suppl 1): S5. Disponible en <http://genomebiology.com/2007/8/S1/S5>
- Cordeiro, A. R. and Winge, H. 1995. Levels of evolutionary divergence of *Drosophila willistoni* sibling species. In: Levine, L. (ed) *Genetics of natural populations. The continuing importance of Theodosius Dobzhansky*. Columbia University Press, New York, pp. 262-280.
- Da Cunha, A.B; Burla, H. and Dobzhansky, T. 1950. Adaptative chromosomal polymorphism in *Drosophila willistoni*. *Evolution*, 4: 212-235.
- Daniels, S. B., K. R. Peterson, L. D. Strausbaugh, M. G. Kidwell and A. Chovnick. 1990. Evidence for horizontal transmission of the Transposable Element *P* between *Drosophila* Species. *Genetics*, 124(2): 339-355.
- Daskalova E., V. Baev, V. Rusinov, and I. Minkov. 2006. 3'UTR-located ALU Elements: Donors of Potetial miRNA Target Sites and Mediators of Network miRNA-based Regulatory Interactions. *Evolutionary Bioinformatics Online* 2006:2 103-120.
- Delprat A; B. Negre; M. Puig and A. Ruiz. 2009. The Transposon *Galileo* Generates Natural Chromosomal Inversions in *Drosophila* by Ectopic Recombination. *PLoS ONE* 4(11) e7883. DOI: 10.1371/journal.pone.0007883. Disponible en www.plosone.org

Bibliografia

- De Oliveira L. F. V. , G. Da Luz and E. L. S. Loreto. 2009. Isolation of high quality DNA: a protocol combining “rennet” and glass milk. *Electronic Journal of Biotechnology*, Vol.12 No.2 Disponible en <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol12/issue2/full/4/> DOI: 10.2225/vol12-issue2-fulltext-4
- Deprá M., A. Ludwig, V. L. S Valente and E. L. S Loreto. 2012. *Mar*, a MITE family of hAT transposons in *Drosophila*. *Mobile DNA*, 3:13. Disponible en <http://www.mobilednajournal.com/content/3/1/13>
- Dermauw W. and T. Van Leeuwen. 2014. The ABC gene family in arthropods: Comparative genomics and role in insecticide transport and resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 45: 89-110.
- Diegelmann, S., Zars, M. and Zars, T. 2006. Genetic dissociation of acquisition and memory strength in the heat-box spatial learning paradigm in *Drosophila*. *Learn. Mem.* 13: 72-83.
- Dobzhansky, Th. and Powell, J.R. 1975. The *willistoni* group of sibling species of *Drosophila*. *Handbook of Genetics*. (R.C. King, ed.) n° 3: 589-622.
- Dreesen, T., Johnson, D. and Henikoff, S. 1988. The brown protein of *Drosophila melanogaster* is similar to the White protein and to components of active transport complexes. *Mol. Cell. Biol.* 8: 5206-5215.
- Drosophila 12 Genomes Consortium. 2007. Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny . *Nature*, Vol 450 : 203-218.
- Ehrman, L. and Powell, J. R. 1982. *Drosophila willistoni* species group. In: Ashburner, M., Carson H. L. and Thompson, J.N. Jr (eds) *The Genetics and Biology of Drosophila*. Vol.3b, Academic Press, London, pp: 193-225.
- Evans, J. M., Day, J. P., Cabrero, P., Dow, J. A. and Davies, S. A. 2008. A new role for a classical gene: *white* transports cyclic GMP. *J. Exp. Biol.* 211(Pt 6): 890-9.

Bibliografía

- Ewart, G. D. and Howells, A. J. 1998. ABC transporters involved in transport of eye pigment precursors in *Drosophila melanogaster*. *Meth. Enzymol.* 292: 213-224.
- Fattash I., R. Rooke, A. Wong, C. Hui, T. Luu, P. Bhardwaj, and G. Yang. 2013. Miniature inverted-repeat transposable elements: discovery, distribution, and activity. *Genome* 56: 475–486.
- Ferry, R. M.; Lancefield, R. C. and Metz, C. W. 1923. Additional mutant characters in *Drosophila willistoni*. *J. Heredity*, 14: 372-384.
- Fjose A, L.C.Polito¹, U. Weber and W. J. Gehring. 1984. Developmental expression of the *white* locus of *Drosophila melanogaster*. *The EMBO Journal* 3 (9): 2087-2094.
- Finnegan D. J. 1992. Transposable elements. *Current Opinion in Genetics and Development*, 2:861-867 .
- FlyBase Consortium. 2014. The Flybase database of the *Drosophila* genome projects and community literature, <http://flybase.bio.indiana.edu>
- Garcia A. C. L., C. Rohde, G. F. Audino, V. L. S. Valente and V. H. Valiati. 2006. Identification of the sibling species of the *Drosophila willistoni* subgroup through the electrophoretical mobility of acid phosphatase-1. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 44(3): 212-216.
- Garcia Guerreiro, MP. 2012. What makes transposable elements move in the *Drosophila* genome? *Heredity*, 108: 461-468.
- Griffiths, A. J. F, J. H. Miller, D. T. Suzuki, R. C. Lewontin y W. M. Gelbart. 2002. *Genética*. McGraw-Hill-Interamericana, 7a edición, cap 15, 17 y 18.
- Goñi, B.; Parada C; Rohde C. and V.L.S. Valente. 2002. Genetic characterization of spontaneous mutation in *Drosophila willistoni*. I. Exchange and non-disjunction of the X chromosome. *Drosophila Information Service Norman, Oklahoma (USA)* 85: 80-84.

Bibliografia

- Green, M. 2010. 2010: A Century of *Drosophila* Genetics Through the Prism of the *white* Gene. *Genetics* 184: 3–7.
- Hardison R. C. 2003. Comparative Genomics. *PLoS Biology*, 1 (2): 156-160.
- Holyoake A. J. and M. G. Kidwell. 2003. *Vege* and *Mar*: Two Novel hAT MITE Families from *Drosophila willistoni*. *Mol. Biol. Evol.* 20(2):163–167.
- Jordan B. R., R. Jourdan and B. Jacq. 1976. Late Steps in the Maturation of *Drosophila* 26 S Ribosomal RNA: Generation of 543 S and 2 S RNAs by Cleavages Occurring in the Cytoplasm. *J. Mol. Biol.* 101, 85-105.
- Johnston, M. O. 2001. Mutations and New Variation: Overview . *Encyclopedia of Life Sciences*, Nature Publishing Group. Disponible en www.els.net
- Judd, B. H. 1976. Genetics units of *Drosophila* - complex loci. In: M. Ashburner and E. Novitski (Eds.) *The genetics and Biology of Drosophila*. 1b. Academic Press, New York, 1976: 767-799.
- Kidwell M. G., J. F. Kidwell, and J. A. Sved. 1977. Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*: a syndrome of aberrant traits including mutation, sterility and male recombination. *Genetics*; 86(4): 813-833.
- Krstic, D., Boll, W. and Noll, M. 2013. Influence of the *white* locus on the courtship behavior of *Drosophila* males. *PLoS ONE* 8(10): e77904.
- Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004. MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150-163.
- Kutach A. K. and J. T. Kadonaga. 2000. The Downstream Promoter Element DPE appears to be as widely used as the TATA Box in *Drosophila* Core Promoters. *Molecular and Cellular Biology* 20 (13): 4754–4764.

Bibliografia

- Lancefield, R.C. and Metz, C.W. 1922. The sex-linked group of mutant characters in *Drosophila willistoni*. Am. Nat. 56: 211-241. Disponible en <http://www.jstor.org/stable/2456377?seq=2>
- Levis, P. M. Bingham, and G. M. Rubin. 1982. Physical Map of the *white* Locus of *Drosophila melanogaster*. PNAS, 79:564-568.
- Lindahl, T. 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. Nature, 362: 709-715.
- Linton, K. 2007. Structure and Function of ABC Transporters. Physiology, 22:122-130.
- Mackenzie S. M., M. R. Brooker, T. R. Gill, G. B. Cox, A. J. Howells, G. D. Ewart. 1999. Mutations in the *white* gene of *Drosophila melanogaster* affecting ABC transporters that determine eye colouration. Biochimica et Biophysica Acta, 1419: 173-185.
- Mackenzie, S. M., Howells, A. J., Cox, G. B. and Ewart, G. D. 2000. Sub-cellular localization of the White/Scarlet ABC transporter to pigment granule membranes within the compound eye of *Drosophila melanogaster*. Genetica, 108: 239-252.
- Markow T. A. and P. M. O'Grady. 2006. *Drosophila*. A guide to species identification and use. Chapter 1: Phylogenetic relationships of *Drosophilidae*. Elsevier pp 3-64.
- Matthews, K. A; Kaufman T. C. and Gelbart W. M. 2005. Research Resources for *Drosophila*: The expanding Universe. Nature, 6:179-193.
- McClintock, B. A. 1929. Cytological and Genetical Study of Triploid Maize. Genetics, 14: 180-222.
- McClintock, B. 1931. The order of the genes *c*, *sh* and *wx* in *zea mays* with reference to a cytologically known point in the chromosome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 17: 485-491.
- McClintock, B. 1950. The origin and behavior of mutable loci in maize. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 36: 344-355.
- McClintock, B. 1953. Induction of Instability at Selected Loci in Maize. Genetics, 38: 579-599.

Bibliografía

- Morgan, T. H. 1910. Sex limited inheritance in *Drosophila*. Science, 32: 120-122.
- Mount, S. M. 1987. Sequence similarity. Nature, 325: 487.
- Papaceit M. and E. Juan. 1998. Fate of dot chromosome genes in *Drosophila willistoni* and *Scaptodrosophila lebanonensis* determined by in situ hybridization. Chromosome Res 6:49–54.
- Parada C. and Goñi B. 2003. Hypermutable strains isolated from Uruguayan populations of *Drosophila willistoni* (Diptera, Drosophilidae). Drosophila Information Service Norman, Oklahoma (USA), 143-146.
- Pimpinelli S, Berloco M, Fanti L, Dimitri P, Bonaccorsi S, Marchetti E, Caizzi R, Caggese C and Gatti M. 1995. Transposable elements are stable structural components of *Drosophila melanogaster* heterochromatin. Proc Natl Acad Sci U S A. 25; 92(9): 3804-8.
- Pirrotta V. and Ch. Brocki. 1984. Transcription of the *Drosophila white* locus and some of its mutants. The EMBO Journal vol.3 no.3 pp.563-568.
- Piskurek O. and D. J. Jackson. 2012. Transposable Elements: From DNA Parasites to Architects of Metazoan Evolution. Genes, 3: 409-422.
- Pita S., Y. Panzera, V. L. da Silva Valente, Z. G. Silva M., C. Garcia, A. C. Lauer G., M. A. Montes and C. Rohde. 2014. Cytogenetic mapping of the Muller F element genes in *Drosophila willistoni* group. Genetica, 142(5):397-403.
- Puig M; M. Caceres and A. Ruiz. 2004. Silencing of a gene adjacent to the breakpoint of a widespread *Drosophila* inversion by a transposon-induced antisense RNA. PNAS, 101(24): 9013-9018 . doi: 10.1073 /pnas.0403090101
- Robe L. J., J. Cordeiro, E. L. S. Loreto and V. L. S. Valente. 2009. Taxonomic boundaries, phylogenetic relationships and biogeography of the *Drosophila willistoni* subgroup (Diptera: Drosophilidae). Genetica, 138 (6) 601-617.

Bibliografia

- Rutherford K, Parkhill J, Crook J, Horsnell T, Rice P, Rajandream MA and Barrell B. 2000. Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* (Oxford, England); 16(10): 944-5.
- Schaeffer, S.W., Bhutkar, A.U., McAllister, B.F., Matsuda, M., Matzkin, L.M., O'Grady, P.M., Rohde, C., Valente, V.L.S., Aguadé, M., Anderson, W.W., Edwards, K., Garcia, A.C.L., Goodman, J., Hartigan, J., Kataoka, E., Lapoint, R.T., Lozovsky, E.R., Machado, C.A., Noor, M.A.F., Papaceit, M., Reed, L.K., Richards, S., Rieger, T.T., Russo, S.M., Sato, H., Segarra, C., Smith, D.R., Smith, T.F., Strelets, V., Tobari, Y.N., Tomimura, Y., Wasserman, M., Watts, T., Wilson, R., Yoshida, K., Markow, T.A., Gelbart, W.M., Kaufman, T.C. 2008. Polytene chromosomal maps of 11 *Drosophila* species: the order of genomic scaffolds inferred from genetic and physical maps. *Genetics* 179(3): 1601-1655.
- Silicheva M., Anton Golovnin, E. Pomerantseva, A. Parshikov, P. Georgiev and O. Maksimenko. 2010. *Drosophila mini-white* model system: new insights into positive position effects and the role of transcriptional terminators and gypsy insulator in transgene shielding. *Nucleic Acids Research*, 2010, Vol. 38, No. 1: 39-47.
- Sitaraman D., M. Zars, H. LaFerriere, Y. Chen, A. Sable-Smith and T. Kitamoto. 2008. Serotonin is necessary for place memory in *Drosophila*. *PNAS*, 105 (14), 5579-5584.
- Soler, A. M. and B. Goñi. 2012. Linkage relationships of spontaneous mutations in *Drosophila willistoni*. *Drosophila Information Service* Norman, Oklahoma (USA), 129-139.
- Spassky, B. and Dobzhansky, T. 1950. Comparative genetics of *Drosophila willistoni*. *Heredity*, 4: 201-215.
- Spassky, B. 1957. Morphological differences between sibling species of *Drosophila*. *University of Texas Publ.*, 5721: 48-61.
- Sturtevant, A.H. and Novitski, E. 1941. The homologies of the chromosome elements in the genus *Drosophila*. *Genetics*, 26:517-541.

Bibliografía

- Sullivan, D. and Sullivan, M. 1975. Transport defects as the physiological basis for eye color mutants of *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Genet.* 13: 603-613.
- Sullivan, D., Bell, L., Paton, D. and Sullivan, M. C. 1979. Purine transport by malpighian tubules of pteridine-deficient eye color mutants of *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Genet.* 17: 565-573.
- Touchman, J. 2010. Comparative Genomics. *Nature Education Knowledge*, 3(10):13.
- Valente, V. L. S.; Ruszczyk, A. and dos Santos, R. A. 1993. Chromosomal polymorphism in urban *Drosophila willistoni*. *Revta. Bras. Genet.* 16(2): 307-319.
- Valente, V.L.S.; Rohde, C.; Valiati, V.H.; Morales, N.B. and Goñi, B. 2001. Chromosome inversions occurring in Uruguayan populations of *Drosophila willistoni*. *Drosophila Information Service Norman, Oklahoma (USA)*, 84: 55-59.
- Valente, V.L.S; Goñi, B; Valiati, V.H; Rohde, C and Morales, N.B. 2003. Chromosomal polymorphism in *Drosophila willistoni* populations from Uruguay. *Genetics and Molecular Biology*, 26 (2) 163-173.
- Walkup L. 2000. Junk DNA: evolutionary discards or God's tools? *CEN Technical Journal*, 14 (2): 18-30.
- Wicker, T.; F. Sabot; A. Hua-Van; J. L. Bennetzen; P. Capy; B. Chalhoub; A. Flavell; P. Leroy; M. Morgante; O. Panaud; E. Paux; P. SanMiguel and A. H. Schulman. 2007. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nature Reviews Genetics* 8: 973-982.
- Yang H. P. and D. A. Barbash. 2008. Abundant and species-specific *DINE-1* transposable elements in 12 *Drosophila* genomes. *Genome Biol.*; 9(2): R39. Disponible en <http://genomebiology.com/2008/9/2/R39>

ANEXOS

A- Difusión de los resultados obtenidos

- IV Simposio de Ecología, Genética y Evolución de Drosophila, Campinas, Brasil, 2005.
- V Simposio de Ecología, Genética y Evolución de Drosophila, San Pablo, Brasil, 2007.
- XII Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias, Lavalleja, Uruguay, 2007.
- Primeras Jornadas de Genética del Uruguay. Montevideo, Uruguay, 2008.
- Publicación en el GenBank de una secuencia de 537 pb perteneciente al alelo salvaje del gen *white*, con el número de acceso EF015882 accesible en octubre de 2007.

B- Secuencias en *D. willistoni*

B.1- Gen *white*

XXX	5' UTR
XXX	exones
XXX	intrones
XXX	sitio reconocido por cebadores
XXX	regiones altamente conservadas

GTCG **GTGGGTGCTTATTTGCT** CATCTTGTCTATAATCAGTATACAAATAAGTAGCTAAAGCTTCTCC
 ATATTCCTCTTCCTCTCACGCTTTGTCTCTCTCTCTGCCTCTTTTTTCGTTCCAGCACCAACAATTTTTAT
 CTCTATCAAATTTCCACTCATTGTGCGAGACTTTGTTATTGTCCATTGCATCCGGACGTTAACCGTTGAG
 GTTGTGCGAGAGACCGCTCAGCTACCTCAGTTGCATTTTGTGTCAGCGCGTTCGTCACGAAGTTCATACGAGA
 GAATCGTGTGCGTACATTTTTTTTTTTTTACTTTTGTTTTTTTAATTATTAAATTTATTTTCGCATATTTTC
 TGAGTGTGTGCGTGTGCGTGTGTGTCTGTGCAAAGTGAATGCAAATAAAATATAAAATTTATATACGCA
 CATTTGAAAATATATTTGGAAGGATGGGT**CAGGAGGATCAAGAGCTATTAATACGCGGCAATAGTAAAAAT**
ACCTCAGCCGAGCATTTGCATAAT GTAAGTGCATTTATTATATCTTTAGCATACTTTCAGGCGCTGGGGT
 GGTGCATGCATGTGGCAACCGACAAATAAACGTTTACAGCGTGAGAACTAGCCCCAAAAAAGCCACAT
 GGAGACCACACATGACCACAACATAACCGCATTTGCAAAAAGGCAACCAAAAAGAACAACCACACAGCACAC
 AAAAACCACGACTTTGTCAATTGTAATAAATAACAACAAGCATTTTAACATCCATAGATCAGACACACT
 GACTAACCGCTGACAGACAGACAGATAGATAGACACAAATGGATCAGACAACAACAGCATGCATTATG
 CAATCCATGAATTGAAATTCGAGTCCAATTGATGCCAAAGTGGTAGCAAATACAGGAAAGTCTTCTTATT
 GCATATTTGACCTGAATGCTGAACTCAATTCAATTGCAAATGGTTCAAGGTTTAAGTTAACACAATTACT

ATGTTCACTCTATGATTGCTTTTGTGGTGCAAAGTAAAAGAATCTATACATAAGATAATGGGCTAAAGTT
 GAAATAAAAAGAGAAATCTAC **GAGTAGAGCCAAAGCCAAAC** TTGCCTACACGTGTTTTTTCATAAAGACTA
 TACTACCTCTTTTTTATCATTTATAACCATAGATAATAGTATCAAAATTTAAATAAAATGCGTGAGTGGG
 ACTTAGTCCCATAGACTTTGGAGAACTGGAGGTTTAAGATGTATCTCACTTAAAAAGGTTTCTGTAGCAA
 TAGGAAAGGATTTCTTATCATAATTGTTGGTTGAACCTTGATAAAAATATTTAAACTATGTAGAATATGCAT
 AACTAACAAAGAGAGCATCATTTAATCGGAGTTAGAACCTAACCTTCAAGCACCATTTCGCACGCCATTG
 GAGATTGACTATGAGATTGCATATCTGGGACTGTTGCTATCTAGTTTTTTGTATCTAGTTTTACAATTTCCA
 TCCTCCATCTTCATCTGTATCTTCATCTTCATCTGTATCTGTATCTGTACATTGCTTAATATGAAGAAT
 TTTTGTGTATAGTTGTTGTTCTTTCTTGTATTGATTGTTGCTGATACTGTCATAATCCAGTCTTATCT
 GGGTCATTATTTGACTGGCCAACGTATCAGTTACAGTCTATCTTACCTACCGGCTGTATCTGTACCTGTT
 AACTAGATACAAAAGACGGCAGACAAAACAGACAGATATACATATCTGTTTACTTCTCAAAAATACACACGC
 ACACACACACATTA AAAACAAAAACA ACTTGGAACTTAAAACAAAAAAAATCTCAATTGCTGTTATCGCG
 TATTTCTTCTCCTCGTCATCTTCTCCTTCTTCTTACTTGATTGCTCTTCTTGTGATGTTGTTGCACG
 TTTAGAAATGGGCTAAACAAAAATGTTAGAAAAAGTTTTGCACCTTTTTTTTTGTATTTTTGTATTTTGG
 TCTTCCAAGTATGATAATGAGAGAGAGTGTGAAGAAGTTTTGTTGGCCAAAAGTTTCTTTAAAATAAA
 CAAAAAGAAAATTCAAAACAAATGTTACAAAATAATAACAAAATTCGGGAACAAGTAAAAGCAACGCC
 TTGAAATATACCTTATTGAAAAATTACCAAGTTTCTTTCTTACTTTTCATAGTAATCTCTTGAAGTCGATT
 AATAAAATTCCTAAAATTCCTCAAAAATGTGTAATTTACAATTTCCCAATGAATCAAAAAGTGAATAAATAT
 TACTAAAAAACTTACAAAATTAATGAACGAAAATAAATGATTCATTGCAATCATATTGCATTCACAACCTT
 ATTTGTATGCGAAAAATGAATCAAAAAGAAAACCTTTTAGTTTAGTTAATCACATAACTCAAACCTTAGCCA
 ACTCTTTCTTACGTTTCATTCAAAACAAATGAATAAATCAAGAAAGGATATTCATATGTTATTCAAAGA
 AATTA AAAAATTTGATAAGTATTAATGACAGTTACTTGAGTCAAAAATTTCCAACCTGAATCATTCACTTT
 TTATTCATAGGCAAGTAATATTGTTTTTTTTATTTGATATGTGGGTCAAGAAATGAATACTTCTTCTTTA
 CTTATTCGTTTGCCATTTAAGCCATAATCTATGAGTACTCATTTTTGTATCCAAAAGTGAACAAATGAGT
 TGCTGCTTTATTGAGTCATTGAGTGAGTGCCATCTGTTCTCGTTTTCTTTTTATTTTTCTGT
 TTCTGCTTCTTTTTTTTTTTTGTCAAGTTCATTAATAAACTTAGTTCTGCCATATGGCAGATCAACAAG
 AACATTTTCTGGGTGTTGTTTTTTTCTTCTTCTTCTTCTTTTTTCGGGTGCCATATGGCGGCAGTGG
 CAGAGGCAGCGCAATGTAGCAGCCGCATTTTCTTTATAAGTAATTCAAAATAGCACGCAAGTAAAA
 GTACGAAAAATTAATAAATATGAAATGTAATAACAGCTGTGAGTGCCGACCAAGAAATGGCATGGCA
 AGGGAAGAAAAAGGGAAGGGACATGAAGACAGTCGAAAGGAGCAGAGAGTGAAGGCAGACAACCAT
 CGAGACAGCCAGAAAGTGGTAGTATCTTCTACTTTTCAGGACCAGGACCAGGACCAGGACCAAGACCAAGA
 TAATACACAGAGAAACAGTTACACAGAGAAAGAGAGACAGAGGGACAGAGAGCGCGAGAGAGAAACGTGA
 AGAACGCAACATAAGCAAATAAATACAGGA **AAAACTTTTTAATAACATTTTTTCGGCCTCATTGTGTGA**
AAACAATTTTGCCA GGATCTTCTTGGAGCGTCAACCGAGCCCAACCTCTCGACCAAGAAAGAAAAAA
 AAACCCAAAACCACCACCCAAATCCTCCCAACCCAGATGCTTGTAACGGATATTAATTTTTTCCGCGTT
 TACCTCGAGACGTCAACCAATTTCTTGAAGCCATCTCAAAAGTCAGTCCGAACAAACCGGGAGAGAATGC
 GACAGAGAGAGAGAGAGAAAAGAGAGCTAGAGAGATGAGTCTGAGGCTGAGATTGAAACTGGACTGGATAG
 CTGGTGCGCCCTTCTGTTGGTCCCTTAGGTCCCTCAAGGTGGGATTTAATAAACCTGTGCGACATTTTT
 TTTTCGTTTTTGTGCTCTCTCTTTCCTTTTCTGTTGTTGTTGCGCTTTGCATTGAATGTCAGCTTTTAT
 TTTGCTCTCTCTTCTCATATTTCTTGCTTAATTTTTATGATTATTTATACAAATTTATATGAGAGCAG
 CCAAGGACCAGCCAACAGCAGCAGCACCGCCACCACCCTCCAGTAGCTGAAGCAACGAAAGGGAAA
 GGGAGAAAGAAAGTGGGACTAAAAATGTTTTCCATATTTGTGGCCATCATTTTTTGTCTGCTTCGCCAA
 TTAGTGGAGAGCTGTTATTTATGTTTTTCTTGGTCTTACTTAAATACCCGTACGAAAACAGAAGGCTAG
 AAAAGGCCATACATAAAAAGCCCCAAAAGAAAGGTTCAAAAATTTCCCTTAAATCACACCAAATGCTTGA
 CTCTTGAGAAAAGTTTGAAACGCGTTCATCCAAAACCTCGCCGAAAATGGACATATAGGGTATCTATATG
 TCGATTTATATATGATTTTTCGGTAGAAACCTAACAGCTAAGGGAAAATGCTGAAAAAAAATTAGAGAGGG
 GAGAGAGATGGCGGTGGCGCAGATAGCCATACCGCAAGCCTCATTACTGTCAGTGTGGGCGGCGAAGTCA
 TCTCTGGTTACCATTTACCATTTGGTTCAAGAAGCCCTATGAGGCATACACACACACACACGCACA
 CACACAACATACGCACACAAAAATAAATAAAAAATTTACCTTTATGTCTTTAATTTATTGATGAATTTTAC
 TTTAACTTCAAATTTTTTTTTGGTTTTAAAAATTTATTTTCTACTCAGATCTTTTCAACTAAAATATAGAG
 TAGATTGTGGGTATTAAGAGTTAGTTAGTATGCTATTTTAAGCAAATTTTTCTACTTCGACAAAATAAAA
 AGAAAAACACTTTAGTTTTTTTTTATCATTTTCCAAATAGTTTTATTAATGTACTCTCTAAATTTTTTGAGA

ATTTTCAAAAATTGCCTAAATATATGTGAAAGCGTTCCACAGCGGAAACGATCAGCCAAAGTTTAACCATG
 AGCACTTTTCACCCCTTTCTCCCTCAATACCTCCCTCAATTGTTAACAATTTCTCTTAGTCAACCAAATT
 GAATCAAAAATTTGTATAAAAATATGGCAAACCTAATGCTATTTAGACTTAAATATTTGGGAATTAAGTGCTGA
 GTAAGCGAAAATGACGAGTAACGAGAAAATGAATATATAAAATTTATGTCTTAATATCGAATCATTAAAAAGA
 ATTATTATTATTTAATGATGCAAGGTATACCAAATTCGACTGATTTTCAATTTCTATTAGACGTTTTAGGGA
 TAAAAGTCTAGATTTACTTCTTACGCGCCATTCTGAAGCTAGTCATAAATGTATAAGTATTTAAAGGAAT
 TAATTTAAATGATTACGTATGAATATTTATGAGTTAATTGAATCTAAAAGATAAAATAGACATAAGTGAAT
 TGATTCAAATATGATTTACAAGCCACACTATAATGATATTATATTCATGAACATTTCCATTTTGAGTGCA
 CAAGAGAAAAGTCTGACATGGCCAGAAAAGAAACATTCATTCCATTCCCCATCAACATCTTATACTAAGT
 CGTAAGACAATCATTTTACTTGGTCGACAACGAATCCTTAAAGCGAGTTTTGTGTTTTTTTTTTTTATATA
 TTTAATAAAAAAGCACACAACTCAACTCGAAT**CCAGCGATTTACACTCACAATTGTCTTATGAAGTGG**
CAACATGGCGAACCGTACCGTCTCTAAGCCCTCCCAAGCGCCGTCCTCCGTCAGGACGTAGCCGGCTGC
 GGCTTATGGCCATCCTAATTTGCACATTTTAAATAGGCAACGCCATCGTTCTGTGCTCTCCTCCAACCTC
 CATCCTTGCACTCAATGTTTGGAGAGCATTTTTATTTAAACAGATTGATGTAGTGGAGGGAGAGAGAGTAC
 GCGACTGACTGGGGTGTGGGGAGGGAGGAGCAAATGGCTTAGGCTTAGGGATTAGCGTGCTAGCTAAG
 ATTTACGCACCGACGCCCTTTTTTATGGACGGACGGCGTGAAATTTGAAAAGTTTTTCAAGAGAAGAACGA
 GGGAAACCTTTTTGCCGACCTTTGTTACCCACTCGCTCTCAACCGTCAATAATTTCCATCTACATCTCC
 TCCACCATCTGGTCTCCGTTTTCAATATGGCAG**GGTGATACAACAACCCTGCTGGTGGTGCCACCTCC**
CAGAGCTGCATTAATCAGAGCTTTGGACAAGCAAAAACCTACGGAACCCATAATACACCGCCACAGCCCG
ATGATGGCAACAGTTCAACGCAATTGGCCGAGAATCTTTACCTATGGCTGGCACAACTCGGATATATTTGG
GGCTGTTAATCAGCCCGGCTCTGGCTGGCGTCAATTGGTCAATCGTACACGTGGCCTCTTCTGCAATGAA
CGTCATATACCAGCGCCACGAAAACATTTACTCAAAAACGGTAAGTTCAACATTTGTTTTATCAGCATTT
 ATTTTGGAGATAGCAAAAATTTGTAACCTCTCTTATTTGGGATCGAAATCTTTATTTTATGACTCTGAACATG
 AGTCGGACACCAGGAATCTTGACGACGACGGCGCCGACGACGCCCTTGATTTCTTTGCCCTTTGGCTCGCC
 GTCATCAGATCAGCATCACTTTGTGGAGAGTAATTGGTCCATTTGGTCCGGAATCAGCGTGTCCAATAT
 GTTCTTGGAACGACGCAACGTTTCAAATGCCGCAATGGTGCATTACGCCGGATCACCATACTTGGACGAT
 ATTTCTTCATCTTGAGTGCCATGTCAGATGCGAAATGATTATCGACCATCGAATTGTCACCTGTCTTGGT
 TTGATTATTCGACATCAGGACATTTCCCTCCAATGGAATCCTTTCTTGTGCTTAATTTTTTTTGTATTTTT
 TGTTTTTTTTTATTATATAAGTGTATTGATTTGCTATCGTCTAGTTTTAGTCTGTAACCTGATTTGCCATA
 GGAGATACAATTTAAACTGTTGATTTGATAGAGAAAACAGGGCACACTTTGTTAACAAAATGGACCAAAT
 GAAGTCAATCGTCTTAGGATAAATTTTTATTTATTTTCCCTTTATTTTCCGTACCCCTTTTGCAG**CTGCGG**
TGTGGCCTATCCCGTGAACCTATTGGCAGTTATGGGTAGCTCTGGAGCTGGTAAGACAACCTTTGCTGAAT
GCTTTGGCCTTTCTGTTCAACGCAAGGCATTCAGGTGTCACCATCGGGAATGAGACTACTTAATGGTCAGC
CGGTCGATGCCAAAGAGATGCAGGCTCGATGTGCTTATGTGCAGCAAGATGATCTATTTATTGGTTTCGCT
GACAGCTCGCAACATTTGATATTCATGCCATGGTGCGAATGCCGCGCAATTTGACATACAAACAGCGT
GTGGCACGAGTGGATCAGGTAATACAGGAATTTGTCGTTGAGCAAGTGCCAGAATACGATAATCGGTGTTT
CGGGTCGTGTGAAGGGTCTTTCCGGTGGCGAGCGAAAACGTTTGGCCTTCGCCCTCAGAAGCTCTCACCGA
TCCACCCTGTTGATATGCGATGAACCCACCTCGGGACTGGATTCAATTTACAGCCCATAGTGTGGTTCAA
GTAATGAAGAAGCTATCGCAAAAGGGCAAACTGTCATTTCTAACCATACATCAGCCGTCCTCGGAATTAT
TTGAGCTATTTGACAAGATTTCTTTCTAATGGCAGAGGGACGTGTGGCCTTCTCGGCACACCCAGCGAGGC
AGTGGACTTCTTCTCATAGTGAGTAGTAGTAGGATCTCATAATTTGATCATCGACATTTCTGTTTGTGA
 AACCTTTTTTTTAG**TGTGGGAGCTCAGTGTCCAACAAACTACAATCCAGCTGATTTCTATGTCCAAGTGC**
TGGCTGTTGTCCCTGGCAGGGAGTTAGAATCGCGTGATCGCATTTGCCAAAATTTGCCGATAACTTCGCCAT
TAGTAAGGTGGCTAGGGATATGGAGCAATTGCTGGCAGCCAAGACCCAATCGCAGCCGCTGGAGCAACCA
GAGAATGGATACACCTATAAGGCCACCTGGTTTTATGCAATTCAGGCTGTATTATGGCGTTTATGGTTAT
CCGTGCTTAAAGAACCATTTGTTGGTTAAAGTGCAGCTCAATTCAAACGACGGTCAGTTGACGGATTGTATG
 CCATTGAGTTTCCAATCAGATAACGTCTCCTCATATTCAG**ATGGTTGCCATACCTCATTTGGATTAATCTT**
TCTGGGTGAGCAACTGACCCAGTCCGGTGTCAATATCAATGGAGCCATCTTTCTGTTTTTTGACCAAT
ATGACGTTTCAAGATGATTTGCCACCATAAATGTGAGTATTATAATGAATCTTGAATCGATCTAATCC
 AGTTGGACACACTTTCAG**GTCTTCACATCCGAATGCCGTGCTTTTATGAGGGAATCTCGTAGCCGTTTTGT**
ATCGTTGTGATACGTATTTTCTGGGCAAGACTATAGCCGAATGCCACTGTTTCTTACTGTTCCACTGGT
TTTACAGCGATTGCCATCCCATGATTGGATTACGGGCCGAGTTTGGCATTTCTTTAATTGTTTGGCC

CTGGTCACTTTGGTGGCGAATGTTCCACATCGTTTGGCTATCTCATCTCCTGTGCCAGCTCATCCACAT
 CAATGGCGCTGTGCGGTGGGCCACCAGTGATTATACCATTCCCTTCTGTTTGGTGGTTTTCTTTTTGAATTC
 CGGCTCAGTGCCTATTTATCTGAAATGGTTGTCATATTTATCCTGGTTCCGTTATGCCAACGAGGGCCTA
 CTCATCAATCAATGGGCCGATGTGGAGCCGGGCGAGATTACCTGCACCTCATCAAACACCACATGCCCA
 GTTCGGGTAAAGTTATATTGGAGACATTGAACTTTTCTGCTGCCGATTTACCGCTGGATTATGTGGGATT
 GGCTTTACTTATTATAAGTTTCCGAGGATTCGCTTATGTGGCTCTTCGATTGCCAGCCAGGCGCAAGGAT

B.2- CDS white

ATGGGTCAGGAGGATCAAGAGCTATTAATACGCGGCAATAGTAAAAATACCTCAGCCGAGCATTTCGATA
 ATGGTGATACAACAACCACTGCTGGTGGTGCCACCTCCCAGAGCTGCATTAATCAGAGCTTTGGACAAAG
 CAAAACTACGGAACCCATAATACACCGCCACAGCCCGATGATGGCAACAGTTCAACGCAATTGGCCGAG
 AATCTTACCTATGCCTGGCACAATCTGGATATATTTGGGGCTGTTAATCAGCCCGCTCTGGCTGGCGTC
 AATTGGTCAATCGTACACGTGGCCTCTTCTGCAATGAACGTCATATAACCAGCGCCACGAAAACATTTACT
 CAAAAACGTCTGCGGTGTGGCCTATCCCGGTGAACTATTGGCAGTTATGGGTAGCTCTGGAGCTGGTAAG
 ACAACTTTGCTGAATGCTTTGGCCTTTCGTTCCACCGCAAGGCATTCAGGTGTCACCATCGGGAATGAGAC
 TACTTAATGGTCAGCCGGTCGATGCCAAAGAGATGCAGGCTCGATGTGCTTATGTGCAGCAAGATGATCT
 ATTTATTGGTTCGCTGACAGCTCGCGAACATTTGATATTCATGCCATGGTGCGAATGCCGCGCAATTTG
 ACATACAAACAGCGTGTGGCAGAGTGGATCAGGTAATACAGGAATTGTCGTTGAGCAAGTGCCAGAATA
 CGATAATCGGTGTTCCGGTCTGTGAAGGTCTTTCCGGTGGCGAGCGAAAACGTTTGGCCTTCGCCTC
 AGAAGCTCTCACCAGTCCACCGCTGTTGATATGCGATGAACCCACCTCGGGACTGGATTCAATTTACAGCC
 CATAGTGTGGTTCAGTACTGAAGAAGCTATCGCAAAGGGCAAACCTGTCATTCTAACCATACATCAGC
 CGTCCCTCGGAATTAATTTGAGCTATTTGACAAGATTTCTTAATGGCAGAGGGACGTGTGGCCTTCCTCGG
 CACACCCAGCGAGGCGAGTGGACTTCTTCTCATACGTGGGAGCTCAGTGTCCAACAAACTACAATCCAGCT
 GATTTCTATGTCCAAGTGTGGCTGTTGTGCCGAGGGAGTTAGAATCGCGTGATCGCATTGCCAAAA
 TTTGCGATAACTTCGCCATTAGTAAGGTGGCTAGGGATATGGAGCAATTGCTGGCAGCCAAGACCCAATC
 GCAGCCGCTGGAGCAACCAGAGAATGGATACACCTATAAGGCCACCTGGTTTATGCAATCCGAGCTGTA
 TTATGGCGTTCATGTTTATCCGTGCTTAAGGAACCATTTGTTGGTTAAAGTGCAGCTCATCAAACGACGA
 TGGTTGCCATCTCATTGGATTAATCTTTCTGGGTCAGCAACTGACCAAGTCCGGTGTGATGAAATATCAA
 TGGAGCCATCTTTCTGTTTTTGACCAATATGACGTTTTGAGAATGATTTGACCACATAAATGTCTTCACA
 TCCGAACTGCCTGTCTTTATGAGGGAATCTCGTAGCCGTTTTGTATCGTTGTGATACGATTTTTCTGGGCA
 AGACTATAGCCGAACTGCCACTGTTTCTTACTGTTCCACTGGTTTTTACAGCGATTGCCATCCCATGAT
 TGGATTACGGGCCGGAGTTTGGCATTCTTTAATGTTTTGGCCCTGGTCACTTTGGTGGCGAATGTTTCC
 ACATCGTTTGGCTATCTCATCTCCTGTGCCAGCTCATCCACATCAATGGCGCTGTCGGTGGGCCACCAG
 TGATTATACCATTCTTCTGTTTGGTGGTTTTCTTTTTGAATTCGGCTCAGTGCCTATTTATCTGAAATG
 GTTGTCAATTTATCCTGGTTCGGTTATGCCAACGAGGGCTACTCATCAATCAATGGGCCGATGTGGAG
 CCGGGCGAGATTACCTGCACCTCATCAAACACCACATGCCCCAGTTCCGGTAAAGTTATATTGGAGACAT
 TGAACTTTTCTGCTGCCGATTTACCGCTGGATTATGTGGGATTGGCTTTACTTATTATAAGTTTCCGAGG
 ATTCGCTTATGTGGCTCTTCGATTGCGAGCCAGGCGCAAGGATTA

B.3- Proteína White

MGQEDQELLIRGNSKNTSAEHLHNGDTTTTAGGATSQSCINQSFQSKNYGTLNTPPQPDDGNSSTQLAE
 NLTYAWHNLDFGAVNQPGSGWRQLVNRTRGLFCNERHI PAPERKHLKNCVAVPGELLAVMGSSGAGK
 TTLNLALAFRSPQGIQVSPSGMRLNQGVPDAKEMQARCAVYQQDDLF IGSLTAREHLIFHAMVRMPRNL
 TYKQRVARVDQVIQELSLSKCQNTIIGVPRVKGLSGGERKRLAFASEALTDPELLICDEPTSGLDSFTA
 HSNVQVLKLSQKGTVILTIHQPSSELFELFDKILLMAEGRVAFVLPSEAVDFFSYVGAQCPTNYNPA
 DFYVQVLAVVPGRELESRDRIAKICDNFAISKVARDMEQLLAAKTQSQPLEQPENGYTYKATWFMQFRAV

LWRSWLSVLKEPLLKVRILIQTTMVAILLIGLIFLGGQQLTQVGMNINGAIFLFLTNMTFQNVFATINVFT
SELPVFMRESRSRLYRCDTYFLGKTI AELPLFLTVPLVFTAIAYPMIGLRAGVWHFFNCLALVTLVANVS
TSFGYLISCASSSTSMALSVGPPVVIIPFLLEGGFFLNSGSVPIYLKWLSYLSWFRYANEGLLINQWADVE
PGEITCTSSNTTCPSSGKVILETLNFSAADLPLDYVGLALLIISFRGFAYVALRLRARRKD

B.4- Sonda Exón 1

1085 pb 38,1% GC

GTTGGGTTGCTTATTTGTCTCATCTTGTCTATAATCAGTATACAAATAAGTAGCTAAAGCTTCTCCATAT
TCCTCTTCCTCTCACGCTTTGTCTCTCTCTCTGCCCTTTTTTCGTTCCAGCACCAACAATTTTTATCTCT
ATCAAAATTTCCACTCATTGTCGAGACTTTGTTATTGTCCCATTCATCCGGACGTTAACCGTTGAGGTTG
TCGAGAGACCGCTCAGCTACCTCAGTTGCATTTTGTGACGCGTTCGTCACGAAGTTCATACGAGAGAAT
CGTGTGCGTACATTTTTTTTTTTTACTTTTTGTTTTTTTTAATTATTAATTTATTTTCGCATATTTTCTGAG
TGTGTGCGTGTGCGTGTGTGTCTGTGCAAAGTGAATGCAAATAAAATATAAAATTTATATACGCACATT
TGAAAATATATTGGAAGGATGGGTCAGGAGGATCAAGAGCTATTAATACGCGGCAATAGTAAAAATACCT
CAGCCGAGCATTTGCATAATGTAAGTGCATTTATTATATCTTTAGCATACTTTCAGGCGCTGGGGTGGTT
GCATGCATGTGGCAACCGACAAAATAAACGTTTACAGCGTGAGAAGTAGCCCCAAAAAAGCCACATGGAG
ACCACACATGACCACAACATAACCGCATTTGCAAAAAGGCAACCAAAAAGAACAACCACACAGCACACAAAA
ACCACGACTTTGTCAATGTAAAAATAATAACAACAAGCATTTTAACATCCATAGATCAGACACACTGACT
AACCGCCTGACAGACAGACAGATAGATAGACACAAAATGGATCAGACAACAACAGCATGCATTATGCAAT
CCATGAATTGAAATTCGAGTCCAATTGATGCCAAAGTGGTAGCAAATACAGGAAAGTCTTCTTATTGCAT
ATTTGACCTGAATGCTGAACTCAATTCAATTGCAAATGGTTCAAGGTTTAAGTTAACACAATTACTATGT
TCACTCTATGATTGTCTTTGTGGTGCAAAAGTAAAAGAATCTATACATAAGATAAATGGGCTAAAGTTGAAA
TAAAAGAGAAATCTACGAGTAGAGCCAAGCCAAAC

B.5- Sonda Región 3-6

1289 pb 45,6% GC

CTAATGGCAGAGGGACGTGTGGCCTTCCTCGGCACACCAGCGAGGCAGTGGACTTCTTCTCATAGTGAG
TAGTAGTAGGATCTCATAATTTGATCATCGACATTTCTGTTTGTGAAACCTTTTTTTTTTAGTGTGGGAGC
TCAGTGTCCAACAACTACAATCCAGCTGATTTCTATGTCCAAGTGTGCTGGCTGTTGTGCCTGGCAGGGAG
TTAGAATCGCGTGATCGCATTGCCAAAATTTGCGATAACTTCGCCATTAGTAAGGTGGCTAGGGATATGG
AGCAATTGCTGGCAGCCAAGACCCAATCGCAGCCGCTGGAGCAACCAGAGAATGGATACACCTATAAGGC
CACCTGGTTTTATGCAATTCGAGCTGTATTATGGCGTTCATGGTTATCCGTGCTTAAGGAACCATTTGTTG
GTTAAAGTGCGACTCATTCAAACGACGGTCAGTTGACGGATTGTATGCCATTGAGTTTCCAATCAGATAA
CGTCTCCTCATATTCAGATGGTTGCCATACTCATTGGATTAATCTTTCTGGGTGAGCAACTGACCCAAG
TCGGTGTCAATGAATATCAATGGAGCCATCTTTCTGTTTTTGACCAATATGACGTTTTCAGAATGTATTTGC
CACCATAAATGTGAGTATTATAATGAATCTTGAATCGATCTAATCCAGTTGGACACACTTTCAGGTCTT
CACATCCGAAGTGCCTGTCTTTATGAGGGAATCTCGTAGCCGTTTGTATCGTTGTGATACGTATTTTCTG
GGCAAGACTATAGCCGAAGTGGCACTGTTTCTTACTGTTCCACTGGTTTTTCACAGCGATTGCCATATCCCA
TGATTGGATTACGGCCGGAGTTTGGCATTCTTTAATTGTTTGGCCCTGGTCACTTTGGTGGCGAATGT
TTCCACATCGTTTGGCTATCTCATCTCCTGTGCCAGCTCATCCACATCAATGGCGCTGTGCGTGGGCCCA
CCAGTGATTATACCATTCCCTTCTGTTTGGTGGTTTCTTTTTGAATTCCGGCTCAGTGCCTATTTATCTGA
AATGGTTGTCAATTTATCTTGGTTCCGTTATGCCAACGAGGGCTACTCATCAATCAATGGGCCGATGT
GGAGCCGGGCGAGATTACCTGCACCTCATCAAACACCACATGCCCCAGTTCCGGTAAAGTTATATTGGAG

Anexo

ACATTGAACTTTTCTGCTGCCGATTTACCGCTGGATTATGTGGGATTGGCTTACTTATTATAAGTTTCC
GAGGATTCGCTTATGTGGCTCTTCGATTG

C- ALELOS

Según su efecto sobre el fenotipo podemos distinguir los siguientes alelos:

Alelo nulo (o amorfo), es el que presenta una falta completa de función del gen.

Alelos hipomorfos, son producidos por mutaciones que producen una pérdida parcial de función. A nivel molecular, usualmente consisten de lesiones que reducen el nivel o eficiencia del producto génico. A nivel de la transcripción; inserción de ET que interrumpen regiones 5' no traducidas. Los hipomorfos producen un gradiente de fenotipos con el incremento en el número de copias. El homocigoto es menos severo que el hemicigoto (hipomorfo/delección) y éste es menos severo que el alelo nulo en homocigosis. Ej. colores de ojos, mutaciones sensibles a la temperatura.

Alelos hipermorfos, son mutantes que producen un exceso del producto génico normal o una versión "hiperactiva" de la proteína, es una forma de ganancia de función. El fenotipo del homocigota hipermorfo es más severo que el del heterocigota (hipermorfo/+); y éste es más severo que el del heterocigota (hipermorfo/Df)

Alelos neomorfos, surgen por mutaciones que producen una nueva función. No hay mucha consistencia entre los tipos de lesiones moleculares que producen éste segundo tipo de ganancia de función. Pueden ser producidas por expresión ectópica. La expresión no es diferente en homocigosis que en heterocigosis (neomorfo/Df)

Alelos antimorfos, surgen de mutaciones que antagonizan al alelo salvaje y son distinguibles de las neomorfos porque pueden ser rescatadas, al menos en parte, por dosis extra del gen salvaje

D- PROTOCOLOS

D.1- EXTRACCIÓN de ARN de INDIVIDUOS ADULTOS de *Drosophila* *

- Dormir las moscas
- Lavar con H₂O miliQ, tratada con DEPC
- Lavar con PBS 1X, tratado con DEPC
- Pasar las moscas a un eppendorf en hielo y nitrógeno líquido
- Homogeneizar la mezcla sin quitar el eppendorf del hielo
- Agregar la solución de guanidinio con β-mercaptoetanol y homogeneizar (con motor cordless, for pellet pestle de Sigma®)
- Guardar a -80 °C (opcional)
- Añadir 100 µl de acetato sódico (2M, pH=4)
- Añadir un volumen de fenol ácido (400 µl)
- Añadir 40 µl de cloroformo/isoamil y 100 µl de cloroformo
(Mezclar bien cada vez que se agrega una nueva solución)
- Centrifugar por 20 minutos a 4 °C a 14000 rpm, recoger luego la fase acuosa
- Añadir un volumen de fenol ácido, 10 µl de cloroformo/isoamil y 50 µl de cloroformo)
- Centrifugar por 20 minutos a 4 °C a 14000 rpm, recoger luego la fase acuosa
- Agregar un volumen de cloroformo
- Centrifugar por 20 minutos a 4 °C a 14000 rpm, recoger luego la fase acuosa
- Agregar un volumen de isopropanol (70 µl)
- Dejar ON a 4 °C y en hielo

- Centrifugar por 20 minutos a 4 °C a 14000 rpm, se descarta el sobrenadante con cuidado de no perder el pellet
- Agregar 1 ml de etanol 70%
- Centrifugar por 20 minutos a 4 °C a 14000 rpm, descartar el sobrenadante y secar el pellet (el eppendorf se tapa con parafilm, se perfora con aguja y se deja bajo una lámpara)
- Resuspender en 20 µl de agua (RNasa free) y guardar a –80 °C

* adaptado de Chomeczynski Piotr and Sacchi Nicoletta, 1987

D.2- EXTRACCIÓN de ADN de INDIVIDUOS ADULTOS de *Drosophila*

- Homogeneización del material en un eppendorf de 1,5ml en hielo
- (Se utiliza entre 300µl y 500µl de material)
- Agregar 200µl de tampón de lisis y homogeneizar.

Tampón de lisis: 0,5ml Tris-HCl pH=8 1M

1ml EDTA 0,5M

200µl NaCl 5M

3,3ml H₂O

5 mL Vol. final

- Agregar 400µl más de tampón de lisis
- Agregar proteinasa K a concentración final (100 µg/ml)
- Adicionar 60 µl de SDS 10%
- Calentar 45 min a 65°C a baño maría, invertir repetidas veces.
- Colocar 300 µl fenol:cloroformo:isoamil. Mezclar suavemente
- Centrifugar 10 min y recoger el sobrenadante

- Colocar 300 µl fenol:cloroformo:isoamil. Mezclar.
- Centrifugar 10min y recoger el sobrenadante
- Lavar con 300µl cloroformo. Mezclar.
- Centrifugar 10min y pasar el sobrenadante a un nuevo tubo
- Agregar 2 Vol de etanol absoluto frío. Mezclar por inversión (aparece la madeja de ADN).
- Colocar 10 min a -20°C.
- Centrifugar 1min y eliminar el sobrenadante. Lavar con etanol 70%
- Resuspender a TE o Agua (50 µl)
- Agregar RNAsa a concentración final 20 µg/ ml, y dejar 30 min a 37°C

D.3- CLONACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN

Los productos de amplificación fueron purificados y ligados al plásmido de clonación pJET1.2 mediante la T4 ADN ligasa de Fermentas, en una reacción ON a 22°C. La reacción de ligación fue detenida mediante una incubación de 10 minutos en baño a 65°C y almacenada a -20°C.

Transformación de células competentes :

- Mezclar 3 µl de producto de ligación con 100 µl de células competentes.
- Incubar 15 minutos en hielo.
- Shock térmico 45 segundos en baño a 42 °C.
- Agregar 300 µl de SOC (previamente se le agrega MgCl₂, MgSO₄ y glucosa).
- Crecimiento por agitación en shaker a 200 rpm, 1 hora y media a 37°C.
- Plaquear en placas de medio selectivo LB-agar-ampicilina-IPTG/XGal precalentadas a 37°C, dejando secar e invirtiendo la placa para colocar en estufa a 37°C ON.

D.4- SOUTHERN BLOTTING / ECL kit, Amersham

- Electroforesis en gel de agarosa 1 % TAE 1X (1 µl de una solución 10 mg/ml de bromuro de etidio cada 60 ml).
- Se cargan en el gel: Muestras
Marcador de Peso Molecular
ADN control positivo
- Corrida electroforética primero a 80 voltios hasta que las muestras salgan del pocillo, ON a 30 voltios (80 mA), y luego a 34 voltios.

Procesamiento del gel

- Fotografiar el gel con luz UV para registrar la separación electroforética de las muestras y controles cargados, colocando una regla al lado del gel antes de fotografiarlo.
- Marcar el gel en un extremo

Lavados

EL tratamiento del gel se hizo siempre en agitación.

- Se sumerge el gel en solución de depurinación entre 10-12 minutos (hasta cuando el colorante azul del bromofenol se vuelva completamente amarillo).
- Descartar la solución de depurinación y lavar el gel brevemente con agua destilada.
- Sumergir el gel en solución de desnaturalización de 25-45 minutos, hasta que el bromofenol se vuelva azul nuevamente.
- Lavar el gel brevemente con agua destilada.
- Pasar el gel a las solución neutralizante por 30 minutos. Luego cambiar a solución neutralizante nueva y dejarlo 15 minutos más.
- Durante este período comenzar a montar el soporte para la transferencia:

- Cortar la membrana del tamaño del gel (recordar cortarle un extremo según la marca del gel).
- Tomar el recipiente y colocar un papel 3 MM mas largo y ancho que el gel y que sus bordes contacten con el buffer de transferencia (10X SSC). Una vez que el papel este húmedo, eliminar todas la burbujas con una varilla de vidrio.
- Mientras esto ocurre, humedecer la membrana rápidamente en agua destilada y luego en buffer de transferencia (10XSSC) por 5-10 minutos.
- Tomar el gel invertirlo y colocarlo sobre el papel 3 MM (sin que queden burbujas) y cubrir los bordes con parafilm. Luego colocar la membrana sobre el gel.
- Colocar 3 papeles 3MM previamente humedecidos en 2X SSC.
- Colocar las servilletas sobre este soporte, luego un cristal y un peso.
- Mantener la transferencia de 8-24 horas.

Procesamiento de la membrana

- Dar vuelta el gel más la membrana (que el gel quede arriba) y colocarlos sobre papel 1 MM seco. Marcar los pocillos del gel.
- Colocar la membrana en SSC 6X y lavar por 1-5 min. con agitación suave a temperatura ambiente.
- Dejar que escurra el exceso y colocarla en papel. Dejarla de 30-60 minutos a temperatura ambiente.
- Crosslinkear a 80 °C por 2 horas.

Marcado, hibridación y detección

Antes de comenzar el marcado, se debe preparar el buffer de hibridación y empezar la prehibridación de la membrana.

Preparación del buffer de hibridación

- A temperatura ambiente, colocar el volumen necesario (20 ml) de “Gold hibridization buffer” (viene en el kit) en un vaso de bohemia (vidrio) (0,25 ml/cm² para blots pequeños y 0,125 ml/cm² para blots grandes)
- Agregarle 0,5844g de NaCl sólido (la concentración óptima de NaCl es diferente para las diferentes sondas, pero 0,5 M NaCl generalmente da resultados aceptables)
- Agregar 1 g del “Agente bloqueante” (viene en el kit) (concentración final 5% w/v) e inmediatamente mezclar con vortex para obtener el agente bloqueante libre en solución.
- Mezclar aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente (con agitador magnético)
- Calentar la solución a 42 °C, 30-60 minutos, mezclando ocasionalmente (poner el vaso en una estufa a 42 °C)

Prehibridación de la membrana (en tubos)

- Precalentar el volumen necesario de buffer de hibridación a 42 °C.
- En un recipiente, humedecer la blot en SSC 5X (pH =7).
- Enrollar la membrana y colocarla dentro del tubo.
- Agregar una cantidad pequeña de SSC 5 X al tubo y desenrollar la membrana. **IMPORTANTE** Sacar las burbujas de aire entre la membrana y el tubo.
- Sacar el SSC 5X. Agregar los 20 ml de buffer de hibridación (0,0625-0,125 ml /cm², el tamaño del tubo determina el volumen mínimo necesario: para un tubo de 4x30 cm, 20 ml)
- Prehibridizar a 42 °C entre 15-60 minutos en estufa.

Preparar la sonda marcada

Este protocolo es para marcar 100ng de sonda de ADN.

- Diluir el ADN a ser marcado a una concentración de 10 ng/μl usando el agua provista. (La concentración de sal en la muestra de ácido nucleico no debe ser mayor a 10 nM.)
- Desnaturalizar 100 ng de ADN (10 μl) calentando por 5 minutos (poner parafilm alrededor de la tapa del tubo). La cantidad mínima de ADN la cual sería marcada es 100 ng en 10 μl. Si se requiere más se aumentaría el volumen manteniendo la concentración en 10ng/μl.
- Inmediatamente enfriar el ADN en hielo por 5 min. Darle un spin para juntar el contenido en el fondo del tubo.
- Mantener el ADN como hebra simple es requerido para asegurar una buen eficiencia de marcado.
- Agregar un volumen equivalente de ADN *labelling reagent* (10μl) al ADN enfriado. Mezclar suave pero exhaustivamente.
- El volumen del *labelling reagent* debe ser igual al volumen de ADN a ser marcado.
- Agregar la solución de glutaraldehído, usar un volumen equivalente al volumen del *labelling reagent* (10μl). Mezclar bien. Darle un *spin*.
- Incubar por 10 minutos a 37 °C.

Para ácidos nucleicos de < 300 pb aumentar el periodo de incubación a 20 minutos puede mejorar la eficiencia de marcado.

Si no se usa inmediatamente, la sonda puede ser mantenida en hielo por un corto período, por ej. 10-15 minutos. Las sondas marcada pueden ser guardadas en 30% de glicerol a -15 °C a -30°C por más de 6 meses.

- Agregar la sonda marcada al buffer de hibridación. Evitar poner la sonda directamente sobre la membrana.
- Incubar a 42 °C O.N. en horno.

Es **IMPORTANTE** no pasarse de 42°C durante la hibridación. Temperaturas más altas son nocivas para el componente enzimático del ADN labelling reagent.

Soluciones:

50X buffer TAE para agarosa

Tris (base)	2 M (242g)
EDTA (sal disodio)	0.05 M (18.6g)

Ajustar el pH a 8 con ácido acético glacial (\approx 57ml) y llevar a 1 litro. Para usar, diluir de forma que quede Tris acetato 0.04 M y EDTA 0.001 M

Solución de depurinización

HCl	250 mM
-----	--------

Solución de desnaturalización

NaCl	1.5 M
NaOH	0.5 M

Solución neutralizante

NaCl	1.5 M
Tris HCl	0.5 M

pH ajustado a 7.5

20X SSC

Na ₃ citrato	0.3 M
NaCl	3 M

pH 7.0