

Doc-B
u83
c.1

**ANALISIS GENETICO MOLECULAR DE LOS LOCI QUE
CODIFICAN PARA HEXOQUINASAS EN *Drosophila
melanogaster*.**

Tesis

Entregada a la Universidad de Chile en
cumplimiento parcial de los requisitos para optar
al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología

Facultad de Ciencias

por

Blanca Regina Urzúa Orellana

Director de Tesis : Dr Tito Ureta A.

1998

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO**

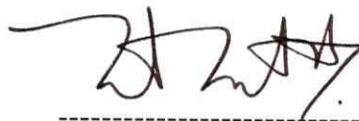
Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata:

Blanca Regina Urzúa Orellana

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en el Exámen de Defensa de Tesis rendido el día 4 de Junio de 1998.

Director de Tesis

Dr. Tito Ureta A.



Handwritten signature of Tito Ureta A. in black ink, positioned above a dashed horizontal line.

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Margarita Carú M.



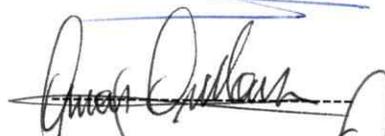
Handwritten signature of Margarita Carú M. in blue ink, positioned above a dashed horizontal line.

Dra. Liliana Cardemil O.



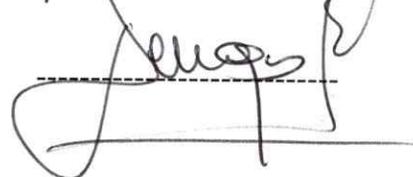
Handwritten signature of Liliana Cardemil O. in blue ink, positioned above a dashed horizontal line.

Dr. Omar Orellana O.



Handwritten signature of Omar Orellana O. in black ink, positioned above a dashed horizontal line.

Dr. Alejandro Venegas E.



Handwritten signature of Alejandro Venegas E. in black ink, positioned above a dashed horizontal line.

A mis Padres Regina y
Fernando, por estar siempre
incondicionalmente conmigo.

A mi amado esposo Víctor,
por su apoyo, comprensión y
constante amor.

A mis preciosos hijos Camila y Tomás,
por darle un nuevo sentido a mi vida
con su existencia.

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer a todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron para que hiciera posible este antiguo sueño. Mis sinceros agradecimientos :

Al tutor de esta Tesis, Dr. Tito Ureta A., por confiar en mi, por su ayuda y apoyo.

A Fondecyt por financiar en parte esta Tesis a través del proyecto 292-0001.

A la Dirección de Postgrado y Postítulo de la Universidad de Chile por financiar en parte esta Tesis a través del proyecto EPG-105.

A todos los integrantes del Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, donde desarrollé parte de esta Tesis. A la Dra Rosalba Lagos y Dra Victoria Guixe por su constante disposición y ayuda. En especial, a la Dra. Ana Preller de quién aprendí cosas fundamentales que siempre recuerdo.

A todos los integrantes del Laboratorio de Genética, donde también desarrollé parte importante de esta Tesis. De todo corazón agradezco a mis amigos Germán Hermosilla, Rubén León, Claudio Martínez, Patricio Retamales y Rafael Negrete.

A mi amigo Eduardo López Becerra, por apoyarme desde lejos desinteresada y generosamente con la secuenciación de un clon.

A la Dra. Liliana Cardemil por las facilidades prestadas para realizar algunos experimentos en su laboratorio. A Claudia Ortiz, con quién compartí gratos momentos de trabajo allí.

A la Dra. Cecilia Rojas B., por brindarme su amistad y apoyarme desinteresadamente en la realización de varios experimentos en su laboratorio. A Lorena Santa María por su amistad y cariño.

A los asistentes técnicos del Laboratorio de Bioquímica: Pedro Núñez y Manuel Muñoz (Q.E.P.D.) gracias por su ayuda cariñosa.

A mis amigas Jéssica Martínez, Pilar Martínez y Alejandra Mancilla por preocuparse de mi y entregarme su cariño.

Muy especialmente a la Sra Lucila Sepúlveda, en quién he depositado toda mi confianza y mi mayor tesoro, gracias por lo que ha significado su impagable ayuda y cariño en el desarrollo de mi trabajo.

A mis tíos Luz, Roberto y José, a mis primas Johanna y Jéssica por permanecer siempre interesados en mi trabajo.

A mi madre Regina Orellana y a mi padre Fernando Urzúa, por darme todo lo que he necesitado siempre, por su amor, apoyo e incansable estímulo. Este logro se los debo y dedico a ellos con todo mi amor.

A mi esposo, el Dr. Víctor Cifuentes, por brindarme toda su ayuda y apoyarme con generosidad, comprensión y amor durante el desarrollo de esta Tesis. Gracias por estar conmigo, permitirme crecer y ser feliz a su lado.

A mis maravillosos hijos, Camila Natalia y Tomás Ignacio, por existir, por brindarme su puro e inocente amor. Por llenar mi vida de alegría. Por darme la satisfacción de formar una familia.

Finalmente agradezco a Dios, que siempre está de mi parte. Él me ha regalado muchas cosas; dos ángeles y una estrella que nunca me abandona. Gracias Señor.

INDICE

	Página
AGRADECIMIENTOS	iii
INDICE	v
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABLAS	xiii
ABREVIATURAS	xiv
RESUMEN	xv
ABSTRACT	xviii
INTRODUCCIÓN	1
PROPÓSITO	14
MATERIALES Y MÉTODOS	16
I. Materiales	16
1. Material Biológico	16
1.1 Cepas de <i>Drosophila</i>	16
1.2 Ejemplares de rata	16
1.3 Bacterias	16
1.4 Levaduras	16
1.5 Enzimas	16
1.6 Anticuerpos	16
1.7 Acidos desoxirribonucleicos	17
2. Reactivos	19
3. Sistemas de purificación, marcado y secuenciación de DNA	20
II. Métodos	20
1. Cultivo y mantención de organismos	20
1.1 Bacterias	20
1.2 Hongos	20
1.3 Moscas	20
2. Preparación de extractos crudos	21

2.1 Moscas	21
2.2 Rata	21
3. Determinación de actividad hexoquinasa	22
3.1 Determinación espectrofotométrica de la actividad hexoquinasa	22
3.2 Método radiactivo para detectar actividad hexoquinasa	22
3.3 Determinación de actividad hexoquinásica en geles	23
4. Purificación de enzimas	23
4.1 Purificación parcial de hexoquinasas de <i>D. melanogaster</i>	23
4.1.1 Cromatografía en DEAE-celulosa	23
4.1.2 Cromatografía de afinidad	24
4.2 Purificación de hexoquinasa A de cerebro de rata	24
5. Electroforesis de proteínas	25
5.1 Electroforesis de proteínas en condiciones nativas	25
5.2 Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalantes	25
6. Transferencia de proteínas a filtros de nitrocelulosa	26
6.1 Transferencia electroforética húmeda	26
6.2 Inmunodetección en los filtros de nitrocelulosa	26
7. Determinación de proteínas	27
8. Determinación de la concentración de sales	27
9. Preparación y regeneración de los materiales cromatográficos	27
10. Purificación de ácidos nucleicos	28
10.1 DNA plasmidial	28
10.2 Acidos nucleicos totales de <i>Drosophila</i>	29
10.3 Acidos nucleicos totales de <i>R. norvegicus</i>	30
10.4 Acidos nucleicos totales de <i>S. cerevisiae</i>	30
11. Electroforesis de ácidos nucleicos	31
11.1 Electroforesis de DNA en geles de agarosa	31
11.2 Visualización de DNA en geles de agarosa	32
11.3 Determinación de tamaños moleculares	32

11.4 Determinación de la concentración de DNA	32
a) Densidad óptica	32
b) Método del minigel de agarosa	32
12. Extracción de DNA a partir de geles	33
12.1 Método de unión a sílica (Geneclean II)	33
12.2 Electroelución	33
13. Digestión de ácidos nucleicos con enzimas de restricción	34
13.1 Digestión total de DNA genómico	34
13.2 Digestión total de DNA plasmidial	34
14. Transformación genética de <i>E. coli</i>	35
14.1 Obtención de células competentes	35
14.2 Transformación	35
14.3 Ligado de DNA con DNA ligasa de T4	36
15. Hibridación de ácidos nucleicos	36
15.1 Marcación de DNA mediante partidores al azar	36
15.2 Marcación de DNA mediante reparación inducida por corte	37
15.3 Hibridación DNA : DNA	38
15.4 Lavados post-hibridación	39
15.5 Exposición de los filtros	40
16. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	40
16.1 Partidores para hexoquinasa y λ gt11	40
16.2 Amplificación de DNA	40
17. Manipulación de cromosomas artificiales de levadura (YAC)	41
17.1 Obtención de DNA cromosómico intacto de <i>S. cerevisiae</i>	41
17.2 Electroforesis de DNA en geles de campo pulsado	42
18. Secuenciación de DNA	42
RESULTADOS	43
1. Determinación del patrón isoenzimático de hexoquinasa	43
2. Purificación de enzimas	46

2.1 Purificación parcial de las isoenzimas de hexoquinasas	46
2.1.1 Preparación del extracto crudo	46
2.1.2 Cromatografía en DEAE-celulosa	46
2.1.3 Cromatografías de afinidad	49
2.2 Purificación de hexoquinasa A de cerebro de rata	49
3. Determinación de reactividad inmunológica cruzada	52
4. Análisis genético molecular de los genes de hexoquinasas en <i>D. melanogaster</i> mediante el uso de sondas heterólogas	52
4.1 Análisis de hibridación de DNA genómico de <i>Drosophila</i> con las sondas de rata	54
4.2 Análisis de hibridación de DNA genómico de <i>Drosophila</i> con las sondas de levadura	57
4.3 Análisis de restricción de DNA genómico de <i>Drosophila</i> usando el gen completo de hexoquinasa B de rata	62
4.4 Análisis de hibridación de DNA genómico de otras especies de la familia <i>Drosophilidae</i> usando el gen de hexoquinasa B de rata	66
5. Análisis de DNA genómico de <i>D. melanogaster</i> mediante PCR	66
5.1 Construcción de los partidores para hexoquinasas	66
5.2 Alineamiento de las mezclas de partidores I, II y III con los diferentes moldes de DNA	72
a) Alineamiento de las mezclas de partidores con cDNA de HK A	72
b) Alineamiento de las mezclas de partidores a DNA de rata	75
c) Alineamiento de las mezclas de partidores a DNA de <i>Drosophila</i>	76
5.3 Análisis de hibridación de los productos PCR	76
5.4 Clonamiento del fragmento de 0,67 kb de <i>D. melanogaster</i>	81
5.5 Análisis del plásmido pBSE1.4 mediante restricción	83
5.6 Análisis de hibridación de HK A de rata con el fragmento PCR de <i>Drosophila</i>	85
5.7 Secuenciación del plásmido pBSE1.4 y análisis computacional	87

a) Resultados del procedimiento de secuenciación	87
b) Resultados del análisis computacional de la secuencia nucleotídica	89
c) Resultados del análisis computacional de la traducción	92
6. Análisis de DNA genómico de <i>D. melanogaster</i> mediante el uso de YAC, que contienen DNA de la sección 8 del cromosoma X	99
6.1 Ubicación de los cromosomas artificiales	99
6.2 Análisis de hibridación de los YAC con el fragmento de 0,67 kb de <i>Drosophila</i>	102
DISCUSIÓN	106
1. Determinación del patrón isoenzimático de hexoquinasas en <i>Drosophila</i>	106
a) Electroforesis en geles de poliacrilamida	106
b) Separación por cromatografía de intercambio aniónico	107
2. Purificación parcial de las isoenzimas de hexoquinasa A y C	108
3. Reactividad inmunológica cruzada	110
4. Análisis genético molecular de los genes de hexoquinasas en <i>D. melanogaster</i> mediante el uso de sondas heterólogas	112
4.1 Análisis de hibridación con las sondas de rata	113
4.2 Análisis de hibridación con las sondas de levadura	115
4.3 Análisis de restricción con el gen de hexoquinasa B de rata	116
4.4 Análisis de hibridación de otras especies de la familia <i>Drosophilidae</i> con el gen de hexoquinasa B de rata	120
5. Análisis de DNA genómico de <i>D. melanogaster</i> mediante PCR	121
5.1 Construcción de los partidores para HK	121
5.2 Alineamiento de las mezclas I, II y III a los diferentes moldes de DNA	125
a) Alineamiento de las mezclas de partidores a cDNA de HK A	125
b) Alineamiento de las mezclas de partidores a DNA de rata	125
c) Alineamiento de las mezclas de partidores a DNA de <i>Drosophila</i>	127
5.3 Análisis del plásmido pBSE1.4	128
5.4 Análisis de hibridación del gen de HK A de rata con el fragmento	

de 0,67 kb	128
5.5 Secuenciación y análisis computacional del plásmido pBSE1.4	129
a) Análisis de la secuencia a nivel de nucleótidos	129
b) Análisis de la secuencia a nivel de aminoácidos	134
6. Análisis de DNA de <i>D. melanogaster</i> mediante el uso de YAC, que contienen DNA de la sección 8 del cromosoma X	136
PROYECCIONES	139
CONCLUSIONES	141
APÉNDICE N° 1 (Medios de cultivo)	143
APÉNDICE N° 2 (Soluciones)	144
APÉNDICE N° 3 (Marcador de tamaño molecular)	147
BIBLIOGRAFÍA.	148

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Determinación del patrón isoenzimático de hexoquinasas en *D. melanogaster* adulta mediante electroforesis en geles nativos de poliacrilamida.
- Figura 2 Determinación del patrón isoenzimático de hexoquinasas en *D. melanogaster* adulta mediante un método radioisotópico para actividad hexoquinasa.
- Figura 3 Purificación de las isoenzimas de hexoquinasas de *D. melanogaster* mediante cromatografía de intercambio aniónico.
- Figura 4 Electroforesis en geles nativos de poliacrilamida de las fracciones obtenidas por cromatografía en DEAE-celulosa.
- Figura 5 Hibridación de DNA genómico total de *D. melanogaster* usando como sonda cDNA de HK A de cerebro de rata.
- Figura 6 Hibridación de DNA genómico total de *D. melanogaster* usando como sonda cDNA de HK B de músculo de rata.
- Figura 7 Hibridación de DNA genómico total de *D. melanogaster* usando como sonda cDNA de HK C de hígado de rata.
- Figura 8 Hibridación de DNA genómico total de *D. melanogaster* usando como sonda cDNA de HK D de hígado de rata.
- Figura 9 Hibridación de DNA genómico total de *D. melanogaster* usando como sonda cDNA de hexoquinasa PI (HXK1) de *S. cerevisiae*.
- Figura 10 Hibridación de DNA genómico total de *D. melanogaster* usando como sonda cDNA de hexoquinasa PII (HXK2) de *S. cerevisiae*.
- Figura 11 Hibridación de DNA genómico total de *D. melanogaster* usando como sonda cDNA de glucoquinasa (GLK) de *S. cerevisiae*.
- Figura 12 Análisis de restricción de DNA genómico total de *D. melanogaster*, usando como sonda cDNA de HK B de rata.
- Figura 13 Mapas de restricción heterólogos y parciales de DNA genómico de *D. melanogaster*, obtenidos usando cDNA de HK B de rata como sonda.

- Figura 14 Hibridación de DNA genómico total de tres especies de la familia *Drosophilidae* usando como sonda cDNA de hexoquinasa B de rata.
- Figura 15 Diseño de los partidores para hexoquinasas.
- Figura 16 Amplificación de cDNA de HK A de rata con las tres mezclas de partidores, e hibridación con cDNA de HK A.
- Figura 17 Amplificación de DNA genómico de mosca y rata con las mezclas de partidores I y II, e hibridación con cDNA de HK A.
- Figura 18 Hibridación del fragmento de 0,67 Kb de *Drosophila* con cDNA de HK A de rata.
- Figura 19 Amplificación de DNA genómico de *Drosophila* y rata con la mezcla de partidores II, e hibridación con cDNA de HK A de rata.
- Figura 20 Análisis de restricción del DNA de las colonias obtenidas en el experimento de transformación con DNA del fragmento PCR de 0,67 kb de *Drosophila*.
- Figura 21 Análisis de restricción del plásmido pBS-E1.4.
- Figura 22 Análisis de restricción e hibridación del cDNA de HK A de rata usando como sonda el fragmento PCR de 0,67 kb de *Drosophila*.
- Figura 23 Secuencia nucleotídica del inserto de 0,67 kb de *Drosophila* clonado en el plásmido Bluescript SK⁻.
- Figura 24 Cobertura de los cromosomas artificiales de levadura (YAC) que contienen DNA de la sección 8 del cromosoma I (X) de *Drosophila*.
- Figura 25 Selección de los YAC en el genoma de *S. cerevisiae* usando como sonda pBR322.
- Figura 26 Análisis de hibridación de DNA genómico de la sección 8 del cromosoma X de *Drosophila* usando como sonda pBR322 y el fragmento de 0,67 kb.
- Figura 27 Alineamiento parcial de las secuencias de aminoácidos deducidos de la mitad amino y carboxilo de HK A de rata y HK PI de levadura.
- Figura 28 Representación esquemática de las regiones del gen de HK A de rata reconocidas por las secuencias nucleotídicas E1.4-T7 y E1.4-SK.

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1 Resumen del procedimiento de purificación parcial de las hexoquinasas de *D. melanogaster*.
- Tabla 2 Ensayos de purificación de las hexoquinasas A y C de *D. melanogaster*.
- Tabla 3 Reactividad inmunológica cruzada de extracto crudo de *D. melanogaster* con diferentes anticuerpos anti-HK A.
- Tabla 4 Resumen de tamaños moleculares de los fragmentos obtenidos al cortar DNA genómico total de *D. melanogaster*.
- Tabla 5 Características relevantes de los partidores sintetizados para hexoquinasas de mamíferos.
- Tabla 6 Resumen de los experimentos PCR realizados con cDNA de HK A, DNA genómico de rata y *D. melanogaster*, con las mezclas de partidores I, II y III.
- Tabla 7 Comparación de la secuencia nucleotídica de E1.4-T7 con la secuencia de nucleótidos del cDNA de HK A
- Tabla 8 Comparación de la secuencia nucleotídica de E1.4-SK con la secuencia de nucleótidos del cDNA de HK A de rata.
- Tabla 9 Comparación de la secuencia nucleotídica E1.4-T7/SK con HK de invertebrados, vertebrados y planta.
- Tabla 10 Resultados de la traducción a aminoácidos de la secuencia E1.4-T7/SK.
- Tabla 11 Comparación del marco de lectura "e" y de los péptidos 42 e y 87 e con cDNA de HK A de rata.
- Tabla 12 Análisis de restricción del DNA genómico de *D. melanogaster* usando sondas heterólogas de rata y levadura.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina 5' difosfato
ATP	Adenosina 5' trifosfato
BCIP	5-bromo-4-cloro-indolil-fosfato
BSA	Seroalbúmina de bovino
DEAE-celulosa	Dietilaminoetil-celulosa
D.O.	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido etilendiaminotetracético
GK, GLK (*)	Glucoquinasa
HK, HXK, Hex (*)	Hexoquinasa
IPTG	Isopropiltiogalactósido
MOPS	3-(N-morfolino)propanosulfónico
NADP	Nicotinamida-adenina-dinucléotido-fosfato
PEG	Polietilenglicol
PMSF	Fenilmetil-sulfonilfluoruro
PPO	2,5-difeniloxazol
POPOP	1,4 bis[2-(5-feniloxazolil)] benceno
RNAsa A	Ribonucleasa A
SDS	Dodecilsulfato de sodio
TEMED	N, N, N, N', tetrametiletilendiamina
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
X-gal	5-bromo-4cloro-3-indolil- β -D-galactósido

(*) = No hay consenso en la nomenclatura de genes y proteínas respectivas de hexoquinasas en mamíferos, levaduras y *D. melanogaster*, por lo tanto en este trabajo se usa la nomenclatura descrita en la literatura para cada organismo, respectivamente.

RESUMEN

En insectos, la variación en el patrón de isoenzimas de hexoquinasa está codificada por un locus simple en algunas especies y por loci múltiples en otras. Sin embargo, en Dípteros, a juzgar solamente por el patrón electroforético, existen datos para sostener que, en general, loci múltiples codifican para estas isoenzimas. Los escasos datos ahora comunicados, sobre la genética de los loci para hexoquinasas en *Drosophila melanogaster*, han permitido obtener información un tanto escueta acerca de la ubicación de estos genes. En esta especie, los genes estructurales para *hex a* y *hex b* han sido localizados en el cromosoma I (X) y el gen que codifica para *hex c* en el cromosoma II.

La caracterización bioquímica, genética e inmunológica de las formas múltiples de hexoquinasas, permite inferir que en *D. melanogaster* existen al menos dos genes que codifican para estas enzimas. Uno de estos daría origen a la proteína Hex A y mediante modificación post-transcripcional, post-traducciona, o ambas, a Hex B. Estos mismos datos sostienen que Hex C estaría codificada por un gen estructuralmente distinto y no ligado al anterior.

Nada de lo antes resumido ha sido demostrado a nivel genético molecular y no existen evidencias de este tipo que apoyen estas observaciones. Es más, es posible que la cercana localización entre dos genes impida la recombinación entre ambos y dificulte su identificación como entidades independientes. Si este fuera el caso para los genes *hex a* y *hex b*, que estarían estrechamente ligados, podrían existir más de dos loci que codifican para esta enzima en el DNA de *Drosophila*.

Basados en la información recién descrita es que en esta tesis se desarrollaron algunas estrategias experimentales para conocer la organización estructural de los loci que codifican para hexoquinasas en esta especie de Díptero.

Para ello, se realizó un análisis de hibridación de DNA genómico de *Drosophila*, usando sondas heterólogas de cDNA, que codifican para hexoquinasas A, B, C y D,

provenientes de rata y levadura. Las sondas de rata, que codifican para las hexoquinasas A, B y D, detectan señales de hibridación en DNA genómico de mosca. Por otra parte, las sondas de levadura, que codifican para hexoquinasas PI y PII revelaron bandas de hibridación con DNA genómico de *Drosophila* que fueron notablemente más débiles que las señales obtenidas con las sondas de rata. El análisis de restricción, usando la sonda de hexoquinasa B, permitió construir mapas heterólogos tentativos de la región que contiene el o los loci de hexoquinasas, la cual abarca como mínimo entre 6,5 a 9 kb., o más.

La siguiente estrategia desarrollada consistió en diseñar partidores específicos para hexoquinasas, a partir de un alineamiento múltiple de secuencias de cDNA de hexoquinasas A de mamíferos (rata, bovino y humano). A partir de tres zonas conservadas del gen se obtuvieron 4 partidores. La unión de estos partidores en tres mezclas diferentes, denominadas MI, MII y MIII, amplifican teóricamente fragmentos de aproximadamente 0,47-0,67 y 1,14 kb, cuando se usa como molde cDNA de hexoquinasa A de rata. El tamaño del fragmento sintetizado por la mezcla III corresponde a la suma de los fragmentos sintetizados por las mezclas I y II. El análisis PCR reveló que la mezcla de partidores MI amplifica 4 fragmentos de aproximadamente 0,40 - 0,54 - 0,56 y 0,64 kb del DNA genómico de *Drosophila*. La mezcla MII, amplifica 4 fragmentos de 0,48 - 0,67 - 1,3 y 1,6 kb. El análisis de hibridación de estos productos PCR, usando la sonda de cDNA de 3,6 kb que codifica HK A de rata, permitió concluir que los tres fragmentos de mayor tamaño amplificados por la mezcla I y el fragmento de 0,67 kb amplificado por la mezcla II son reconocidos por la sonda. El fragmento de 0,67 kb fue clonado en el sitio Hinc II del vector plásmido Bluescript SK⁻ y secuenciado totalmente por ambos extremos con los partidores T7 y SK⁻. Se secuenció 780 pb, de las cuales 681 corresponden a DNA genómico de mosca. El análisis a nivel de nucleótidos muestra que la secuencia presenta 60 % de identidad en 301 pb con una proteína quinasa dependiente de calmodulina de *Drosophila*. En HK A de rata la secuencia identifica, con 70 % de identidad, cuatro regiones importantes de aproximadamente 29 aminoácidos, dos de las cuales se ubican entre sitios propuestos de unión a ATP alternativos. A nivel de aminoácidos se observó que no hay un marco de lectura definido, por lo cual la secuencia podría corresponder a

un intrón. Sin embargo, el análisis funcional y estructural realizado permiten proponer que el marco de lectura "e" podría corresponder a la hebra codificante en el DNA genómico. Esta secuencia estaría formada por un gran intrón central, un exón izquierdo de 42 o más aminoácidos y un exón derecho de 87 o más aminoácidos.

En *D. melanogaster*, el gen que codifica para *hex a-b* ha sido ubicado, en forma aproximada y mediante análisis citogenéticos, en la región citológica 8D4-E1 (DIS 62, 1985). Con el objeto de determinar la ubicación de los loci para hexoquinasas se realizó un análisis del DNA genómico de *Drosophila*, mediante el uso de cromosomas artificiales de levadura (YAC) que contienen DNA de la sección 8 del cromosoma X. Para tal efecto, se aisló DNA cromosómico intacto de siete clones YAC de *S. cerevisiae*, el cual fue resuelto mediante electroforesis de campo pulsado en geles de agarosa y analizado por hibridación con DNA del plásmido pBR322 y DNA del fragmento de 0,6 kb de *Drosophila* amplificado con la mezcla II. Los resultados de estos experimentos permitieron concluir que la sonda homóloga de 0,6 kb hibrida con el YAC II, lo cual coincide con la cobertura de este clon en la región citogenética esperada. Estos resultados, y los obtenidos con la mezcla II de partidores, nos permitirán en un futuro cercano, ampliar los datos de secuencia y analizar en detalle la región exacta de los genes que codifican para hexoquinasas en esta especie.

ABSTRACT

The variation in the pattern of isozymes of hexokinase is encoded by a single Mendelian locus in some kinds of insects and for multiple loci in others. However, in Diptera, judging only by electrophoretic patterns, existing data suggest that as a rule multiple loci code for these isozymes. The scarce data published up to now on the genetics of the loci for hexokinases in *Drosophila melanogaster* have only provided some information about the location of these genes. In this species the structural gene for *hex a* and *hex b* has been located in chromosome I (X) and the gene that codes for *hex c* in chromosome II.

The biochemical, genetic and immunological characterization of the multiple forms of hexokinases has inferred that in *D. melanogaster* at least two genes code for these enzymes. One of these gives rise to Hex A protein and, through post-transcriptional or post-translational modification, or both, to Hex B. These same data indicate that Hex C is coded by a structurally different unlinked gene.

These observations have not been demonstrated, and there is no evidence at the molecular genetic level that supports them. Moreover, it is possible that close linkage between two genes prevents recombination and thus their detection as independent entities. If this were the case for the genes *hex a* y *hex b*, there would be more than two loci that code for this enzyme in the DNA of *Drosophila*.

In this thesis some experimental strategies were developed to elucidate the structural organization of the loci that codes for hexokinases in this Dipteran.

An hybridization analysis of the genomic DNA of *D. melanogaster*, using heterologous cDNA probes from rat and yeast that code for hexokinases A, B, C and D was performed. The rat probes, that codes for hexokinases A, B and D, gave hybridization signals with the genomic DNA of the fly. On the other hand, the yeast probes, that code for hexokinases PI and PII, revealed bands of hybridization with the genomic DNA of *Drosophila*, although they were notably weaker than the signals

obtained with the rat probes. The restriction analysis, using hexokinase B as the probe, allowed us to build tentative heterologous maps of the region that contains the locus or loci of hexokinase genes, which encompasses approximately 6,5 to 9 kb or more.

The following strategy developed consisted in designing specific primers for hexokinases, from multiple sequence alignments of cDNA of hexokinases A of mammals (rat, bovine and human). Four primers were obtained from three conserved regions of the gene. The binding of these primers in three different mixtures, designated MI, MII and MIII, amplified fragments of approximately 0.47-0.67 and 1.14 kb, using cDNA of rat hexokinase A as the template. The size of the fragment synthesized by mixture III corresponded to the sum of the fragments synthesized by mixtures I and II.

The hybridization analysis of these PCR products, using the cDNA probe of 3.6 kb that codes for rat hexokinase, demonstrated that the three larger fragments amplified by mixture I and the 0.67 kb fragment amplified by mixture II are recognized by the probe. The 0.67 kb fragment was cloned in the *HincII* site of the Bluescript SK⁻ plasmid vector and sequenced from both ends. A 780 bp region was obtained with 681 bp corresponding to genomic DNA of fly. Analysis of the nucleotide sequence showed 60 % identity in 301 bp with a protein kinase depending of *Drosophila* calmodulin. The nucleotide sequence E1.4-T7/SK identifies, with 70 % of identity, four important regions of 29 amino acids, two of which are localized between alternative ATP binding sites. To the amino acid level neither complete reading frame was observed. This suggest that the E1.4 T7/SK sequence would be a intronic sequence. However, the functional and structural analysis carried out allow us to suggest that "e" frame could be the coding strand in the genomic DNA. This sequence would be constituted by a large central intronic region, a left exon encoding at least 42 amino acid region and a right exon coding for 87 amino acids or larger.

In *D. melanogaster*, the gene that codes for *hex a-b* has been approximately located approximately by cytogenetic analysis in the locus 8D4-E1 (DIS 62, 1985). In order to determine the location of the hexokinase loci, the genomic of *Drosophila* DNA was analyzed using the yeast artificial chromosomes (YAC) that contained DNA of section 8 from X chromosome. Intact chromosomal DNA of seven YAC clones of *S.*

cerevisiae was isolated and resolved through pulsed-field agarose electrophoresis, and analyzed by hybridization with DNA of the pBR322 plasmid and the 0.66 kb *Drosophila* DNA fragment amplified with the mixture II. The results of these experiments showed that the homologous probe of 0,6 kb hybridizes with YAC II, which coincides with the coverage of this clone in the expected cytogenetic region. These results, and those obtained with primer mixture II, in the near future will allow us to complete the sequence data and to analyze in detail the exact region of the genes that code for hexokinases in this species.

INTRODUCCION

ISOENZIMAS : CONCEPTO Y SIGNIFICADO BIOLÓGICO.

El concepto de isoenzimas fue primero presentado hace 37 años por Markert y Moller para designar la existencia de formas moleculares múltiples de una enzima, en una misma célula u organismo, que catalizan esencialmente la misma reacción (Markert y Moller, 1959). En otros términos, las isoenzimas son enzimas que catalizan la misma reacción bioquímica, pero difieren en especificidad de tejido, regulación durante el desarrollo, movilidad electroforética, o propiedades bioquímicas. Se sabe que un gran número de enzimas existen en formas moleculares múltiples, tales como : lactato deshidrogenasas, aldolasas, alcohol deshidrogenasas, anhidrasas carbónica, amilasas, hexoquinasas, etc (Latner y Skilller, 1968).

El concepto de isoenzimas establece el hecho básico que los organismos han desarrollado patrones metabólicos complejos que requieren moléculas proteicas diferentes para la catálisis de la misma reacción bioquímica, cuyo propósito último es aumentar la adaptación biológica. Las isoenzimas hacen posible una respuesta más sensible y precisa a los desafíos metabólicos y por lo tanto son preservadas durante la evolución, mientras que la selección natural remueve aquellas que son letales (Rattazzi *et al*, 1983).

Las isoenzimas jugarían un papel importante en la regulación del metabolismo. Se ha propuesto que éstas formarían parte de complejos poli-isoenzimáticos que catalizan reacciones secuenciales, unidireccionales, o vías metabólicas (Ureta, 1978 y 1985., Ureta *et al*, 1987). Las distintas isoenzimas que forman un sistema isoenzimático determinado difieren en algunas propiedades bioquímicas como : afinidad y especificidad por sustratos o cofactores, respuesta a efectores alostéricos, localización subcelular, respuesta a

tratamientos hormonales, dietarios, o ambos, o bien poseen un patrón diferencial durante el desarrollo. Tales características permitirían que las diferentes formas de una enzima (isoenzimas) formaran el producto final de una manera distinta, que se ajusta a los requerimientos impuestos por la célula en ese momento (Ureta, 1978).

Por otra parte, las isoenzimas son herramientas poderosas para estudiar otros mecanismos fundamentales, tales como la regulación de la expresión y transmisión génica, evolución molecular, genética del desarrollo y procesos patológicos (Brewer *et al*, 1979., Rattazzi *et al*, 1983).

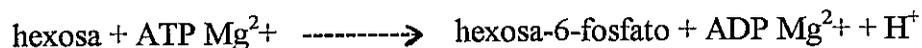
BASES MOLECULARES DE LA MULTIPLICIDAD ISOENZIMÁTICA.

Las isoenzimas pueden ser producidas por mecanismos que actúan a niveles genéticos y epigenéticos. Todas las isoenzimas que son producidas como resultado de fenómenos genéticos son llamadas isoenzimas verdaderas (Rattazzi *et al*, 1983). A nivel genético, pueden ser producidas como resultado de la expresión de genes estructurales múltiples (genes duplicados) que codifican isoenzimas diferentes (Masters *et al*, 1975). O bien, podrían corresponder a aloenzimas, es decir, formas distintas de una enzima codificadas por alelos diferentes en un locus simple (Richardson *et al*, 1986).

En contraste a las isoenzimas verdaderas, las formas moleculares múltiples de una enzima generadas a nivel epigenético involucran fenómenos bioquímicos. Estos pueden actuar a nivel post-trancricional sobre el mRNA del gen o a nivel post-traducciona sobre un producto génico simple. Dentro de las modificaciones post-tranccripcionales se puede mencionar el procesamiento del mRNA (Hayzer *et al*, 1990., Li *et al*, 1990). Por otra parte, la variación epigenética a nivel post-traducciona puede ser producida por la unión de moléculas pequeñas tales como carbohidratos, por agregación molecular incluyendo formación de derivados, desaminación, alteración en el contenido de carbohidratos, oxidación o reducción de grupos sulfidrilos, alteración en el número de ligandos unidos no covalentemente, acetilación y remoción proteolítica de fragmentos, etc (Rattazzi *et al*, 1983., Richardson *et al*, 1986).

SISTEMA ISOENZIMÁTICO DE HEXOQUINASAS EN VERTEBRADOS.

Las hexoquinasas (HK) son enzimas relativamente inespecíficas que catalizan la conversión de hexosas a hexosas-6-fosfato, según la reacción (Wilson, 1985) :



La fosforilación de glucosa, en los tejidos de vertebrados superiores, es catalizada por un sistema isoenzimático compuesto por un mínimo de dos y un máximo de cuatro hexoquinasas, denominadas A, B, C y D de acuerdo a su perfil de elución cromatográfica o tipos I, II, III y IV según su movilidad electroforética (Ureta, 1975).

Las hexoquinasas pueden distinguirse unas de otras por sus propiedades cinéticas, especificidad de sustrato, distribución de tejido, conducta durante el desarrollo y regulación dietaria y hormonal. Las hexoquinasas A, B y C son isoenzimas de baja K_m para glucosa (entre 10^{-4} y 10^{-6} M), mientras que la isoenzima D (también llamada glucoquinasa) exhibe un alto valor de K_m para dicho azúcar (10^{-2} M). La hexoquinasa C es inhibida por exceso de glucosa. El producto de la reacción, glucosa-6-fosfato, es inhibidor de las isoenzimas A, B y C, probablemente por interacción con un sitio alostérico, pero no ejerce este efecto inhibitorio en hexoquinasa D (Ureta, 1976., Ureta *et al*, 1979 a).

Se ha observado que la isoenzima D está restringida a los hepatocitos y células β del páncreas. La isoenzima A predomina en cerebro, riñón y testículo. La isoenzima B es la forma predominante en el tejido adiposo, músculo cardíaco y esquelético, mientras que la isoenzima C se encuentra en bajas cantidades en numerosos tejidos (Ureta, 1975., Wilson, 1985).

EVOLUCIÓN MOLECULAR DE LAS HEXOQUINASAS.

Una revisión de los tamaños moleculares de las hexoquinasas, en diferentes taxones, indica que algunas enzimas bacterianas presentan una masa relativa de subunidad de aproximadamente 24 kDa. Las hexoquinasas de hongos e invertebrados son, en su mayoría, monómeros de 50 kDa y las hexoquinasas de vertebrados tienen un tamaño

molecular de 100 kDa, con la excepción de la isoenzima D presente en el hígado (50 kDa). Estas observaciones ponen de manifiesto la interesante serie de 25-50-100 kDa, la cual permitió postular que las hexoquinasa de los organismos actuales derivan de un gen ancestral que especificaba una proteína de aproximadamente 25 kDa, la cual está aún presente en algunas bacterias. Este gen se habría duplicado y fusionado originando un nuevo gen de hexoquinasa de 50 kDa, el cual aún se mantiene en hongos y otros invertebrados. Un evento posterior de duplicación y fusión habría producido un gen que codifica la actual proteína de 100 kDa presente en la mayoría de los vertebrados. Finalmente, otros eventos de duplicación habrían originado las isoenzimas A, B y C (Colowick, 1973., Ureta *et al*, 1979 b., Ureta, 1982., Ureta *et al*, 1987 b).

La existencia de una hexoquinasa de 50 kDa en el hígado de algunos vertebrados (isoenzima D) puede ser explicada de dos formas. Primero, esta enzima puede ser un relicto de un gen que escapó al segundo evento de duplicación-fusión. Segundo, el gen para hexoquinasa D pudo haberse originado como consecuencia de la división de un gen que codificaba para una isoenzima de 100 kDa (Ureta *et al*, 1979 a y b., Ureta *et al*, 1987 b).

Como ya se mencionó, las hexoquinasa A, B y C tienen tamaños moleculares de aproximadamente 100 kDa y son inhibidas por el producto de la reacción, glucosa-6-fosfato. En contraste, hexoquinasa D presenta un tamaño molecular de 50 kDa y es insensible a la inhibición por el producto. En ambas propiedades, hexoquinasa D o glucoquinasa se parece a las hexoquinasa de levadura.

Por otro lado, la levadura, *S. cerevisiae*, contiene las isoenzimas de hexoquinasa A (HXK1 ó PI), B (HXK2 ó PII) y glucoquinasa (GLK), la cual muestra una marcada preferencia por glucosa como sustrato. Las tres enzimas son insensibles a la inhibición por concentraciones fisiológicamente relevantes de glucosa-6-fosfato y tienen tamaños moleculares de aproximadamente 50 kDa. Estas observaciones condujeron a postular que las hexoquinasa de mamíferos de 100 kDa evolucionaron por duplicación y fusión de un gen que codificaba una hexoquinasa ancestral similar a la enzima de levadura (Colowick, 1973., Ureta, 1982). En esta visión, uno de los sitios catalíticos duplicados (el sitio

ubicado en la mitad amino terminal de la enzima de 100 kDa) mutó para adquirir una función regulatoria, obteniéndose como resultado un sitio alostérico para la unión de glucosa-6-fosfato y por consiguiente una enzima sensible a la inhibición por el producto de la reacción.

El esquema evolutivo de duplicación-fusión propuesto, y que daría origen a las isoenzimas de 100 kDa, permite predecir que debería existir repetición interna dentro de la secuencia de aminoácidos de estas proteínas. Más aún, las secuencias de las mitades amino y carboxilo terminales deberían ser similares una con otra, y también con las secuencias de levadura de 50 kDa (Wilson, 1995). Al respecto, se han clonado los cDNA que codifican para hexoquinasa I humana, ratón, rata y bovino; los cDNA para hexoquinasa II humana y de rata, hexoquinasa III de rata y hexoquinasa IV humana y de rata. Además, se han clonado algunos cDNA's que codifican hexoquinasas de 50 kDa de varios eucariontes como hexoquinasas A, B y glucoquinasa de *S. cerevisiae*; hexoquinasa de *K. lactis*; *S. mansoni* y *P. falciparum*. La comparación de secuencias de aminoácidos de estas isoenzimas entre sí ha demostrado que existe notable similitud entre todas ellas, entre las mitades carboxilo y amino de las enzimas de mamíferos de 100 kDa (40-95 % de identidad) y entre las hexoquinasas de mamíferos y las de levadura (27-36 % de identidad) (Fothergill-Gilmore *et al*, 1993., Wilson, 1995).

Otra predicción implícita en el modelo propuesto por Colowick es que si la sensibilidad a inhibición por glucosa-6-fosfato surgió por mutación del sitio catalítico duplicado, entonces las funciones regulatorias y catalíticas deberían estar asociadas con mitades discretas de las hexoquinasas de 100 kDa. Además, las hexoquinasas de 50 kDa no deberían ser inhibidas por glucosa-6-fosfato. Hay evidencia que sostiene la primera parte de la predicción, sin embargo, se ha observado la existencia de hexoquinasas de 50 kDa que tienen la propiedad de ser inhibidas por glucosa-6-fosfato, como las hexoquinasas de estrella de mar (*S. mansoni*) y gusano de seda (*B. morix*). En atención a lo anterior, se ha modificado un poco el esquema evolutivo antes planteado, proponiéndose que la sensibilidad de las isoenzimas al producto de la reacción podría haber surgido antes del evento de duplicación-fusión (Wilson, 1985 y 1995). Un dato

adicional que reafirma la visión anterior corresponde a un trabajo realizado por Wilson, en el cual se encontró que la mitad carboxilo terminal de la molécula, que porta la función catalítica, es además sensible a la inhibición por glucosa-6-fosfato. Nuevamente, implícito en este hallazgo, está el hecho que la forma ancestral, más proximalmente relacionada a las hexoquinasas de mamíferos, no fue una enzima tipo levaduras, ya que ésta es insensible al producto de la reacción (White *et al*, 1989).

ORGANIZACIÓN FUNCIONAL DE LAS HEXOQUINASAS DE MAMÍFEROS.

En cuanto a las relaciones de estructura y función, a través de varios estudios, se ha demostrado que la digestión trípica controlada de hexoquinasa A de cerebro de rata resulta en división de la enzima de 98 kDa en tres fragmentos principales que tienen tamaños moleculares de 10, 50 y 40 kDa (desde amino a carboxilo terminal) (Polakis *et al*, 1984). El fragmento más pequeño, de 10 kDa, amino terminal, sería crítico para la interacción de la enzima con la mitocondria. Por otra parte, la asociación de la función catalítica con la mitad carboxilo terminal de la enzima se realizó mediante experimentos de marcaje de afinidad. Usando el análogo de ATP, 8-azido-ATP, se observó que la marca de afinidad estaba asociada con el fragmento trípico de 40 kDa, lo cual indicaba que el sitio de unión a ATP estaba localizado en la mitad carboxilo terminal de la molécula. Similares experimentos, usando N-(bromoacetil)-D-glucosamina, como análogo de glucosa, mostraron que el fragmento de 40 kDa era marcado específicamente por éste, de tal forma que el sitio de unión a glucosa también se localiza en dicho fragmento. Así, los sitios de unión a ambos sustratos, ATP y glucosa, y por lo tanto la función catalítica, residen en la mitad carboxilo terminal de la molécula (Wilson, 1995). Estos resultados han sido apoyados por experimentos de digestión trípica en la isoenzima B de rata (Okazaki *et al*, 1992), y por experimentos de mutagénesis sitio dirigida realizados en hexoquinasa A del mismo organismo (Bajjal *et al*, 1992) y hexoquinasa A de ratón (Arora *et al*, 1991, 1992 y 1993).

Para corroborar la asociación de la función regulatoria con la mitad amino terminal de la enzima, se usó una estrategia diferente a la anterior, basada en la

observación de que los dominios de unión a ciertos ligandos son estabilizados y protegidos de agentes desnaturantes por la propia unión de los ligandos (Wilson, 1995). Se observó que en presencia de bajas concentraciones de un agente desnaturante (cloruro de guanidina) la isoenzima A de rata era altamente susceptible a digestión trípica, sin embargo, la adición de glucosa-6-fosfato, durante la digestión, protegió selectivamente el fragmento de 50 kDa que corresponde a la mitad amino terminal de la enzima. Estos resultados condujeron a la conclusión que el sitio regulatorio, al cual se une glucosa-6-fosfato, estaba localizado en la mitad amino terminal de la hexoquinasa A de rata (White *et al.* 1987; Wilson, 1985 y 1995).

HEXOQUINASAS DE *DROSOPHÍLIDOS*.

En los insectos, en general, la variación en el patrón de isoenzimas de hexoquinasas parece estar codificada por un locus simple en algunas especies y por loci múltiples en otras. Todos los representantes del orden Lepidóptera e Himenóptera estudiados tienen hexoquinasas codificadas por un locus simple. Los insectos del orden Grillóptera y Ortóptera parecen tener dos loci para hexoquinasas, a diferencia de la mayoría de los Dípteros quienes tienen hexoquinasas codificadas en un mínimo de tres loci (Tabachnick *et al.*, 1982).

De hecho, en *D. melanogaster*, se han descrito tres bandas principales de actividad hexoquinasa, además de otras dos bandas que presentan variación ontogenética y de tejido. Una de ellas se ha denominado Hex-1 y está presente en larvas, pupas y adultos de ambos sexos hasta los dos días de edad, momento en que disminuye su actividad en las hembras y aumenta en los machos. Esta banda correspondería a una hexoquinasa localizada en la glándula accesoria. La otra banda, denominada Hex-t es específica de testículo en la etapa de pupa y adultos, ya que las larvas no muestran esta actividad (Murray *et al.*, 1967).

Por otra parte, en la especie *Drosophila robusta* se han descrito 4 loci para hexoquinasas denominados *hex-1* a *hex-4*, de los cuales *hex-1* y *hex-3* segregan en las poblaciones como loci con dos alelos de herencia codominante. En esta especie, Hex-4 es

la isoenzima que está asociada con el sexo macho y se ubica específicamente en testículo (Knutsen *et al*, 1969). De la misma forma, *Drosophila prosaltans* y *Drosophila willistoni* presentan un patrón de isoenzimas muy similar al de *D. robusta*, excepto por pequeñas diferencias en las tasas de migración de algunas bandas (Knutsen *et al*, 1969).

En *Drosophila pseudoobscura*, *Drosophila persimilis* y *Drosophila miranda* se han descrito al menos siete bandas de actividad hexoquinasa, pero sólo dos de ellas presentan variación genética, lo cual permitió localizar dichos genes mediante recombinación. El gen *hex-1*, con 5 alelos en total en las tres especies, se localiza en el cromosoma III y *hex.2*, con dos alelos, se ubica en el cromosoma I(X). Las otras isoenzimas son aparentemente monomórficas y por lo tanto no se conoce su ubicación cromosómica (Prakash 1977a y b., Beckenbach *et al*, 1977).

El número de isoenzimas del sistema parece depender de la especie estudiada, aunque la escasa literatura al respecto coincide en que *D. melanogaster* tiene 3 isoformas principales, las cuales pueden presentar variación alélica adicional (Jelnes, 1971., Madhavan *et al*, 1972., Moser *et al*, 1980). Dicha variación, revelada por técnicas electroforéticas, permitió identificar tres bandas de actividad hexoquinasa en los geles, las cuales fueron designadas como Hex A, Hex B y Hex C (equivalentes a Hex-1, Hex-2 y Hex-3). Las hexoquinasas B y C presentan los alelos *hex.b1- hex b2* y *hex c1- hex c2* respectivamente. *Hex a* no presenta variantes electroforéticas o alelos. Se describe además una cuarta banda de actividad específica de los testículos y que debería corresponder a Hex-t (Murray y Ball, 1967; Madhavan *et al*, 1972; Moser *et al*, 1980).

El estudio de la distribución de tejido de estas isoenzimas en larvas, reveló que Hex B tiene una amplia distribución, encontrándose en glándula salival, cuerpo graso, estómago medio, túbulos de Malpighi, discos imaginales, cerebro y ganglio ventral, testículo, músculo de cuerpo, epidermis y cutícula. Hex C está restringida al cuerpo graso de la larva y Hex A se expresa sólo en discos imaginales y estómago medio. Hex-t no está presente en este estadio de la mosca. En la etapa adulta, Hex B y C se distribuyen ampliamente en varios tejidos, pero Hex A es prominente sólo en músculo torácico dorsal

y glándula accesoria. Hex-t es específica de testículo en los machos adultos (Murray *et al*, 1967., Madhavan *et al*, 1972., Moser *et al*, 1980).

El análisis ontogenético muestra que Hex B es activa en todas las etapas, ya sea huevo, larva, pupa y adulto, al igual que Hex C, que sólo está ausente en la etapa de huevo. Hex A y Hex-t aparecen tardíamente, aproximadamente 198 horas después de la postura de huevos, aumentando posteriormente su actividad (Murray y Ball, 1967., Madhavan *et al*, 1972., Jelnes, 1971).

Se encontró que las hexoquinazas de *Drosophila* son monómeros de tamaños moleculares similares : Hex A 47 kDa, Hex B2 48 kDa y Hex C2 42 kDa (Moser *et al*, 1980). Esto, aproximadamente, concuerda con el valor esperado de 50 kDa para las hexoquinazas de invertebrados (Ureta *et al*, 1987).

Las tres isoenzimas son activas con glucosa como sustrato, pero Hex B parece ser la banda más activa en presencia de este azúcar. Hex A se tiñe intensamente cuando se usa manosa como sustrato y Hex C es más activa cuando en el medio existe fructosa, por lo cual se ha designado como una fructoquinasa (Jelnes, 1971., Madhavan *et al*, 1972., Moser *et al*, 1980).

Los escasos datos, hasta ahora publicados, sobre la genética de los loci para hexoquinazas en *Drosophila* han permitido obtener información un tanto escueta acerca de la ubicación de estos genes. Un trabajo inicial que hizo uso de la técnica de aneuploidía segmental logró demostrar la existencia de dos regiones específicas que, cuando eran hechas segmentalmente trisómicas, mostraban un aumento, estadísticamente significativo, en la actividad hexoquinasa. La primera región descrita se localizó sobre el cromosoma II e incluía las bandas politénicas 50C-52F, segmento que comprende el locus determinado para fructoquinasa Hex C (Jelnes, 1971). La segunda región fue ubicada en el cromosoma IV y se pensó que podría codificar una segunda hexoquinasa específica de fructosa o bien un elemento regulatorio que influenciaba la expresión del gen del cromosoma II o la actividad de su producto (Baumann y Bischoff, 1976).

Posteriormente, el gen estructural de *hex a* y *hex b* fue localizado en el cromosoma I (X) de *D. melanogaster*, a 29,2 u.m. a la izquierda de 9B1, en las bandas

politénicas 8D4-E1 (Voelker *et al*, 1978). El gen que codifica para *Hex C* se encuentra sobre el segundo cromosoma a 74,5 u.m. a la derecha del marcador L^2 , y como ya se mencionó codifica una fructoquinasa (Jelnes, 1971., Mukai *et al*, 1977).

Por otra parte, con métodos bioquímicos, se ha demostrado identidad inmunológica entre Hex A, Hex B1 y Hex B2 como también entre Hex C1 y Hex C2. Se observó ausencia de reactividad cruzada entre Hex A y Hex C2 o entre Hex C1 y Hex C2 y Hex A. La caracterización inmunológica de las diferentes hexoquinasa de *Drosophila* sugiere que Hex A está más estrechamente relacionada a Hex B1 y B2 que a Hex C1 y C2. Se ha propuesto que Hex A y Hex B se originarían a partir de un gen estructural simple y que B1 y B2 serían modificaciones epigenéticas, ya sea post-transcripcionales o post-traduccionales de este único gen. *Hex C* correspondería a un gen estructural diferente al de Hex A y Hex B y la naturaleza de la variación entre *Hex C1* y *Hex C2* sería estrictamente alélica (Moser *et al*, 1980).

Por otra parte, existe la posibilidad que la localización cercana entre los genes *hex a* y *hex b* (ya que se ubican en el mismo sitio) impida la recombinación entre ambos y su identificación como entidades independientes. Si este es el caso para los genes *hex a-b*, aún es posible que existan más de dos genes estructurales que codifiquen hexoquinasa en *D. melanogaster*.

APROXIMACION AL PROBLEMA.

El interés en dilucidar la organización estructural de los loci que codifican hexoquinasa en *D. melanogaster*, condujo a abordar el problema desde varias perspectivas.

Es así, como la primera aproximación fue purificar alguna de las isoenzimas presentes en extractos crudos de *Drosophila*, con el objetivo de obtener anticuerpos policlonales. Estos anticuerpos serían usados como sondas en la identificación de secuencias de cDNA que codifican la proteína dentro de una genoteca de expresión, construida en λ gt11. Además, como se disponía de anticuerpos policlonales, producidos en conejo contra la isoenzima A de cerebro de rata, se intentaría purificar aquellos anticuerpos que

reaccionaban cruzadamente con las isoenzimas de mosca. Ambas aproximaciones, tanto el proceso de purificación de isoenzimas como el de anticuerpos, no rindieron finalmente los resultados esperados y se decidió no invertir más esfuerzo y tiempo en ello, debido a que representaban una mera herramienta de ayuda para conseguir el objetivo central del trabajo.

Por otra parte, la mayor parte del conocimiento acerca de la evolución de hexoquinasas en general, provienen de estudios en levadura y varios vertebrados superiores. La acumulación y análisis de este conocimiento permitió establecer que las hexoquinasas son una familia de enzimas que tiene una tasa de sustituciones de aminoácidos relativamente lenta y por esta razón los genes que codifican estas isoenzimas en organismos tan diversos como hongos y mamíferos son altamente conservados. Utilizando la información de secuencias disponibles planteamos la posibilidad de clonar una región semejante a hexoquinasa a partir de DNA genómico de mosca, utilizando sondas heterólogas de rata y levadura. Como resultado del análisis genético molecular usando estas sondas se observó que ellas detectan señales de hibridación en DNA genómico de *D. melanogaster*. El análisis de restricción, usando como sonda hexoquinasa B, permitió construir mapas aproximados de la región que contiene los genes de hexoquinasas en la mosca, los cuales abarcan como mínimo aproximadamente 9 kb.

A partir de estos resultados, se decidió usar la sonda que codifica hexoquinasa B en el análisis de la genoteca de cDNA construida en el vector de expresión λ gt 11. Después del rastreo primario y secundario de la genoteca, se obtuvieron cuatro probables clones positivos, los cuales fueron amplificados por reacción de polimerización en cadena (PCR), usando partidores específicos para λ gt 11. Los fragmentos amplificados fueron subclonados en el plásmido Bluescript SK+/- . Sin embargo, el análisis de hibridación de los subclones con inserto, realizado con la sonda de hexoquinasa B de rata, en las mismas condiciones en que seleccionó la genoteca inicialmente, mostró que dicha sonda no reconoce el DNA de los clones. Otras pruebas, utilizando DNA amplificado de los grupos de clones aislados en el rastreo primario tampoco rindieron resultados positivos.

Posteriormente, se diseñaron y sintetizaron partidores específicos para hexoquinasas, obtenidos a partir de un alineamiento múltiple de secuencias de cDNA de hexoquinasas A de mamíferos y de las zonas más conservadas según el análisis computacional de dichas secuencias. El uso de estos partidores, debería permitir amplificar fragmentos de tamaño definido en DNA genómico total de *Drosophila*. El análisis de hibridación, empleando hexoquinasa A como sonda, reveló que algunos de los fragmentos amplificados tenían semejanzas con dicho gen. Uno de estos fragmentos se clonó en un vector de expresión y se secuenció totalmente con el objetivo de realizar un análisis comparativo de la secuencia con bancos de datos. El análisis de la secuencia muestra 60 % de identidad con una proteína quinasa dependiente de calmodulina de *D. melanogaster*. Además la secuencia tiene 64 % de identidad en 52 pb con hexoquinasas de organismos vertebrados, invertebrados y plantas. Por otra parte, la comparación de la secuencia nucleotídica con HK A de rata muestra cuatro zonas de 29 pb que tienen 70 % de identidad, dos de las cuales se localizan en regiones importantes de la molécula, cercanas a sitios propuestos de unión a ATP. El análisis a nivel de aminoácidos revela que no hay un marco de lectura definido convencionalmente, sin embargo, el estudio de tipo funcional y estructural de cada marco de lectura, mediante comparación con otras proteínas (Fasta), permite proponer que el marco de lectura "e" podría codificar un exón izquierdo de 42 o más aminoácidos, interrumpido por un gran intrón central y un exón derecho de 87 o más residuos. Mediante Fasta se determinó que el péptido 42 e es una zona que tiene 40,7-42,9 y 43,5 % de identidad, en 27-28 y 23 aminoácidos, con proteínas proto-oncogénicas de *X.laevis*, *G. Gallus* y *H. sapiens*, respectivamente, las cuales presentan actividad proteína-quinasa Ser/thr. El péptido 87 e tiene 70 % de identidad con una región de HK A de 10 aminoácidos que corresponde a un sitio propuesto de unión a ATP alternativo 2.

Otra aproximación al problema del análisis molecular del locus *Hex* en *Drosophila*, hizo uso del recientemente emprendido proyecto de clonamiento, ubicación cromosómica y secuenciación del genoma de *Drosophila* (Merriam *et al*, 1991., Kafatos *et al*, 1991., Hartl *et al*, 1992). Actualmente, se dispone, entre otros, de un mapa físico

ensamblado con clones genómicos provenientes de genotecas construidas en cromosomas artificiales de levadura (YAC) (Ajioka *et al*, 1991., Cai *et al*, 1994). Como ya se conocía la ubicación citogenética aproximada de los genes *Hex A-B* en la región 8D4-E1 (DIS 62, 1985) se decidió obtener los vectores YAC que cubrían dicha región, la cual debería contener el locus *Hex*. Utilizando como sonda el fragmento de 0,67 Kb de *Drosophila*, se logró determinar que el YAC II contiene la secuencia de interés, ya que la sonda empleada en el análisis hibrida con este clon. Coincidentemente, la región cubierta por este YAC corresponde a 8C13-14 ; D10-11 de la sección 8 del cromosoma (I) X de *Drosophila*.

En resumen, en este trabajo se han planteado y desarrollado varias estrategias para conseguir los objetivos propuestos. El problema se abordó desde el punto de vista bioquímico, inmunológico y finalmente desde el punto de vista de la genética molecular. Esta última aproximación permitió clonar una secuencia pequeña de *D. melanogaster* que, a través de análisis de hibridación, muestra similitud con HK A de rata. Se logró, además, identificar un clon YAC como posible portador del locus *Hex*. Ambas herramientas podrían conducir finalmente a dilucidar la organización estructural detallada y evolución molecular de los loci que codifican hexoquinasas en este organismo.

PROPÓSITO DE LA TESIS

Los datos bioquímicos, genéticos e inmunológicos existentes indican que en *Drosophila melanogaster* existen al menos dos genes estructurales que codifican para hexoquinasas. *hex c* se ubicaría en el cromosoma II y *hex a - hex b* se encontrarían en el cromosoma I (X) ocupando un mismo locus. Así, una de estas isoenzimas sería una epienzima producida por modificación del producto génico originado por el locus único. Hasta el momento no existe evidencia genético-molecular que demuestre la existencia de sólo dos, o más, genes estructurales de hexoquinasas en *D. melanogaster*. De lo anterior se deduce que el **OBJETIVO GENERAL** de este trabajo es:

“Conocer la organización estructural de los loci que codifican hexoquinasas en *D. melanogaster*, mediante la aplicación de una serie de aproximaciones experimentales tendientes a obtener finalmente el clonamiento del o de los genes de la enzima”.

Para ello, se han planteado las siguientes **HIPÓTESIS DE TRABAJO**:

HIPÓTESIS NULA. Los escasos datos genéticos, bioquímicos e inmunológicos permiten postular la existencia de sólo dos genes estructurales de hexoquinasas en *D. melanogaster*. Uno de estos genes daría origen a Hex A y mediante modificación post-transcripcional, post-traducciona, o ambas, a Hex B. El otro gen sería responsable de la producción de Hex C.

HIPÓTESIS ALTERNATIVA. Existe la posibilidad que la cercana localización entre dos genes impida la recombinación entre ambos y su identificación como entidades independientes. Si este es el caso para los genes *hex a* y *hex b*, entonces NO existen solamente dos genes estructurales que codifican las tres isoenzimas.

Actualmente, existe mucha información acerca de las isoenzimas de hexoquinasas en una gran variedad de organismos. La acumulación de datos con respecto a las relaciones de estructura-función, propiedades bioquímicas y comparación de secuencias han permitido establecer la naturaleza altamente conservada de los genes que codifican esta proteína, a nivel de nucleótidos y aminoácidos, en seres vivos tan diversos como levaduras (hongos) y ratas (mamíferos). Basados en este hecho demostrado, se pretende conocer un poco más acerca de las hexoquinasas en organismos inferiores ya que, hasta la fecha, sólo se ha clonado el gen en un número muy reducido de invertebrados que son filogenéticamente distantes de *Drosophila*. Por lo tanto, sería factible aislar el o los genes que codifican hexoquinasas en *D. melanogaster*, mediante el uso de sondas o partidores (o ambos) heterólogos del gen.

Para llevar a cabo este trabajo se proponen los siguientes **OBJETIVOS ESPECÍFICOS** :

- Caracterizar bioquímicamente las hexoquinasas de *D. melanogaster* (cepa Oregón-R) en cuanto a patrón isoenzimático y reactividad inmunológica cruzada con anticuerpos heterólogos de rata producidos contra hexoquinasa A.
- Purificar parcialmente las hexoquinasas de la cepa Oregón-R de *D. melanogaster*, mediante cromatografía de intercambio iónico y afinidad.
- Determinar si las sondas heterólogas de rata y levadura disponibles detectan señal de hibridación en el DNA genómico de *Drosophila*, mediante análisis de hibridación.
- Determinar el tamaño de la zona que contiene los genes para hexoquinasas en *D. melanogaster* y su posible organización, mediante el uso de sondas heterólogas.
- Amplificar y clonar secuencias del DNA genómico de *D. melanogaster* semejantes a hexoquinasas, usando partidores específicos de hexoquinasas obtenidos a partir de secuencias heterólogas conservadas del gen de hexoquinasa A de mamíferos.
- Realizar un análisis de hibridación de DNA genómico de la sección 8 del cromosoma I (X) de *D. melanogaster*, mediante el uso de clones YAC e hibridación con sondas heterólogas u homólogas adecuadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. MATERIALES

1.- Material Biológico.

- 1.1 **Cepas de *Drosophila*.** En este trabajo se utilizaron las siguientes cepas : Oregón-R de la especie *Drosophila melanogaster*. Además, las especies chilenas *Drosophila pavani* y *Drosophila gaucha*. Estos ejemplares fueron obsequiados gentilmente por el Dr. Danko Brncic de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.
- 1.2 **Ejemplares de rata.** Para aislar ácidos nucleicos y preparar extractos crudos se emplearon ejemplares de la especie *Rattus norvegicus* tipo Sprague-Dawley, que se adquirieron en el Instituto de Salud Pública de Chile.
- 1.3 **Bacterias.** La cepa DH5 α de *Escherichia coli* fue utilizada en todos los experimentos de transformación realizados para obtener DNA plasmidial.
- 1.4 **Levaduras.** La cepa 288 de *Saccharomyces cerevisiae* se usó para obtención de DNA. La cepa AB 1380 se utilizó en el análisis de los clones YAC.
- 1.5 **Enzimas.** Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *Leuconostoc mesenteroides*, Novozima 234, lisozima, ribonucleasa A, desoxiribonucleasa I, Zymoliasa 100 T y proteinasa K se obtuvieron de Sigma Chemical Co. St. Louis U.S.A. Las endonucleasas de restricción y las enzimas DNA ligasa del bacteriófago T4 y DNA polimerasa de *Thermus aquaticus* se obtuvieron de Bethesda Research Laboratories Inc. U.S.A.
- 1.6 **Anticuerpos.** Los anticuerpos monoclonales 2B, 3C, 5A, 13, 20 y 21 fueron gentilmente proporcionados por el Dr. John Wilson de la Universidad de Michigan, U.S.A. El anticuerpo policlonal, producido en conejo, contra la isoenzima A de cerebro de rata fue obtenido del Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

1.7 **Acidos Desoxirribonucleicos.** DNA del bacteriófago λ digerido con la enzima *HindIII* fue obtenido de Bio Labs. Inc. U.S.A. DNA de espermio de salmón tipo III se obtuvo de Sigma Chemical Co. St. Louis, U.S.A.

A continuación se muestra una lista con las características más relevantes de los plásmidos disponibles que portan secuencias de cDNAs que codifican las isoenzimas de hexoquinasa (HK) A, B y C de rata los que fueron gentilmente proporcionados por el Dr. J. Wilson de la Universidad Michigan, U.S.A. (Schwab y Wilson, 1988, 1989 y 1991, Thelen y Wilson, 1991). Los plásmidos que contienen secuencias de cDNA que codifican la isoenzima D de rata fueron obsequiados por el Dr. Patrick Iynedjian de la Universidad de Ginebra, Suiza (Iynedjian et al, 1987, Hayzer e Iynedjian, 1990) y finalmente los plásmidos que contienen secuencias de cDNA que codifican las isoenzimas de levadura fueron proporcionados por el Dr. Karl-Dieter Entian de la Universidad de Frankfurt, Alemania (Fröhlich et al, 1985):

Nombre y tamaño del plásmido recombinante (kb)	Secuencia codificada y nomenclatura	Nombre y tamaño del vector (kb)	Sitio de clonado y tamaño del inserto (kb)
p18-1.4-7 6,3	HK A ó HK I de cerebro	pUC18 2,7	<i>EcoRI</i> 3,6
pHK II(3.6) 6,3	HK B ó HK II de músculo	pUC18 2,7	<i>EcoRI</i> 3,6
pL4.1-h 5,2	85% HK C ó HK III de hígado	pUC 18 2,7	<i>EcoRI</i> 2,5
p12.1-III 3,2	15% HK C ó HK III de hígado	pUC 18 2,7	<i>EcoRI</i> 0,52
pUC-GK1 4,5	HK D ó HK IV incompleta	pUC 13 2,7	<i>EcoRI</i> 1,8
pB -GK2 5,2	HK D ó HK IV completa	Bluescript SK+ 2,9	<i>EcoRI</i> 2,3

pUC19/HXK1	HXK1, HK PI ó HK	pUC19	<i>XbaI</i>
6,2	A de levadura	2,7	3,5
pMR124/HXK2	HXK2, HK PII ó	pBR328	<i>EcoRI</i>
8,1	HKB de levadura	4,3	3,8
YCp50/GLK1	GLK1 de levadura	YCp50	<i>HindIII</i>
11,4		8,0	3,4

Los cromosomas artificiales de levadura (YAC) que portan DNA genómico de la sección 8 del cromosoma X (I) de *D. melanogaster* fueron proporcionados por el Dr. Ian Duncan de la Universidad de Washington. La siguiente lista muestra algunas características importantes de los clones de colección elegidos (Haini *et al*, 1994):

Nombre del clon	Tamaño (kb)	Ubicación citológica en sección 8	Genoteca embrión digerido <i>NotI</i> .	Genoteca Adultas digerido* <i>EcoRI</i> .	Repeticiones	Hibridación con el cromocentro
I) DYN04-21	370	B3 ; C1	Si	No	N.D.	N.D.
II) DYE01-42	325	C13;D11	No	Si	N.D.	N.D.
III) DYR07-36	350	A1 ; C2-3	No	Si	--	--
IV) DYN28-60	260	D9 ; E4	Si	No	--	--
V) DYR16-01	210	D10 ; E9	No	Si	+	--
VI) DYR19-61	230	E1 ; F2	No	Si	+	+
VII) DYN17-61	180	E3 ; F10	Si	No	+	+

*: Digestión parcial. N.D.= No determinado. + = Presencia. -- = Ausencia.

2.- Reactivos.

De Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo. U.S.A.) se obtuvieron los siguientes reactivos : ATP, NAD, NADP, D-glucosa, glucosa-6-fosfato, Tris, acrilamida, bis-acrilamida, TEMED, persulfato de amonio, tricina, glicina, urea, beta-mercapto-etanol, ioduro de sodio, sílica, fenazina-metosulfato, azul de nitrotetrazolio, monotioglicerol, glicerol, dodecilsulfato de sodio, ficoll, DTT, BCIP, PMSF, azul de Coomassie R 250, azul de Coomassie G, seroalbúmina de bovino, IPTG, sacarosa, tetraciclina, bromuro de etidio, 8-hidroxiquinolina, ampicilina, X-gal, anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina, anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina, ATP-agarosa, Glucosamina-agarosa, Tritón X-100.

De Merck Química Chilena se obtuvieron : EDTA, hidróxido de sodio y de potasio, ácidos clorhídrico, acético y fórmico, metanol, etanol absoluto, acetona, cloroformo, alcohol isoamílico, fenol, citrato de sodio, cloruro de sodio, azul de bromofenol, ácido 5,5'-dietilbarbitúrico, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, tween-20, formamida, acetato de amonio y de potasio, polietilenglicol 8000 y 4000, MOPS, sulfato de magnesio, hidrolizado de caseína, aminoácidos, tolueno.

De Bio-Rad se obtuvo : Agarosa grado biología molecular, ácido bórico, dodecilsulfato de sodio, resina Dowex-1 formiato.

De Difco Laboratories, Detroit, Michigan U.S.A. se obtuvo : Triptona, Peptona, extracto de levadura, extracto de malta, agar-agar.

De A.W. & R. Balston Limited, Inglaterra : se obtuvo papel Watman # 1.

De Du Pont, Company, U.S.A se obtuvieron los siguientes nucleótidos radiactivos : α -³²P-dCTP, α -³²P-dATP y α -³⁵S-dATP.

De Amersham (Searle Illinois, U.S .A.) se obtuvieron PPO y POPOP.

De Amersham Laboratories (Buckinghamhire, Inglaterra) se obtuvo D-[¹⁴C]-glucosa.

De Whatman (Maidstone, Inglaterra) se obtuvo DEAE celulosa microgranular.

De Ciba-Geigy (Greensboro, NC. U.S.A .) se obtuvo azul de cibacron F3GA.

3.- Sistemas de purificación, marcado radiactivo y secuenciación de ácidos nucleicos.

Los siguientes sistemas fueron adquiridos de las compañías que se indican :

De Bio 101, California, U.S.A. el sistema de purificación de ácidos nucleicos GeneClean II.

De Gibco-BRL : el sistema de marcaje radiactivo de partidores al azar y el sistema de marcaje y detección con biotina "Blue gene", además de membrana de nylon.

De Amersham Life Sciences U.S.A.: El sistema de secuenciación de DNA plasmidial con "secuense" version 2.0 DNA polimerasa de T7.

De Promega : El sistema de secuenciación de DNA fmol.

II. MÉTODOS.

1.- Cultivo y mantención de organismos.

1.1 **Bacterias.** Las cepas de *Escherichia coli*, se cultivaron en medio LB (apéndice 1).

En caso que la bacteria portara plásmidos, el medio fue suplementado ya sea con ampicilina o tetraciclina a una concentración de 100 µg/ml o 20 µg/ml, respectivamente. Cuando se realizaron experimentos de transformación genética de *E. coli*, ésta fue crecida en medio ϕ (apéndice 1). En todos los casos, los cultivos bacterianos fueron incubados toda la noche a 37° C, con agitación constante. La mantención de las cepas se realizó en una mezcla de 600 µl del cultivo crecido y 400 µl de glicerol estéril al 87%, donde se mantuvieron a -70° C indefinidamente.

1.2 **Hongos.** Las cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae* se crecieron en medio YM, YEPD ó en medio YCD (apéndice 1) de acuerdo a las necesidades, durante 72 horas a 30° C y con agitación constante. Para congelar las cepas se estableció una concentración final de glicerol estéril del 20 al 30%.

1.3 **Moscas.** Las cepas y especies de moscas usadas fueron mantenidas en medio de cultivo de *Drosophila* agar-sémola (apéndice 1) y crecidas en botellas de vidrio a 25° C durante 15 a 20 días repetidamente. Una vez obtenida la masa de moscas adecuada para la purificación de enzimas o ácidos nucleicos, ellas fueron congeladas a -70° C indefinidamente, o bien, por períodos cortos a -20°C.

2.- Preparación de Extractos crudos.

2.1 **Moscas.** Los extractos crudos de *D. melanogaster*, para procedimientos de purificación, se realizaron homogeneizando entre 2 a 5 g de moscas de ambos sexos al 25% p/v en tampón Tris- HCl pH 7,5 (Tris 20 mM, 10 mM glucosa, 1 mM EDTA, 10 mM monotioglicerol, 10%glicerol), utilizando un homogeneizador de vidrio tipo Potter. La suspensión obtenida se centrifugaba en rotor SS-34 a 30.000 rpm por 1 hora, en una centrifuga Spinco, modelo L. Para retirar los restos de cuerpos, el homogeneizado completo se filtraba a través de lana de vidrio.

Para electroforesis en geles de poliacrilamida nativos y algunas determinaciones de actividad enzimática, los extractos crudos se prepararon de forma similar, excepto que se homogeneizaban moscas individuales en 50 ul de tampón Tris-HCl pH 7,5 y posteriormente se procedía a centrifugar en microcentrifuga refrigerada marca Eppendorf, modelo 5402, a 4° C y 12.000 rpm por 10 minutos, ocupándose solamente la fracción citosólica.

La preparación de extracto crudo para obtención de ácidos nucleicos se realizaba con 5 g o más de moscas, de ambos sexos, al 10% p/v, en tampón de homogeneización A (apéndice 2).

2.2 **Rata.** Se preparó extracto crudo de cerebro de rata, los cuales se descongelaron y homogeneizaron en hielo, en homogeneizador tipo Potter, al 10% p/v en una solución de sacarosa 0,25 M y se procedió según el protocolo de purificación de hexoquinasa A descrito en el punto 4.2.

Los ácidos nucleicos se purificaron a partir de extractos crudos de hígado de rata, los que eran inmediatamente homogeneizados en tampón de homogeneización A (apéndice 2) al 10% p/v, en un homogeneizador Sorvall por 15 a 20 minutos con velocidad 7 y se procedía según el protocolo de extracción de ácidos nucleicos descrito en el punto 10.3.

3.- Determinación de actividad hexoquinasa.

3.1 Determinación espectrofotométrica de la actividad hexoquinásica. La actividad fosforilante de glucosa se determinaba midiendo el cambio de absorbancia que se produce a 340 nm cuando se acoplan las reacciones de fosforilación de glucosa y deshidrogenación de glucosa-6-P (Slein *et al*, 1950). Esto permitía medir la velocidad de formación de NADPH, la que era registrada en un espectrofotómetro Gilford, modelo 2400 a 30° C. El medio de reacción para la enzima contenía : 80 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM KCl, 12,6 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 0,5 mM glucosa, 1,6 mM EDTA, 0,5 mM NADP y 0,5 U/ml de glucosa-6-P-deshidrogenasa, en un volumen final de 1 ml. La reacción se iniciaba agregando la preparación enzimática y como blanco se utilizaba un sistema sin ATP o sin glucosa. La unidad de enzima se define como la cantidad de enzima que cataliza la fosforilación de 1 μmol de glucosa en 1 minuto a 30° C, en las condiciones descritas.

3.2 Método radioisotópico para detectar actividad hexoquinásica. El procedimiento se realizaba tal como se describe en Radojkovic *et al* (1978). Un extracto crudo proveniente de la homogeneización de aproximadamente 7 moscas de un determinado sexo se hacía pasar por una pequeña columna DEAE celulosa de 2 ml, equilibrada en tampón Tris-HCl pH 7,5. La columna se lavaba con 3 ml del tampón señalado y se procedía a eluir la enzima a través de una gradiente lineal de 0 a 0,5 M KCl en el mismo tampón, colectándose fracciones de 300 μl. La actividad fosforilante de glucosa se medía en un medio que contenía : 80 mM Tris-HCl pH 7,5, 1,6 mM EDTA, 12,6 mM MgCl₂, 10 mM ATP, 0,5 mM [¹⁴C]-glucosa (radiactividad específica de 1 μCi/μmol) y 300 μl de la preparación enzimática en un volumen final de 0,5 ml. Como blanco se utilizaba un sistema de reacción similar, pero sin ATP. La mezcla de reacción se incubaba por 15 minutos a 30° C y se detenía agregando, a cada tubo de reacción, 1 ml de una solución de glucosa 100 mM, no marcada, en ácido fórmico 0,1 N. Esta mezcla completa se aplicaba a una columna (0,8 x 1 cm) empacada con resina Dowex-1 formiato (alrededor de 200 mg), la cual se lavaba cinco veces con 3 ml de ácido fórmico, para eliminar la

glucosa marcada que no reaccionaba. Finalmente, el producto de la reacción, [^{14}C]-glucosa-6-P era eluido con 2,5 ml de formiato de amonio 0,4 M pH 5,3. La determinación de radiactividad se hacía en un contador de centelleo líquido y se realizaba mezclando 0,5 ml del eluido final con 5 ml de una mezcla patrón de líquido de centelleo tolueno-PPO-POPOP y Tritón X-100 (2 :1 v/v).

- 3.3 **Determinación de actividad hexoquinásica en geles.** Se usó el método histoquímico descrito por Katzen *et al*, 1965. Se sumergía el gel en una mezcla que tenía la misma composición de la mezcla que se usaba en la medición espectrofotométrica, a la cual se agregaba 0,04 mg/ml de fenazina-metasulfato y 0,96 mg/ml de azul de nitrotetrazolio. El control se realizaba sumergiendo un duplicado del gel en la misma mezcla, pero sin ATP.

4.- Purificación de enzimas.

4.1 **Purificación parcial de hexoquinasas de *D. melanogaster* (cepa Oregón-R).**

- 4.1.1 Cromatografía en DEAE-celulosa. El líquido sobrenadante obtenido del extracto crudo centrifugado, como se indica en el punto 2.1, se hacía pasar por una columna DEAE-celulosa de 17 ml (17 x 1 cm). Después de la aplicación de la enzima, la columna se lavaba con un volumen de tampón Tris-HCl pH 7,5 igual a cinco veces el volumen de la columna. Finalmente, la enzima era eluida con KCl, mediante una gradiente lineal de 0 a 0,3 M en el mismo tampón Tris. El volumen total de la gradiente era de 290 ml y se colectaban fracciones de 2,5 ml. La actividad hexoquinasa se determinó usando alguno de los métodos antes descritos. Se seleccionaban las fracciones con mayor cantidad de actividad formando una gran fracción por cada pico. Posteriormente, cada pico se sometía a diálisis durante toda la noche en 1 litro de tampón Tris-HCl pH 7,5. El volumen obtenido después de dializar se concentraba a 2 ml, en concentradores amicon centriprep-10, por centrifugación de los mismos a 5.000 rpm en rotor Sorvall SS-34 por 20 minutos y se medía nuevamente la actividad hexoquinasa.

4.1.2 Cromatografía de afinidad. Aproximadamente 1 a 2 ml de las fracciones correspondientes al pico 1 ó 2, provenientes de la cromatografía en DEAE-celulosa, se pasaban por una columna de 2 ml (2 x 1 cm) empacada con resina (azul de cibacron-Sepharose, glucosamine-Sepharose, ATP-agarosa ó fosfoultrogel) y equilibrada con amortiguadores y pH diferentes. La columna se lavaba con 10 ml del tampón respectivo y si la proteína de interés era retenida por la columna, ésta se lavaba con 6 ml del mismo tampón, probando valores de fuerza iónica crecientes, capaces de eluir proteínas de una manera no bioespecífica. Finalmente, la enzima se eluía con 6 ml del tampón usado, más una concentración adecuada del ligando de afinidad ó pseudoafinidad (ATP, glucosamina, azul de cibacron, glucosa-6-P).

4.2.- Purificación de hexoquinasa A de cerebro de rata.

Se realizó según el protocolo descrito por Chou, *et al* 1972. Para ello, se realizaba un homogeneizado de cerebros de rata, tal como se describe en el punto 2.2, en centrífuga Sorvall con rotor SS-34 a 3.000 rpm por 20 min a 4° C. Se recuperaba el sobrenadante, el cual se sometía a centrifugación en una ultracentrífuga Beckmann con rotor 50 Ti a 20.000 rpm por 20 min a 4° C. El sedimento se resuspendía en una solución de sacarosa 0,25 M a una concentración de 10% p/v. El sedimento se lavaba dos veces más en sacarosa 0,25 M. El sedimento, proveniente del tercer lavado, se resuspendía en sacarosa 0,25 M a una concentración de 5% p/v. Para eluir la enzima, se agregaban 0,01 volúmenes de una solución 100 mM glucosa-6-P pH 7,0 (1 mM glucosa-6-P) y se incubaba a 25° C por 1 hora con agitación suave y ocasional. La suspensión se centrifugaba a 40.000 rpm en rotor Beckmann 50 Ti por 1 hora a 10° C, se recuperaba el sobrenadante y se agregaba tampón fosfato pH 7,0 (50 mM fosfato de potasio, 10 mM glucosa, 10 mM monotioglicerol, 5% glicerol). La suspensión se concentraba unas 40-50 veces, mediante concentradores Amicon y la muestra concentrada se hacía pasar por una columna DEAE-celulosa (25 x 2 cm) equilibrada con tampón fosfato de potasio pH 7,0. La columna se lavaba toda la noche con 1-2 litros del mismo tampón y la

enzima se eluía con una gradiente lineal de 0-0,3 M KCl en tampón fosfato y se colectaban fracciones de 4,8 ml. La actividad hexoquinasa se determinaba mediante el método espectrofotométrico, descrito en el punto 3.1.

5.- Electroforesis de proteínas.

- 5.1 **Electroforesis de proteínas en condiciones nativas.** Se usó el protocolo descrito especialmente para glucoquinasa hepática por Grossman *et al*, 1974. Los geles se prepararon en placas de vidrio de 12 x 12 cm, separadas por espaciadores de 0,5-1 mm de espesor. El gel concentrador contenía : 6 mM Tris-HCl pH 6,7, 0,05% TEMED, 3,1% acrilamida, 0,625% bisacrilamida 0,0005% riboflavina y 1,5 M glucosa. El gel separador contenía : 7 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,05% TEMED, 10,1% acrilamida, 0,125% bisacrilamida, 0,0005% riboflavina y 100 mM glucosa. Se cargaron aproximadamente 5-10 μ l de extracto crudo o preparación enzimática con 5 μ l de colorante de referencia (azul de bromofenol) más 50 μ l de glucosa 3 M y la electroforesis fue corrida por 10 horas a 4° C y 50 volts en tampón Barbital (apéndice 2). La detección de bandas de proteína con actividad hexoquinasa se realizó como se describe en el punto 3.3.
- 5.2 **Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalantes.** Se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida, en condiciones desnaturalantes, mediante dos procedimientos. Uno de ellos, contemplaba el uso de SDS y tampón Tricina (apéndice 2), como se describe en Schägger *et al*, 1987, lo cual permite la separación de proteínas en el rango de 1 a 100 kDa y el otro correspondía al procedimiento común descrito por Laemmli, 1970, el cual emplea tampón Tris-glicina pH 8,3 (25 mM Tris-HCl, 192 mM glicina, 0,1% SDS). Las muestras, para ambos tipos de corrida electroforética, se preparaban mezclándolas con un tampón de muestra cinco veces concentrado que contenía : 0,0625 M Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 10% glicerol, 5% 2-mercaptoetanol y 0,001% azul de bromofenol. Las proteínas se disociaban sumergiéndolas por 1-5 min a 100° C.

6.- Transferencia de proteínas a filtros de nitrocelulosa.

- 6.1 **Transferencia electroforética húmeda.** Las proteínas presentes en el gel se transferían a una membrana de nitrocelulosa, mediante un procedimiento de electrotransferencia húmeda, como se describe en Towbin *et al*, 1979, y Harlow *et al*, 1988. Para ello, el gel, sin fijar ni teñir, se ensamblaba en una especie de torre, humedecida en tampón de transferencia (Apéndice 2), y formada por los siguientes elementos, en dirección al electrodo positivo : 1 capa de esponja, 2 láminas de papel filtro, gel, membrana de nitrocelulosa, dos láminas de papel filtro, y finalmente otra capa de esponja. Este ensamblaje completo se sumergía en la cámara de transferencia con el tampón respectivo y se aplicaba un voltaje constante de 50 Volts por 10-12 horas.

Para comprobar la eficiencia del procedimiento de transferencia, el filtro de nitrocelulosa era teñido, para proteína total, con una solución de colorante Rojo de Ponceau S al 0,08% por 5 minutos. Para continuar con la inmunodetección, la membrana se desteñía totalmente por lavados exhaustivos en agua destilada y tampón TBS pH 7,4 (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl).

- 6.2 **Inmunodetección en los filtros de nitrocelulosa.** La membrana se bloqueaba en los sitios de unión no específicos, con una solución de blotto-tween (Apéndice 2) por 2 horas a temperatura ambiente y con agitación suave. Posteriormente, la membrana se lavaba tres veces con TBS por 5 minutos y se procedía a incubar 1-3 horas con el anticuerpo primario, diluido adecuadamente en una solución de BSA 3% en TBS. Se volvía a lavar la membrana, con agitación suave, cuatro veces por 5 minutos en TBS. A continuación se incubaba por 1-2 horas con el anticuerpo secundario, diluido adecuadamente en la solución mencionada y se lavaba cuatro veces más por 5 minutos con TBS. Finalmente, la unión del anticuerpo se revelaba con una solución sustrato que contenía : 0,33 mg/ml de azul de nitrotetrazolio, 0,165 mg/ml de BCIP en tampón fosfatasa alcalina pH 9,5 (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂). La reacción se detenía por la adición de una solución de EDTA 20 mM en TBS.

7.- Determinación de proteínas.

La concentración de proteínas se determinaba mediante dos procedimientos :

- 7.1 **En extractos crudos y en fracciones cromatográficas.** Se medía la absorbancia a 280 nm. Para calcular la concentración se asumió que una solución que contiene 1 mg de proteína/ml tiene una absorbancia de 1.
- 7.2 **En fracciones semipurificadas.** Se utilizaba el método de Bradford, 1976 y se usaba BSA como proteína patrón.

8.- Determinación de la concentración de sales.

La conductividad de las fracciones que contenían KCl, se determinaba usando un conductímetro Radiometer modelo CDM2f. Las concentraciones de KCl se calculaban mediante una curva de calibración.

9.- Preparación y regeneración de los materiales cromatográficos.

DEAE-celulosa. Se preparó y regeneró según el método descrito por los fabricantes.

Azul de cibacron-Sepharose. La preparación de esta resina se realizó como lo describe Preller, 1988. Se mezclaban 500 ml de suspensión de Sepharose 4B-200 con 12,5 g de azul de cibacron F3GA Ciba, disueltos en agua a 50° C y se ajustaba el volumen a 1250 ml. Se agregaban 250 g de Na₂SO₄ en varias porciones, durante 45 minutos, manteniendo la temperatura a 50° C y con agitación constante. Después se agregaban 12,5 g de Na₃PO₄ y se continuaba la agitación durante 75 minutos. El gel se lavaba con agua y etanol al 5% hasta que el líquido de lavado fuera incoloro. La resina se regeneraba lavándola con una solución de NaOH 20 mM.

ATP-agarosa. Se regeneraba lavándola repetidamente con una solución 1 M NaCl y se almacenaba a 4° C en la misma solución.

Glucosamine-Sepharose. Se lavaba dos veces por 30 minutos, con una solución de Urea 6 M-KCl 2 M. Luego se enjuagaba exhaustivamente con agua desionizada y se resuspendía en una solución de NaCl 200 mM, volviéndose a lavar repetidamente con agua desionizada. Se mantenía a 4° C en tampón fosfato 100 mM pH 7,0-azida de sodio 0,02%.

10.- Purificación de ácidos nucleicos.

10.1 **DNA plasmidial.** Para purificar DNA plasmidial de cultivos bacterianos, se utilizó el método de lisis alcalina descrito por Birnboim y Doly, 1979, con adaptación de los volúmenes a escala media. Las colonias bacterianas se crecían en matraces de 125 ml con 50 ml de medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente. Se centrifugaba el cultivo completo a 5.000 rpm por 15 minutos en centrifuga Sorvall con rotor SS-34 a 10° C. El agregado celular se resuspendía en 400 µl de solución I pH 8,0 (25 mM Tris-HCl, 50 mM glucosa, 10 mM EDTA). Después de agitar suavemente en vórtex por 10 seg, la suspensión se incubaba 5 minutos a temperatura ambiente y se agregaban 800 µl de solución II fresca (0,2 N NaOH, 1% SDS). La mezcla se invertía 3 a 4 veces, e inmediatamente se incubaba en hielo por 5 minutos. Posteriormente, se adicionaba 600 µl de solución III fría (5 M acetato de potasio, 11% ácido acético glacial) y el tubo se agitaba en vórtex a baja velocidad durante 10-15 seg, poniéndolo rápidamente en hielo por 3 a 5 min. La mezcla se centrifugaba durante 10 min a 10.000 rpm en centrífuga Sorvall con rotor SS-34 y mantenida a 10° C. La fase acuosa era transferida a un tubo estéril y desproteinizada con un volumen de fenol :cloroformo :alcohol isoamílico (25 :24 :1). La separación de las fases se realizaba centrifugando la mezcla a 5.000 rpm por 15 a 20 min en centrifuga Sorvall con rotor SS-34. La nueva fase acuosa obtenida, se lavaba con un volumen de cloroformo :alcohol isoamílico (24 :1), seguido por la precipitación del DNA mediante la adición de dos volúmenes de etanol absoluto frío e incubación por 2 horas a -20° C. El DNA se recuperaba centrifugando a 5.000 rpm por 15 min en rotor SS-34, se descartaba el

sobrenadante y el sedimento se resuspendía en 50 a 100 μ l de tampón TE pH 8,0 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) que contenía RNAsa A a una concentración final de 30 μ g/ml.

10.2 Ácidos nucleicos totales de *Drosophila*. La purificación de DNA genómico de *Drosophila* se realizaba con moscas frescas o congeladas a -20° C, pero mantenidas por 5-6 horas privadas de alimentación, con el objeto de eliminar de su sistema digestivo las células de levadura presentes en el medio de cultivo. Se usaban, básicamente, dos procedimientos :

- a) Según el método descrito por Ish-Horowicz, comunicación personal, se homogeneizaban aproximadamente 200 moscas adultas (0,5-1 g) en 5 ml de tampón de homogeneización A (Apéndice 2), en homogeneizador de vidrio tipo Potter, a máxima velocidad durante 5 min. Para eliminar los restos de cuerpos, se centrifugaba a 1.000 rpm por 1 min en centrifuga Sorvall con rotor SS-34 y se recuperaba el sobrenadante, el cual se centrifugaba a 8.000 rpm por 5 min en rotor SS-34 y el precipitado se resuspendía en 0,5 ml de tampón de homogeneización A. Posteriormente, se agregaba proteinasa K a una concentración final de 200 μ g/ml y SDS al 1%, agitando suavemente los tubos, e incubando por 60 min a 37° C. Posteriormente, se adicionaba un volumen de fenol saturado en tampón Tris-HCl pH 7,4 hidroxiquinolina 0,1% y se agitaba suavemente la preparación durante 10 a 15 min. Las fases se separaban centrifugando a 5.000 rpm por 20 min en rotor SS-34. La fase acuosa se transfería a un tubo limpio, se mezclaba con un volumen de fenol : cloroformo : alcohol isoamílico (25 :24 :1) y se agitaba suavemente por 10 a 15 min, luego de lo cual se procedía a centrifugar en las condiciones antes mencionadas para separar fases. Este lavado se repetía dos veces y finalmente el último lavado se realizaba mezclando la fase acuosa con un volumen de cloroformo : alcohol isoamílico (24 :1). A la fase acuosa recuperada, se agregaba NaCl a una concentración final de 200 mM y el DNA se precipitaba con dos volúmenes de etanol absoluto frío. Se descartaba el sobrenadante, se lavaba el

DNA dos veces con etanol 70% y una vez seco, se resuspendía en un volumen adecuado de tampón TE pH 8,0 con RNAsa A a 30 µg/ml.

- b) Según una modificación del método descrito por Gemmill *et al*, 1985, las moscas adultas (aproximadamente 200) se homogeneizaban suavemente en 5 ml de tampón de homogeneización A (apéndice 2) e inmediatamente se mezclaban con un volumen igual de tampón de homogeneización B (apéndice 2), agitando suavemente los tubos por 10 min. Las proteínas de este homogeneizado se extraían una vez con un volumen igual de una mezcla de fenol saturado en tampón Tris-HCl pH 7,4-0,1% hidroxiquinolína, dos veces con un volumen igual de una mezcla de fenol : cloroformo : alcohol isoamílico (25 :24 :1) y una vez con un volumen de cloroformo : alcohol isamílico (24 :1). Después de adicionar NaCl a una concentración final de 200 mM, el DNA se recuperaba del sobrenadante final por precipitación con etanol absoluto a -20°C por 2 horas. El DNA obtenido se lavaba dos veces consecutivas con etanol 70%, se secaba a 37° C y finalmente se resuspendía en agua tridestilada estéril o tampón TE con RNAsa A a 30 µg/ml.

10.3 **Acidos nucleicos totales de *Rattus norvegicus*.** Aproximadamente 15 g de hígado fresco se homogeneizaban, como se indica en el punto 2.2. El homogeneizado se trataba con proteinasa K a 100 µg/ml y SDS al 1% y se incubaba a 55°C durante 60 min. Posteriormente se procedía a desproteinizar las muestras de la misma forma que se indica en el punto 10.2 a.

10.4 **Acidos nucleicos totales de *Saccharomyces cerevisiae*.** El DNA de *S. cerevisiae* se purificó a partir de esferoplastos, según el método descrito por Philippsen *et al*, 1991. Las células de levadura se crecían en 50 ml de medio YEPD (apéndice 1) hasta saturación. Se recuperaban las células por centrifugación en centrífuga Sorvall a 5.000 rpm por 5 min en rotor SS-34 y se resuspendían en 3 ml de sorbitol 0,9 M, EDTA 0,1 M pH 7,5. A la suspensión celular se agregaban 100 µl de Zimoliase 60.000 (2,5 mg/ml) preparada en el momento de usar y se incubaba a 37° C durante 1 hora, con agitación suave. Los esferoplastos se recuperaban por centrifugación a 5.000 rpm durante 5 min en rotor SS-34, se resuspendían en 5ml

de Tris-HCl 50 mM, EDTA 20 mM pH 7,4 y se agregaba 0,5 ml de SDS al 10%. La mezcla se incubaba a 65° C durante 30 min. Posteriormente, se adicionaba 1,5 ml de acetato de potasio 5 M y se dejaba a temperatura ambiente por 5 min. Después se incubaba en hielo por 1 hora y se centrifugaba a 15.000 rpm durante 10 min en rotor SS-34. El líquido sobrenadante se transfería a un tubo estéril, se agregaban dos volúmenes de etanol mantenido a temperatura ambiente y se mezclaba invirtiendo tres veces el tubo. Se centrifugaba a 10.000 rpm durante 15 min en rotor SS-34 y el sedimento se secaba al vacío y se resuspendía en 3 ml de tampón TE con agitación suave durante una noche. La suspensión se centrifugaba a 10.000 rpm durante 15 min en rotor SS-34 y el sobrenadante se transfería a un tubo estéril, al cual se agregaba un volumen de isopropanol y se agitaba suavemente. El precipitado (con aspecto de ovillo) se extraía con ayuda de una punta estéril y se depositaba en un tubo eppendorf estéril. El DNA se resuspendía en tampón TE y el RNA se eliminaba agregando RNasa A a una concentración final de 30 µg/ml e incubando a 37° C durante 15 min. El DNA se desproteinizaba agregando un volumen de cloroformo : alcohol isoamílico (24 : 1) y las fases se separaban por centrifugación a 12.000 rpm en una microcentrífuga Eppendorf. La fase acuosa se transfería a un tubo estéril y se precipitaba el DNA por adición de dos volúmenes de etanol absoluto frío. Se incubaba a -20° C por 30 min y se recuperaba el DNA centrifugando 5 min en microcentrífuga. El precipitado se secaba al vacío y finalmente se resuspendía en agua tridestilada estéril o tampón TE.

11.- Electroforesis de ácidos nucleicos.

11.1 **Electroforesis de DNA en geles de agarosa.** Se realizaba como lo describe Sambrook *et al.* (1989). La agarosa se disolvía en tampón TAE o TBE (apéndice 2) por calentamiento hasta ebullición. Luego se agregaba bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 µg/ml. Cuando la solución alcanzaba aproximadamente 50°- 55° C se depositaba en una placa de vidrio provista de una peineta con espaciadores de 0,5 mm y se dejaba gelificar a temperatura ambiente. El gel se

colocaba en una cámara de electroforesis horizontal que contenía tampón TAE pH 7,9 (40 mM Tris-HCl, 5 mM acetato de sodio, 1 mM EDTA) ó TBE pH 8,0 (8,9 mM Tris-HCl, 8,9 mM ácido bórico, 2 mM EDTA) con bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µg/ml. Las muestras de DNA se mezclaban en una proporción de 5 : 1 v/v con tampón de carga 6X (35% glicerol, 2% ficoll, 0,25% azul de bromofenol y tampón TBE 6X) y la electroforesis se corría a un voltaje constante de 60 volts.

- 11.2 **Visualización de DNA en geles de agarosa.** Los geles de agarosa se observaban en un transiluminador marca Hoefer, a una longitud de onda de 302 nm. Los geles se fotografiaban en una cámara Polaroid MP-4, usando una película Polaroid instantánea N° 667, con filtro amarillo de gelatina.
- 11.3 **Determinación de tamaños moleculares.** Para determinar el tamaño molecular de los fragmentos de DNA se usaba DNA del fago λ digerido con *Hind*III como patrón y se interpolaba la migración del fragmento de interés. Se utilizó el programa computacional DNAFRAG versión 3.03 (Schaffer *et al*, 1981), obtenido desde European Molecular Biology Laboratories (EMBL) a través de Internet. El apéndice 3 muestra los tamaños moleculares determinados para el patrón de DNA del fago λ , con el cual se hacían los análisis en el programa mencionado.
- 11.4 **Determinación de la concentración de DNA.** Para determinar la concentración de ácidos nucleicos se usaban dos procedimientos :
- a) Densidad óptica. Las muestras se depositaban en cubetas de cuarzo de 1 ml y se medía la densidad óptica a 260 nm en un espectrofotómetro Hewlett Packard modelo 1600 TR. Se consideró que 1 unidad de absorbancia (D.O.) a 260 nm equivale a 50 µg/ml de DNA de doble hebra (Sambrook *et al*, 1989). La pureza de una preparación de DNA se determinaba midiendo la razón entre la densidad óptica a 260 y 280 nm (D.O.₂₆₀/D.O.₂₈₀). Se estimó que una preparación estaba pura cuando la razón era igual o mayor a 1,8.
 - b) Método del minigel de agarosa. Otro método consistía en la corrida electroforética (realizada como se indica en punto 11.1) de las muestras en un gel de agarosa,

cuya concentración podía variar entre 0,5 y 1,5% de acuerdo a las necesidades. Como patrón, se utilizaba DNA del bacteriófago λ digerido con *HindIII*, a una concentración de 40 ng/ μ l. El minigel se observaba en un transiluminador bajo luz ultravioleta y se comparaba la intensidad de fluorescencia de la banda de interés con alguna banda similar del patrón. A partir de esta comparación se estimaba la concentración de DNA de la muestra.

12.- Extracción de DNA a partir de geles.

- 12.1 **Método de unión a sílica (Geneclean II).** Todos los fragmentos de DNA usados como sondas en experimentos de hibridación y PCR se purificaron una, dos y hasta tres veces por el método de unión a sílica : Geneclean II (Geneclean II kit, Bio 101, CA). Para ello, 5 a 10 μ g del DNA de interés se sometían a electroforesis en gel de agarosa al 0,5-1,5% a 50 volts por 3-8 horas. A partir de este gel, se escindía la banda de interés, con la ayuda de un bisturí y por visualización del DNA bajo luz ultravioleta en un transiluminador. El trozo de gel se depositaba en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y se adicionaba tres volúmenes (de acuerdo al peso de la banda en gramos) de NaI 6 M y se incubaba a 50-55° C por 10 min, hasta que la agarosa se disolvía completamente. Luego, se agregaban 5 μ l de la resina Glassmilk (dióxido de sílice) y se incubaba a temperatura ambiente por 5-10 min. El tubo se centrifugaba a 12.000 rpm por 5 seg en una microcentrífuga Eppendorf, se eliminaba el sobrenadante y la resina se lavaba tres veces, resuspendiendo y centrifugando con 500 μ l de solución de lavado (Apéndice 2) a 12.000 rpm por 5 seg. Para eluir el DNA de la resina, el sedimento obtenido de la última centrifugación, se resuspendía en un pequeño volumen (5-20 μ l) de agua tridestilada estéril o tampón TE pH 8,0 y se incubaba a 50-55° C. Posteriormente, se centrifugaba en microcentrífuga a 12.000 rpm por 30 seg y se recuperaba el sobrenadante en un tubo limpio y estéril.
- 12.2 **Electroelución.** Una gran cantidad (5-10 μ g) del DNA de interés se cargaba y corría en una electroforesis en gel de agarosa al 0,5-1,5% a 50 volts por 3-8

horas. Se extraía la banda de interés y el gel se colocaba en una bolsa de diálisis, con 2-5 ml del mismo tampón de electroforesis y se cerraba firmemente en ambos extremos. La bolsa se sometía a electroforesis a 50 volts por 2 -3 horas y el campo eléctrico se invertía durante 2 min, para despegar el DNA unido a la bolsa. Se recuperaba el tampón del interior de la bolsa de diálisis y se depositaba en un tubo limpio, luego se precipitaba el DNA por la adición de dos volúmenes de etanol absoluto frío e incubación a -20° C por 16 horas. El DNA se recuperaba mediante centrifugación a 10.000 rpm en centrífuga Sorvall por 30 min a 4° C con rotor SS-34. Finalmente, el DNA se secaba y se resuspendía en un volumen adecuado de tampón TE pH 8,0.

13.- Digestión de ácidos nucleicos con enzimas de restricción.

- 13.1 **Digestión total de DNA genómico.** La digestión total de DNA genómico de mosca, rata y levadura se realizaba incubando 5-20 μ g de DNA cromosómico con enzima de restricción a una concentración de 1-3 unidades de enzima por μ g de DNA. Las condiciones de pH, temperatura y fuerza iónica utilizadas se basaban en las descritas por Sambrook *et al.*(1989) y en el folleto distribuido por el fabricante. La mezcla de reacción se realizaba en un volumen final de 100-200 μ l y se incubaba durante 12- 16 horas, hasta conseguir digestión total. Cuando se realizaron digestiones enzimáticas dobles con sistemas de tampones incompatibles, la digestión se realizó usando tampón multicore 10 X de Promega (250 mM Tris-acetato pH 7,8, 1 M acetato de potasio, 100 mM acetato de magnesio y 10 mM DTT), con ambas enzimas simultáneamente y con los controles individuales respectivos digeridos en presencia del mismo tampón. Para concentrar el DNA, éste se precipitaba con dos volúmenes de etanol absoluto frío a -20° C por 2-6 horas y se resuspendía en 40 μ l de tampón TE o agua estéril.
- 13.2 **Digestión total de DNA plasmidial.** Las digestiones de DNA plasmidial se realizaban según las condiciones descritas en Sambrook *et al.*(1989). Se incubaban 0,2-0,5 μ g de DNA plasmidial con 0,5-1 unidad de enzima de restricción durante 3-

5 horas a 37° C en un volumen final de 20 µl. Para realizar dobles digestiones, el DNA se trataba con las dos enzimas de restricción en forma simultánea usando tampón multicore 10 X de Promega y los controles individuales respectivos. Cuando los productos de digestión se necesitaban para otra reacción enzimática, se desproteinizaba dos veces con fenol : cloroformo : alcohol isoamílico (25 :24 :1), una vez con fenol : cloroformo (24 :1) y el DNA se precipitaba con dos volúmenes de etanol absoluto a -20° C. El sedimento se resuspendía en un volumen adecuado de tampón TE o agua tridestilada estéril.

14.- Transformación genética de *Escherichia coli*.

La transformación genética de las cepas de *E. coli* utilizadas se realizó según el método de RbCl (Utermohlen, 1994).

14.1 **Obtención de células competentes.** La cepa DH5 α , de *E. coli*, se sembraba en medio LB sólido con un asa de platino para obtener colonias aisladas y las placas se incubaban durante 48 horas a 37° C. Se inoculaba un matraz de 50 ml que contenía 7 ml de medio ϕ (apéndice 1), con tres colonias aisladas, y se incubaba con agitación constante hasta obtener una D.O._{550nm} = 0,3. Se utilizaban 5 ml de este cultivo para inocular 100 ml de medio ϕ precalentado a 37° C, el cual se incubaba con agitación hasta una D.O._{550nm} = 0,48. Este cultivo se distribuía en tubos de vidrio pre-enfriados y las células se precipitaban mediante centrifugación en rotor SS-34 a 5.000 rpm en una centrífuga Sorvall a 4° C. Las células se resuspendían suavemente en 30 ml de solución T ϕ BI (apéndice 2) y se volvían a centrifugar en las mismas condiciones. Posteriormente, las células se resuspendían en 4 ml de solución T ϕ BI y se distribuían en alícuotas de 100 µl en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml y se guardaban inmediatamente a -70° C, hasta el momento de ser usadas.

14.2 **Transformación.** Las células competentes se descongelaban a temperatura ambiente e inmediatamente se pasaban a hielo. Se adicionaba el DNA transformante en un volumen no superior a los 10 µl y la mezcla se incubaba en hielo por 15 min, luego de lo cual se sometían a un pulso térmico de 42° C por 2 min.

Inmediatamente las células se incubaban en hielo por 2 min y posteriormente a temperatura ambiente por 10 min. Con el objeto de permitir la expresión de resistencia que portaba el vector, se adicionaba 1 ml de medio LB a la mezcla y se incubaba por 60 min a 37° C. Finalmente, se sembraban alícuotas de 100 µl de células, en placas con medio LB suplementadas con el antibiótico apropiado, y se incubaban a 37° C por 12-16 horas.

- 14.3 **Ligado de DNA con la enzima DNA ligasa del bacteriófago T4.** El clonado del fragmento PCR de 0,67 kb en el plásmido Bluescript se realizó ligando DNA del vector, digerido con *HincII*, y DNA del fragmento obtenido por PCR y purificado por GeneClean II sin digerir, en una proporción de 5 : 1 mediante la enzima DNA ligasa de T4. Se realizó este ligamiento de extremos romos, debido a que el fragmento PCR contiene en sus extremos la secuencia de reconocimiento para la enzima *EcoRI*, incluida en los partidores. Las mezclas de ligado se realizaban incubando ambos DNA, en volúmenes no superiores a 10 µl, con 1-2 unidades de la enzima y el tampón respectivo, a 15° C por 12-16 horas. El ligado de los fragmentos de DNA se verificaba mediante electroforesis en gel de agarosa. Cuando la mayor parte del DNA se encontraba unido, se usaba esta mezcla para transformar células competentes de *E. coli*. El protocolo de transformación se describe en el punto 14.2, excepto que las células transformadas se plaqueaban sobre medio LB sólido suplementado con ampicilina a 100 µg/ml, X-gal e IPTG a 32 µg/ml, para realizar selección de la colonia visualizando su color, es decir, colonias blancas entre colonias azules.

15.- Hibridación de ácidos nucleicos.

- 15.1 **Marcación de DNA mediante partidores al azar (Random Primers).** Se usó el método descrito por Feinberg *et al*, 1983 con el sistema de Random Primers DNA Labeling System (Gibco-BRL) según instrucciones del fabricante. Se desnaturaban 50 ng de sonda, disueltos en 23 µl de agua estéril, a 100° C por 5-10 min e inmediatamente el tubo se depositaba en hielo. Se adicionaba 6 µl de una solución

que contenía una mezcla equimolar de desoxinucleótidos (dATP, dGTP y dTTP) 0,5 mM, 15 μ l de una mezcla de partidores sintéticos y 5 μ l de α - 32 P-dCTP ó α - 32 P-dATP(50 μ Ci). La solución se mezclaba suavemente y se agregaba 1 μ l de una solución que contenía el fragmento Klenow de la enzima DNA polimerasa I, disuelto en tampón fosfato de potasio 100 mM pH 7,0, 2-mercaptoetanol 10 mM y glicerol 50% v/v. La reacción se incubaba durante 3 horas a 25° C y se detenía agregando 5 μ l de una solución de EDTA 0,2 M pH 7,5.

Para separar los nucleótidos no incorporados, la muestra se centrifugaba a través de una pequeña columna de Sephadex G-50 equilibrada con tampón TE pH 8,0. La columna se empacaba en una jeringa de 1 ml mediante repetidas centrifugaciones de la misma, a 2.000 rpm por 2 min en rotor Sorvall HB-4, dentro de un tubo córex de 15 ml. Una vez empacada la columna con 0,9 ml de resina, ésta se lavaba tres veces con 100 μ l de tampón TE centrifugando en iguales condiciones. Luego se agregaba la muestra de DNA en un volumen de 100 μ l y se centrifugaba a la misma velocidad y tiempo. Se colectaban los 100 μ l del efluente de la columna en un tubo Eppendorf estéril, permaneciendo los nucleótidos no incorporados dentro de la columna. La sonda recuperada se desnaturaba calentando a 100° C por 5-10 min.

- 15.2 **Marcación de DNA mediante el método de reparación inducida por corte (Nick-Translation).** Se usó el método descrito por Rigby *et al*, 1977 con el sistema de detección de ácidos nucleicos no radiactivo Blue gene de BRL. Para la reacción de marcaje, se incubaban entre 0,1 y 1 μ g de DNA de la sonda de interés con una mezcla equimolar de desoxinucleótidos 0,2 mM (dCTP, dGTP y dTTP), 2,5 μ l del nucleótido dATP biotinilado 0,4 mM, 5-10 unidades de una mezcla de DNA polimerasa I- DNAsa I de *E. coli*, y agua hasta completar un volumen final de 50 μ l. La reacción se incubaba por 90 min a 15° C y se detenía por la adición de 5 μ l de EDTA 250 mM y 1,25 μ l de SDS al 5%. Los nucleótidos no incorporados se

separaban de la sonda marcada, mediante filtración por centrifugación, tal como se describe en el punto 15.1.

15.3 Hibridación DNA : DNA. Se realizó en base a la técnica descrita por Southern, 1975. La electroforesis en geles de agarosa-bromuro de etidio (0,5 µg/ml) se realizaba con 5-20 µg de DNA cromosómico y entre 1 a 20 ng de DNA plasmidial por canal. Para facilitar el traspaso del DNA al filtro, el DNA se fragmentaba por despurinación, sumergiendo el gel en una solución de HCl 0,2 N por 10 min a temperatura ambiente y se lavaba cuidadosamente unas dos o tres veces en agua destilada. Para desnaturar el DNA, el gel se trataba con una solución de NaOH 0,5 N y NaCl 1,5 M a temperatura ambiente por 45 min. Después de lavar el gel tres veces con agua destilada, se procedía a neutralizarlo con una solución de Tris-HCl 1 M pH 7,4 y NaCl 1,5 M durante 30 min. Se repetía el paso anterior por 15 min más y el gel se lavaba tres veces con agua destilada. El DNA desnaturado se transfería, por capilaridad, a una membrana de nylon, utilizando una solución de citrato de sodio (SSC) 10 X pH 7,4 como tampón (Apéndice 2). La transferencia se realizaba durante 12-16 horas y una vez finalizada, la membrana se lavaba con SSC 2X y se secaba a temperatura ambiente. El DNA se fijaba a la membrana por irradiación con luz ultravioleta en un transiluminador durante 2 -5 min y se trataba con una solución de prehibridación (apéndice 2) durante 12- 16 horas a 42° C. La hibridación se realizaba sumergiendo la membrana en una solución de hibridación (Apéndice 2), que contenía la sonda desnaturada, por 24 horas a 42° C. A menos que se indique de otra forma, en todos los experimentos realizados, los pasos de pre e hibridación se llevaron a cabo en condiciones estrictas, esto es, a 42° C y 50% formamida.

Para los casos en que se usó sondas biotiniladas, las reacciones de prehibridación e hibridación se realizaron en las mismas condiciones de temperatura y tiempo, excepto que las soluciones usadas variaban un poco en su composición (ver Apéndice 2).

15.4 Lavados post-hibridación de las membranas. Los lavados post-hibridación, de las membranas se realizaban en diferentes condiciones de estrictez, según el experimento, con las siguientes soluciones y condiciones descritas en el catálogo de la membrana usada :

a) Lavados en alta estrictez (Para híbridos perfectos) :

dos veces por 15 min con SSC 5X-SDS 0,5% a temperatura ambiente.

dos veces por 15 min con SSC 1X-SDS 0,5% a 37° C.

tres veces por 15 min con SSC 0,1X-SDS 1% a 65° C.

b) Lavados en estrictez media :

dos veces 15 min con SSC 5X-SDS 0,5% a temperatura ambiente.

dos veces 15 min con SSC 1X-SDS 0,5% a 37° C.

una vez 15 min con SSC 0,1X-SDS 1% a 37° C.

c) Lavados en baja estrictez (Para apareamiento incompleto) :

dos veces 15 min con SSC 1X-SDS 0,1% a temperatura ambiente.

dos veces 15 min con SSC 1X-SDS 0,1% a 37° C.

Para los casos en que se usó sondas biotiniladas, se usaron los siguientes protocolos de lavados post-hibridación de las membranas:

dos veces por 3 min con SSC 2X-SDS 0,1% a temperatura ambiente.

dos veces por 3 min con SSC 0,2X-SDS 0,1% a temperatura ambiente.

dos veces por 15 min con SSC 0,16X-SDS 0,1% a 50° C.

una vez por 3 min con SSC 2X.

Bloqueo de la membrana : Una vez lavada la membrana se bloqueaba en sus sitios de unión no específicos, con tampón 2 (3% BSA en tampón 1) a 65° C por 1 hora.

Detección del DNA unido a la membrana : Se detectaba incubando la membrana en una solución del conjugado estreptavidina-fosfatasa alcalina, diluida 1.000 veces en tampón 1 pH 7,5 (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl), durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaba dos veces con tampón 1.

Visualización del DNA en la membrana: Se realizaba incubando la membrana 10 min en tampón 3 pH 9,5 (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂) y

sumergiéndola en una solución de azul de nitrotetrazolio 0,3 mg/ml y BCIP 0,16 mg/ml en tampón 3, por 30 min a 3 horas en oscuridad. La reacción se detenía sumergiéndola en tampón 1 por 10-20 min.

15.5 Exposición de las membranas. Las membranas marcadas radiactivamente fueron lavadas en alguna de las condiciones antes mencionadas, se secaron a temperatura ambiente y se cubrieron con láminas plásticas Saran-Wrap. Luego se exponían en placas autorradiográficas de rayos X (X-Omat K, XK-1), con pantalla de intensificación. La exposición se realizaba a -70° C y el período de exposición variaba de acuerdo a los resultados obtenidos en la marcación de la sonda. Las placas se revelaban y fijaban de acuerdo a procedimientos fotográficos rutinarios.

16.- Reacción de polimerización en cadena (PCR).

16.1 Partidores para hexoquinasas. Se construyeron a partir de las regiones más conservadas obtenidas de un alineamiento de secuencias de cDNA de hexoquinasas A de mamíferos. Para realizar dicho alineamiento se utilizó el programa computacional de análisis de secuencias, versión 9.0 del Genetic Computer Group (GCG) de la Universidad de Wisconsin. Los cuatro partidores, denominados PHK 23-4 (nucleótidos 316-318), PHK 26-2A y PHK 26-2B (nucleótidos 778-803) y PHK 14-1 (nucleótidos 1442-1429) se sintetizaron en Isogen Bioscience BV, Holanda.

16.2 Amplificación de DNA. Como molde se usaban 10 ng de DNA plasmidial, 100 ng de DNA genómico de *Drosophila* o 1 μ g de DNA genómico de rata, en un volumen de reacción total de 25 μ l que contenía : tampón PCR 10X pH 8,4 (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl), $MgCl_2$ 2 mM, mezcla equimolar de los cuatro desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) 0,2 mM, 1 μ M de cada partidor y 0,625 unidades de DNA polimerasa I de *Thermus aquaticus*. Las reacciones se realizaron en tubos especiales de 0,2 ml en un termociclador Perkin Elmer, modelo 9.600, y los parámetros de ciclaje, como número de ciclos, temperatura y tiempos

de alineamiento y extensión, variaban según el DNA molde y la mezcla de partidores que se usaban en la reacción de amplificación.

17.- Manipulación de los cromosomas artificiales de levadura (YAC).

17.1 **Obtención de DNA cromosómico intacto de *S. cerevisiae*.**

Se usó la metodología descrita por Schwartz y Cantor, 1986, con pequeñas modificaciones.

Los distintos clones de *S. cerevisiae* que portaban los cromosomas artificiales de levadura y la cepa AB 1380 de la misma especie, usada como patrón, se sembraban en matraces que contenían 50 ml de medio selectivo YCD (Apéndice 1) por 72 h a 30° C. Se recuperaban las células por centrifugación a 4° C y 3.000 rpm en rotor Sorvall SS-34 durante 10 min y se lavaban tres veces consecutivas con una solución de EDTA 50 mM pH 8,0 en las mismas condiciones de centrifugación. El sedimento se resuspendía en un volumen igual de EDTA 50 mM (500 µl) y las células se incubaban por 3 a 5 min a 45° C. Posteriormente, se agregaban 35 µl de Zymoliase 100T (2 mg/ml de Zymoliase 100T en tampón fosfato de sodio 10 mM pH 6,5 y 50% glicerol) e inmediatamente se adicionaban tres volúmenes de una solución de agarosa 1,3% de bajo punto de fusión preparada en EDTA 125 mM pH 8,0 y mantenida a la misma temperatura. Se agitaba suavemente para homogeneizar la solución y rápidamente se depositaban alícuotas de 0,2 ml en moldes plásticos, los que se enfriaban a 4° C por 5 a 10 min. Los bloques de agarosa gelificados se transferían desde los moldes, con ayuda de una espátula, a un frasco que contenía 5 ml de tampón LET (Apéndice 2) y se incubaban por 24 h a 37° C. Se removía el tampón LET y se procedía a lavar los bloques de agarosa tres veces por 15 min con una solución de EDTA 50 mM pH 8,0, luego de lo cual, se agregaban 2 ml de tampón NDS (Apéndice 2) a cada frasco y se incubaban las muestras a 55° C por 24 h. Finalmente, se retiraba el tampón NDS y se lavaban los bloques dos a tres veces por 15 min con EDTA 50 mM a temperatura ambiente y se

almacenaban a 4° C por períodos cortos, o indefinidamente a -20° C en EDTA 25 mM, 50% glicerol.

17.2 Electroforesis de DNA en geles de campo pulsado.

Las muestras de DNA cromosómico se sometían a electroforesis de campo eléctrico con contorno homogéneo (CHEF) en geles de agarosa al 1,0%-1,4% en tampón TBE 0,5X. Los bloques de agarosa se depositaban en los bolsillos del gel con ayuda de espátulas y se sellaban los bolsillos con agarosa de bajo punto de fusión mantenida a 45°C. Posteriormente, el gel se sumergía en la cámara que contenía 2 l de tampón TBE 0,5X y se corría la electroforesis a 14° C, en las condiciones elegidas.

18.- Secuenciación de DNA.

DNA del plásmido pBS E1.4 fue secuenciado parcialmente, en el laboratorio, por ambos extremos usando dos procedimientos distintos, pero basados en la metodología básica descrita por Sanger *et al*, 1977. Un método utilizado fue el sistema de secuenciación de DNA con Sequenase, version 2.0 of T7 DNA polimerase (Amersham Life Science USB). El otro método correspondía al sistema de secuenciación de DNA, mediante PCR, Taq DNA polimerase (fmol de Promega).

La secuencia completa y confirmada del plásmido pBS E1.4 fue obtenida del servicio de secuenciación de DNA automatizado perteneciente al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Autónoma de Madrid, y del Centro de Investigación y Desarrollo del C.S.I.C. de Barcelona, España. El análisis de los datos de secuencia obtenidos se realizó mediante el uso del programa computacional del Genetic Computer Group (GCG) de la Universidad de Wisconsin, versión 9.1 (Devereux *et al*, 1992).

RESULTADOS

1.- Determinación del patrón isoenzimático de hexoquinasas en *D. melanogaster* (cepa Oregón-R).

El patrón isoenzimático de hexoquinasas en moscas adultas, se determinó mediante electroforesis en geles nativos de poliacrilamida y posterior detección de la actividad de la enzima. La figura 1 muestra el patrón isoenzimático de hexoquinasas en moscas de diferente sexo. Se puede observar que existen tres bandas principales de actividad hexoquinasa en los homogeneizados, las que han sido denominadas como Hex A, Hex B y Hex C, a partir de la zona anódica. En las zonas de migración correspondiente a las isoenzimas B y C se observan dos bandas tenues de actividad hexoquinasa, lo cual contrasta con las dos bandas intensas que se observan en la zona de migración de la isoenzima A.

Por otra parte, se determinó el patrón de estas isoenzimas en grupos de siete moscas de diferente sexo y edad, luego de separación cromatográfica en DEAE- celulosa, usando un método radioisotópico muy sensible para detectar la actividad enzimática. En la figura 2 se presentan los resultados obtenidos después de eluir con gradiente salino de KCl entre 0-0,5 M. En ella se puede observar que, en hembras de 3 a 9 días de edad, eluyen dos picos principales, denominados 1 y 2, los que experimentan pequeñas variaciones en actividad según la edad de la mosca. En las hembras, la actividad hexoquinasa promedio es mayor para el pico 2 que para el pico 1 en cualquier edad. En machos de 3 a 22 días de edad también están presentes estos mismos dos picos principales que muestran variaciones similares en actividad hexoquinasa según la edad de la mosca adulta. Por ejemplo, se puede observar que ambos picos presentan mayor actividad de las isoenzimas correspondientes a los tres días de edad, pero luego ésta disminuye a un nivel que se mantiene casi constante y similar, en promedio, en las diferentes edades. Las diferencias en actividad son notables entre sexos sólo para el pico 1, mostrando las hembras una actividad promedio menor a la

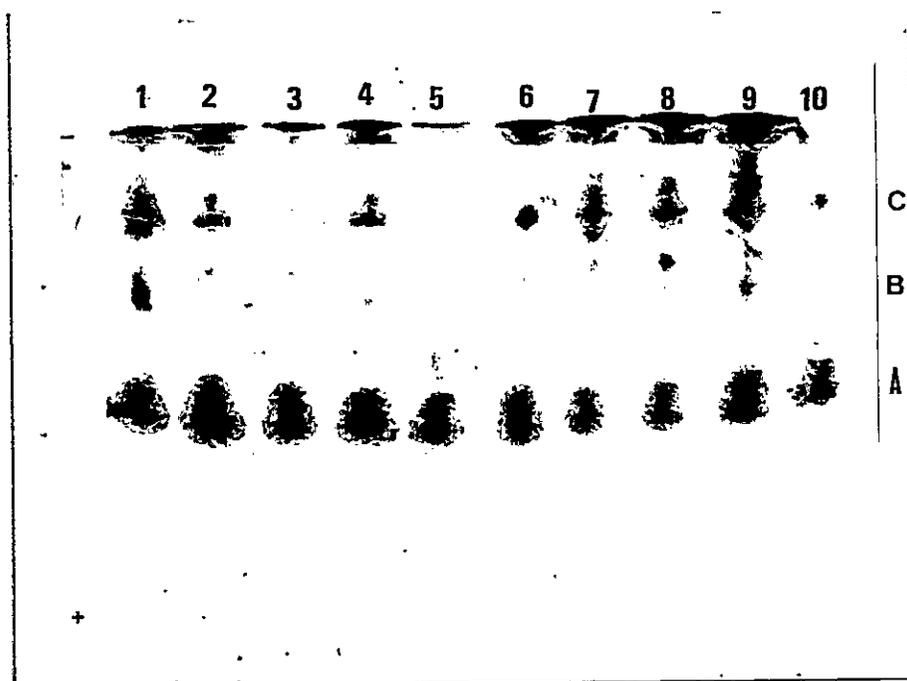


Figura 1 : Determinación del patrón isoenzimático de hexoquinasas en *D. melanogaster* (cepa Oregón-R), mediante electroforesis en geles nativos de poliacrilamida. Canales 1 al 5 : Homogeneizado de una mosca hembra adulta. 22,4 μ g de proteínas y 2,1 mU totales de actividad enzimática. Canales 6 al 10 : Homogeneizado de una mosca macho adulta. 20,2 μ g de proteínas y 2,04 mU totales de actividad enzimática.

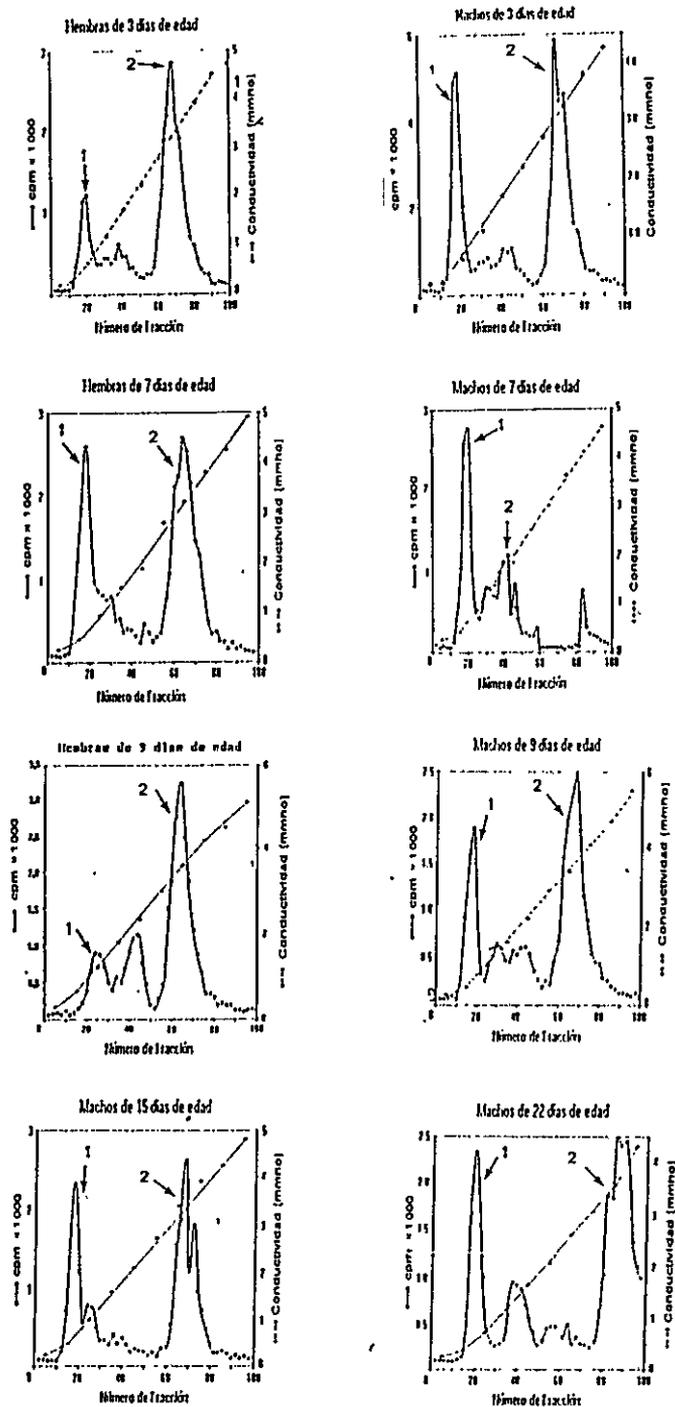


Figura 2 : Determinación del patrón isoenzimático, de hexoquinetas en *D. melanogaster* adulta (cepa Oregón-R) de diferente sexo y edad, por cromatografía en DEAE-celulosa, usando un método radioisotópico para detectar actividad enzimática.

del pico 2. La actividad en ambos sexos es, en promedio, similar para el pico 2 en casi todas las edades, excepto en machos y hembras de 3 días. Es importante destacar que en ambos sexos y en todas las edades aparece un patrón de picos de actividad pequeña entre ambos picos principales (picos intermedios), el cual se hace más complejo a medida que aumenta la edad. Por otra parte, se determinó que el pico 1 eluye a aproximadamente a 55 mM KCl y el pico 2, más retenido, eluye a 180 mM KCl aproximadamente. De estos experimentos se determinó que una edad adecuada, para la separación y purificación de las isoenzimas de las moscas adultas, es entre 3 y 15 días después de nacidas.

2.- Purificación de enzimas.

2.1 Purificación parcial de hexoquinasas en *D. melanogaster* (cepa Oregón-R).

2.1.1 Preparación del extracto crudo.

Para la purificación de las isoenzimas normalmente se procesaban 2,5 g de moscas machos y hembras adultas de 3 a 15 días de edad (ver métodos sección 2.1). La actividad hexoquinásica presente en el citosol, después de filtrar y centrifugar, era de aproximadamente 2,02 U/ml con una concentración de 2 mg/ml de proteínas y actividad específica de aproximadamente 1 U/mg.

2.1.2 Cromatografía en DEAE-celulosa.

La figura 3 muestra el perfil típico de elución obtenido después de cromatografiar un extracto crudo en DEAE-celulosa. Se puede apreciar que, usando el método espectrofotométrico, se obtienen los mismos resultados que con el método radioisotópico descrito en métodos sección 3.2. Esto es, dos picos principales de actividad hexoquinasa (denominados P1 y P2), con picos intermedios de menor actividad, los cuales fueron reunidos para su identificación electroforética en una sola fracción, denominada pico intermedio (Pi). La tabla 1 muestra un resumen de los datos de purificación parcial, usando este tipo de cromatografía. En la figura 3 y en la tabla 1, se puede observar que el pico 1 eluye a una concentración aproximada de 55 mM KCl (valor determinado como se indica en métodos, sección 8) y la mayor cantidad de proteínas eluyen en fracciones posteriores a la salida del pico 1, obteniéndose una actividad específica de 1,6 U/mg y se logra

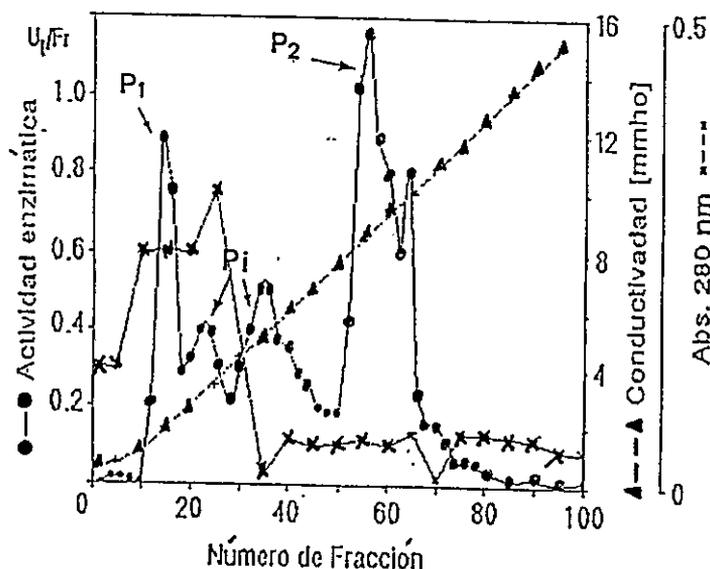


Figura 3 : Purificación de las isoenzimas de hexoquinasa de *D. melanogaster* (cepa Oregón-R) adulta. Cromatografía de intercambio iónico en DEAE celulosa y detección de actividad hexoquinasa mediante el método espectrofotométrico.

P₁ = Reunión de las fracciones, provenientes de cromatografía en DEAE-celulosa de un extracto crudo de *D. melanogaster*, con mayor actividad hexoquinasa que eluyen a aproximadamente 55 mM KCl. P₁ corresponde a Hex C.

P₂ = Reunión de las fracciones, provenientes de cromatografía en DEAE-celulosa de un extracto crudo de *D. melanogaster*, con mayor actividad hexoquinasa que eluyen a aproximadamente 180 mM KCl. P₂ corresponde a Hex A.

P_i = Reunión de las fracciones, provenientes de cromatografía en DEAE-celulosa de un extracto crudo de *D. melanogaster*, con mayor actividad hexoquinasa de dos picos intermedios de actividad que eluyen entre 50 y 180 mM KCl.

Tabla 1 : Resumen del procedimiento de purificación parcial de las hexoquinasas de *D. melanogaster* (cepa Oregón-R) adulta, mediante cromatografía en DEAE celulosa.

Etapa	Volumen (ml)	Actividad (U/ml)	Proteína (mg/ml)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento (%)	Purificación (veces)
Citosol (S1)	9,1	2,1	2,06	1,01	100	1
DEAE P1 (Hex C)	6,5	0,18	0,112	1,6	6,1	1,5
DEAE P2 (Hex A)	9,4	0,44	0,068	6,47	21,9	6,4
DEAE pico intermedio 1	4,0	0,11	0,063	1,74	2,3	1,72
DEAE pico intermedio 2	5,0	0,184	0,146	1,26	4,8	1,24
Total	--	--	--	--	35,1	--

purificar 1,5 veces. El pico 2, que eluye a una concentración salina mucho mayor de aproximadamente 180 mM KCl (ver métodos, sección 8), tiene actividad específica de 6,47 U/mg y se logra purificar aproximadamente 6 veces con un rendimiento total de 35,1%.

La figura 4 muestra el patrón electroforético de las fracciones correspondientes a los picos 1, 2 e intermedio, dializadas y concentradas. En el canal 1 se observa claramente que el extracto crudo de una hembra adulta, usado como control, muestra tres isoenzimas, denominadas A, B y C. De la misma forma, como se observa en los canales 5 al 7, el extracto crudo de un macho adulto, presenta un patrón isoenzimático similar al de la hembra. Sin embargo, en el canal 2, se puede apreciar que la fracción correspondiente al pico 1 tiene una migración idéntica a la banda más cercana al cátodo, presente en el extracto crudo, por lo cual deducimos que corresponde a Hex C. La fracción correspondiente al pico 2, corrida en el canal 4, tiene una migración similar a la especie más rápida, presente en el mismo extracto, denominada como Hex A, en tanto que la muestra correspondiente al pico intermedio, corrida en el canal 3, presenta bandas muy difusas que migran entre las isoenzimas A y C.

2.1.3 Cromatografías de afinidad.

Por otra parte, con las hexoquinasas A y C, purificadas parcialmente mediante cromatografía en DEAE-celulosa, se realizaron ensayos a microescala para probar diferentes resinas de afinidad, variando al mismo tiempo las condiciones de pH. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 2, e indican que los mejores rendimientos se obtienen con azul de cibacron Sepharose y fosfoultrogel para la isoenzima A.

2.2 Purificación de hexoquinasa A de cerebro de rata.

Se realizó la purificación de esta enzima para usarla como control positivo en los experimentos de reactividad inmunológica con los anticuerpos monoclonales y policlonales. El procedimiento de purificación se realizó como se describe en métodos, sección 4.2. Se obtuvo un volumen total, después de concentrar, de 3,5 ml de preparación enzimática purificada que tenían 2,8 U totales de enzima con una actividad

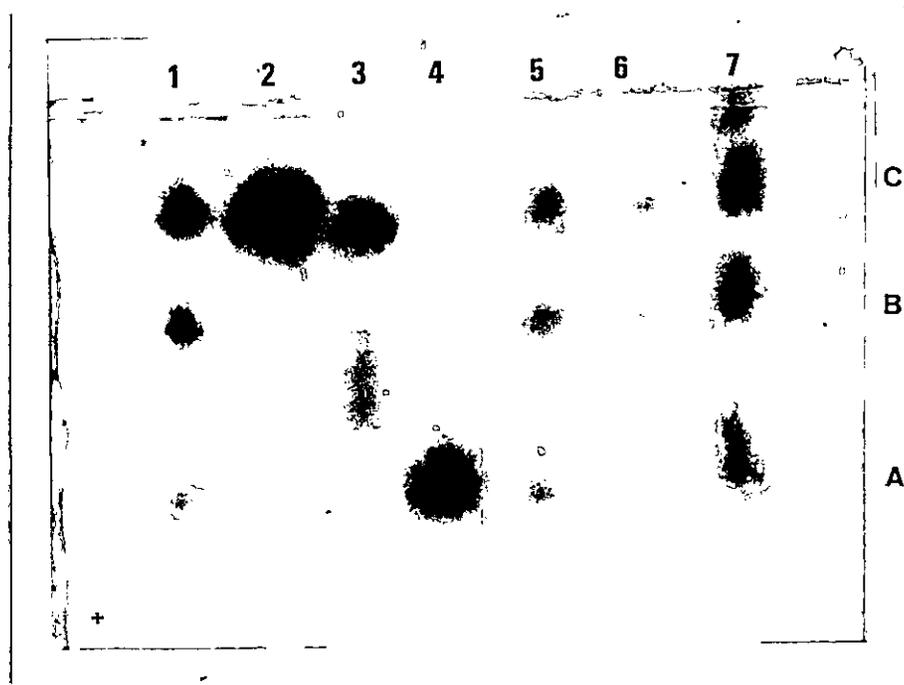


Figura 4 : Electroforesis en geles de poliacrilamida, en condiciones nativas, de las fracciones obtenidas por cromatografía en DEAE-celulosa. Canal 1 : 50 μ l de homogeneizado de una mosca hembra adulta. 33,6 μ g de proteínas. Canal 2 : 50 μ l de las fracciones correspondientes al pico 1. 6,1 μ g de proteínas y 4,5 mU de actividad enzimática. Canal 3 : 50 μ l de las fracciones correspondientes al pico intermedio. 7,3 μ g de proteínas y 3,0 mU de actividad enzimática. Canal 4 : 50 μ l de las fracciones correspondientes al pico 2. 5,2 μ g de proteínas y 10,5 mU de actividad enzimática. Canales 5 a 7 : 50 μ l de homogeneizado de una mosca macho adulta. 30,4 μ g de proteínas aproximadamente.

Tabla 2 : Ensayos de purificación de las hexoquinasas A y C de *D. melanogaster* (cepa Oregón-R) en mini-columnas (1 x 5 cm) usando diferentes resinas de afinidad, pseudoafinidad y condiciones de pH.

Resina	Tampón y pH	Enzima	% de activ retenid (U.totales.)
Glucosamina Sepharse	Fosfato de potasio pH 7,0	Pico 1 DEAE celulosa Hex C	0
Glucosamina Sepharse	Fosfato de potasio pH 7,0	Pico 2 DEAE celulosa Hex A	0
Azul de Cibacron sepharse	Tris-HCl pH 7,5	Pico 2 DEAE celulosa Hex A	21
Azul de Cibacron sepharse	Tris-HCl pH 7,5	Pico 1 DEAE celulosa Hex C	0
Fosfoultrogel	MES pH 6,0	Pico 2 DEAE celulosa Hex A	31
Fosfoultrogel	Tris-HCl pH 7,5	Pico 1 DEAE celulosa Hex C	0
ATP-agarose	Fosfato de potasio pH 6,5	Pico 2 DEAE celulosa Hex A	0
ATP-agarose	Tris- HCl pH 7,5	Pico 2 DEAE celulosa Hex A	0

específica de 0,77 U/mg de proteína. Se controló la pureza de esta preparación, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida 10%, en condiciones desnaturalantes, observándose la presencia de una banda principal de proteína, de aproximadamente 100 kDa, cuyo tamaño molecular corresponde al de hexoquinasa A y dos bandas menores, una de 88 kDa y una más pequeña de 50 kDa, que podrían corresponder a degradación proteolítica de la especie principal (No mostrado).

3.- Determinación de reactividad inmunológica cruzada de extractos crudos de *D. melanogaster*.

Se realizaron experimentos de transferencia a membranas de nitrocelulosa (análisis de tipo Western blot) para detectar reacción inmunológica cruzada entre diferentes anticuerpos monoclonales producidos contra HK A de cerebro de rata y un extracto crudo de *D. melanogaster*. Se usaron cinco anticuerpos monoclonales que presentan mayor reactividad inmunológica cruzada con otras hexoquinasas A de mamíferos denominados como 2B, 3C, 5A, 13 y 20, además del monoclonal 21 que reconoce específicamente a hexoquinasa A de cerebro de rata. Como se muestra en la tabla 3, los anticuerpos monoclonales 3C, 5A y 13 presentan bandas débiles de reacción cruzada con proteínas del extracto crudo de *Drosophila* que por el tamaño molecular podrían corresponder a hexoquinasas.

En otros experimentos en que se usó un suero policlonal producido en conejo contra hexoquinasa A de rata, también se observaron bandas de reacción cruzada con varias proteínas del extracto crudo de mosca, algunas de las cuales podrían corresponder a hexoquinasas.

4.- Análisis genético molecular de los genes de hexoquinasas en *D. melanogaster* (cepa Oregón-R), mediante el uso de sondas heterólogas.

En la sección 1.7 de Materiales se muestra una lista de los plásmidos portadores de diferentes secuencias de cDNA que fueron utilizadas para realizar el análisis molecular. Se dispone de todas las secuencias clonadas que contienen cDNAs que codifican las

Tabla 3 : Reactividad inmunológica cruzada entre diferentes anticuerpos anti-HK A de cerebro de rata y extracto crudo de *D. melanogaster* (cepa Oregón-R).

Anticuerpo	Extracto crudo de cerebro de rata	Extracto crudo de <i>D melanogaster</i>	Hex A de rata semipurificada
Mab 2B	++	--	N.D.
Mab 3C	+++	+	N.D.
Mab 5A	+++	+	N.D.
Mab 13	+++	+	N.D.
Mab 20	++	--	N.D.
Mab 21	+++	--	+++
Pab-HK A	N.D.	+	+++

Mab = Anticuerpo monoclonal

Pab = Anticuerpo policlonal

+++ = Reacción cruzada fuerte

++ = Reacción cruzada moderada

+ = Reacción cruzada débil

-- = No se detecta reacción cruzada

N.D. = No determinado

hexoquinasas de rata (especie *Rattus norvegicus*) A, B, C y D (ó isoenzimas tipo I, II, III y IV). Estas secuencias fueron clonadas en el sitio *EcoRI*, ya sea de vectores de la serie pUC ó plásmido Bluescript, uno de sus derivados. El análisis contempló, además, el uso de sondas que portan secuencias de cDNA que codifican hexoquinasas PI, PII y glucoquinasa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, clonadas en los sitios *XbaI*, *EcoRI* y *HindIII* de los plásmidos pUC19, pBR328 y Ycp50, respectivamente. Además se muestran los tamaños moleculares de cada vector y del recombinante completo.

4.1 Análisis de hibridación de DNA genómico de *Drosophila* con las sondas de rata (*R. norvegicus*).

La figura 5 muestra los resultados obtenidos al analizar DNA genómico de *D. melanogaster*, digerido con *EcoRI* y usando como sonda el fragmento purificado de 3,6 kb que codifica la secuencia completa de HK A de cerebro de rata. Se puede observar una gran señal de hibridación en la zona que corresponde al fragmento de 3,6 kb del plásmido p18-1.4-7, cortado con *EcoRI* y usado como control positivo (canal 2), mientras que, no se observa señal de hibridación con DNA del fago λ , usado como estándar de tamaño molecular y como control negativo (canal 1). La misma sonda detectó dos señales en DNA genómico de rata, una banda de aproximadamente 3,3 kb y otra de 2,3 kb (canal 3), en tanto que en DNA genómico de mosca se aprecia una sola banda de aproximadamente 3,6 kb (canal 4).

La figura 6 muestra la hibridación del DNA genómico de *D. melanogaster* con la sonda que codifica la isoenzima B. La sonda hibrida intensamente con las distintas formas del plásmido HK II(3.6), digerido con *EcoRI*, representadas por los fragmentos de 2,7- 3,6 y 7,6 kb., el cual fue usado como control positivo (Figura 6, canal 2). Al mismo tiempo, detecta cuatro bandas de hibridación de aproximadamente 7,0-3,0-2,3 y 1,8 kb en DNA genómico de la misma especie (Figura 6, canal 3). Finalmente, con esta misma sonda se detectaron dos bandas, una de 3,5 kb y otra de 3,1 kb en DNA genómico de mosca (Figura 6, canal 4). Cuando la temperatura de hibridación se disminuye de 42°C a 37°C aparece una banda adicional, en *Drosophila*, de aproximadamente 8,5 kb (No mostrado).

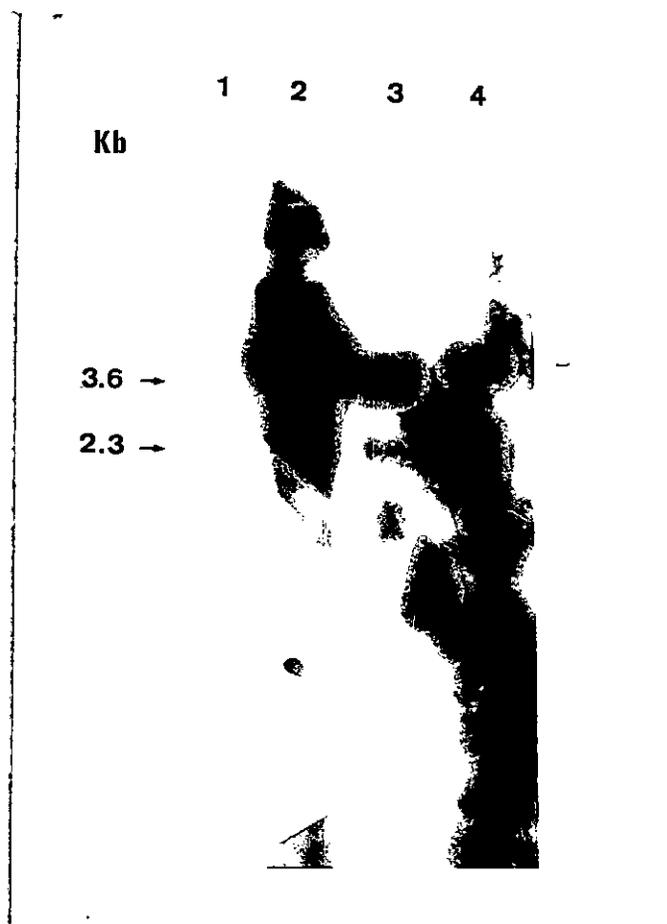


Figura 5 : Hibridación de DNA genómico total de *D. melanogaster* (cepa Oregón-R), usando como sonda el fragmento de cDNA de 3,6 Kb que codifica la secuencia completa de HK A de cerebro de rata. Canal 1 : 200 ng de DNA del fago λ digerido con *Hind*III como estándar de tamaño molecular. Canal 2 : 20 ng de DNA del plásmido p18-1.4-7 digerido con *Eco*RI. Canal 3 : 15 μ g de DNA genómico total de rata digerido con *Eco*RI. Canal 4 : 10 μ g de DNA genómico total de *D. melanogaster* digerido con *Eco*RI. La membrana fue hibridada en condiciones de alta estrictez con 100 ng de cDNA de HK A marcado con α - 32 P]-dCTP, a una radiactividad específica de $2,25 \times 10^9$ cpm/ μ g de DNA. Se lavó en condiciones de baja estrictez y se expuso a -70° C durante 21 horas.

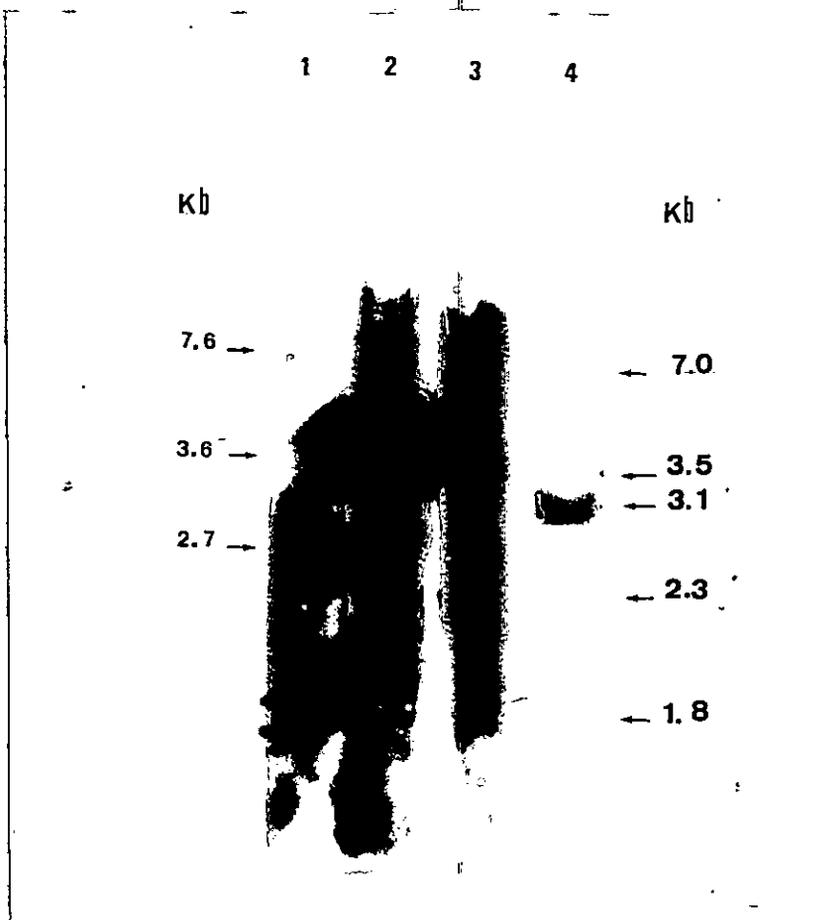


Figura 6 : Hibridación de DNA genómico total de *D. melanogaster* (cepa Oregón-R), usando como sonda el fragmento de cDNA de 3,6 kb que codifica la secuencia completa de HK B de músculo de rata. Canal 1 : 600 ng de DNA del fago λ digerido con *Hind*III y empleado com estándar de tamaño molecular. Canal 2 : 20 ng de DNA del plásmido HKII 3.6 digerido con *Eco*RI. Canal 3 : 20 μ g de DNA genómico total de rata digerido con *Eco*RI. Canal 4 : 15 μ g de DNA genómico total de *D. melanogaster* digerido con *Eco*RI. La membrana fue hibridada en condiciones de alta estrictez, con 120 ng de cDNA de HK B marcados con α - 32 P]- dCTP a una radiactividad específica de $2,45 \times 10^8$ cpm/ μ g de DNA, lavada en condiciones de baja estrictez y expuesta a -70° C durante 144 horas.

Adicionalmente, se realizó un análisis de DNA genómico utilizando la sonda que codifica 85% del gen de HK C a partir del extremo 5'. La sonda reveló una gran señal de hibridación con el fragmento de cDNA de 2,5 kb del plásmido pL4.1-h cortado con *EcoRI*, usado como control positivo (Figura 7, canal 1). En la misma figura, se observa que existe sólo una banda de aproximadamente 2,3 kb en DNA de rata (Figura 7, canal 3). Sin embargo, en DNA genómico de *Drosophila* no se observan bandas de hibridación (Figura 7, canal 2)

La figura 8 muestra el resultado de un experimento de hibridación realizado con 50 ng de cDNA de hígado de rata de 2,3 kb que codifica el gen completo de HK D (glucoquinasa). Se observa que la sonda reconoce muy fuertemente el control positivo representado por el fragmento de 2,3 kb del plásmido pB-GK2 cortado con *EcoRI* (canal 2). Además, reconoce bandas de 4,6-3,5 y 3,0 kb en el DNA genómico homólogo de rata (canal 3) y cuatro bandas de hibridación, más débiles, en DNA heterólogo de *Drosophila*, de aproximadamente 4,8-3,5-2,8 y 0,7 kb (canal 4).

4.2 Análisis de hibridación de DNA genómico de *Drosophila* con las sondas de levadura (*S. cerevisiae*).

La figura 9 muestra una hibridación realizada con 50 ng de cDNA del fragmento de 3,5 kb de hexoquinasa PI de *S. cerevisiae*. Tal como muestra la figura, la sonda hibrida intensamente con ambos fragmentos, de 3,5 y 2,7 kb, del plásmido pUC19/HXK1 digerido con *Xba I*, indicando que el fragmento de 3,5 kb purificado por GeneClean II y usado como sonda contiene secuencias contaminantes del vector (canal 4). Esta misma sonda, detecta dos zonas muy intensas de hibridación en DNA genómico de levadura, con un tamaño aproximado de 4,6 y 2,1 kb (canal 3). En cambio, sólo reconoce una banda muy débil de 5,4 kb en DNA de mosca (canal 2).

La sonda de cDNA de 3,8 kb, que codifica hexoquinasa PII de levadura, presenta una fuerte señal de hibridación con el mismo fragmento de 3,8 kb del plásmido pMR124 digerido con *EcoRI*, utilizado como control positivo (Figura 10, canal 4). La sonda, reconoce varias zonas de identidad en DNA genómico de levadura de aproximadamente 3,7-2,7-2,1-1,4 y 1,2 kb (Figura 10, canal 2). A diferencia de la sonda para hexoquinasa PI,

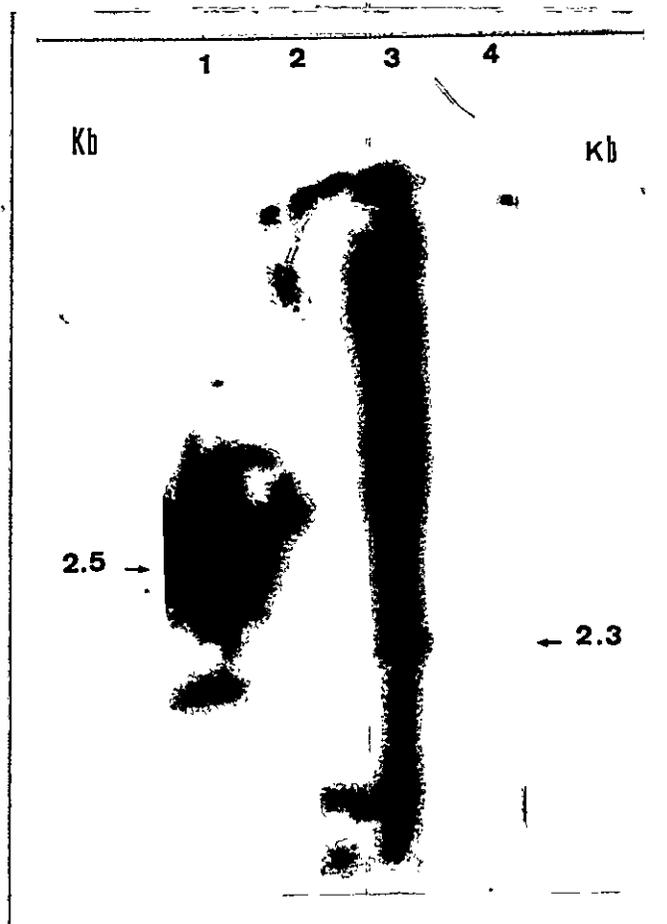


Figura 7 : Hibridación de DNA genómico total de *D. melanogaster* (cepa Oregón-R), usando como sonda el fragmento de cDNA de 2,5 Kb que codifica un 85% del extremo 5' de HK C de hígado de rata. Canal 1 : 10 ng de DNA del plásmido pL4.1-h digerido con *EcoRI*. Canal 2 : 10 μ g de DNA genómico total de *D. melanogaster* digerido con *EcoRI*. Canal 3 : 25 μ g de DNA genómico total de rata digerido con *EcoRI*. Canal 4 : 400 ng de DNA del fago λ digerido con *HindIII*, el cual sirvió como estándar de tamaño molecular. Se marcaron 25 ng de cDNA de HK C con α - ^{32}P -dCTP, a una radiactividad específica de $4,4 \times 10^9$ cpm/ μ g de DNA. La hibridación se realizó en condiciones de alta estrictez y los lavados post-hibridación en baja estrictez.

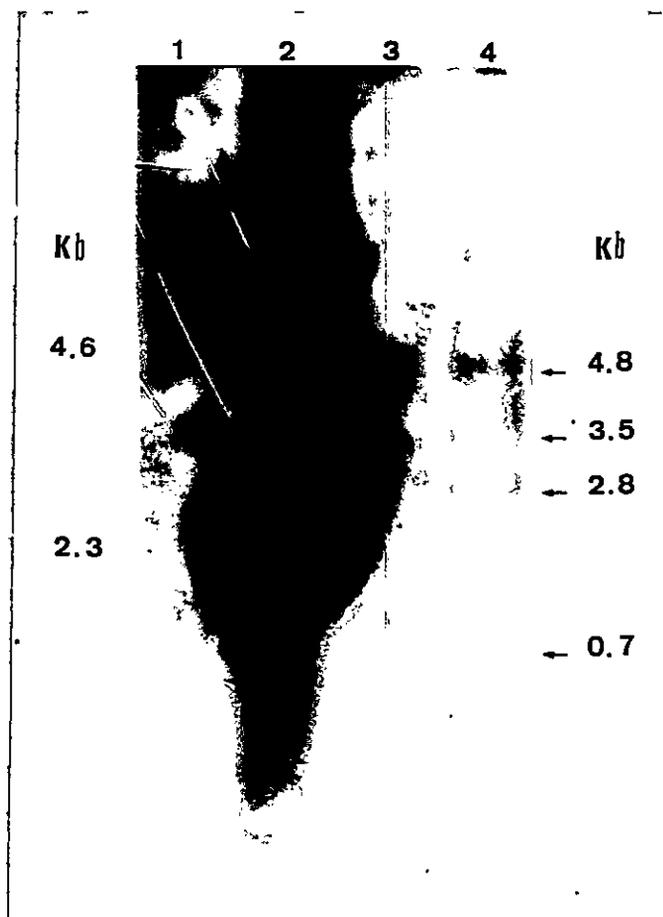


Figura 8 : Hibridación de DNA genómico total de *D. melanogaster* (cepa Oregón-R), usando como sonda el fragmento de cDNA de 2,3 kb que codifica la secuencia completa de HK D (glucoquinasa) de hígado de rata. Canal 1 : 200 ng de DNA del fago λ digerido con *Hind*III. Canal 2 : 10 ng de DNA del plásmido pB-GK2 digerido con *Eco*RI. Canal 3 : 15 μ g de DNA genómico total de rata digerido con *Eco*RI. Canal 4 : 10 μ g de DNA genómico total de *D. melanogaster* digerido con *Eco*RI.

La hibridación se realizó con 50 ng de cDNA de HK D marcados con α -[32 P]-dCTP, a una radiactividad específica de $3,2 \times 10^9$ cpm/ μ g de DNA. La membrana fue hibridada en condiciones de alta estrictez y lavada en condiciones de baja estrictez, exponiéndola a -70° C por 21 horas.

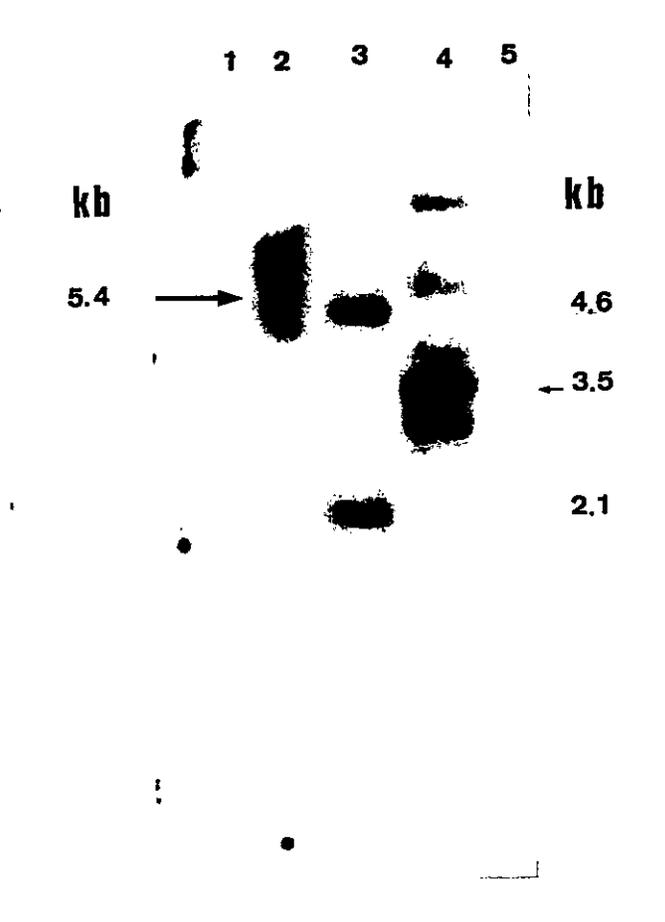


Figura 9 : Hibridación de DNA genómico total de *D. melanogaster* (cepa Oregón-R), usando como sonda el fragmento de cDNA de 3,5 kb que codifica HXK1 (PI) de *S. cerevisiae*. Canales 1 y 5 : 600 ng de DNA del fago λ digerido con *Hind* III, usado como estándar de tamaño. Canal 2 : 10 μ g de DNA genómico total de *D. melanogaster* digerido con *Eco*RI. Canal 3 : 5 μ g de DNA genómico total de levadura digerido con *Eco*RI. Canal 4 : 7 ng de DNA del plásmido pUC19/HXK1 digerido con *Xba*I. Se marcaron 50 ng de DNA de HXK 1 con α - 32 P]-dCTP a una radiactividad específica de $5,19 \times 10^8$ cpm/ μ g de DNA. La hibridación se llevó a cabo en condiciones estrictas, los lavados post-hibridación se realizaron en baja estrictez, con un tiempo de exposición de 53 horas a -70° C.

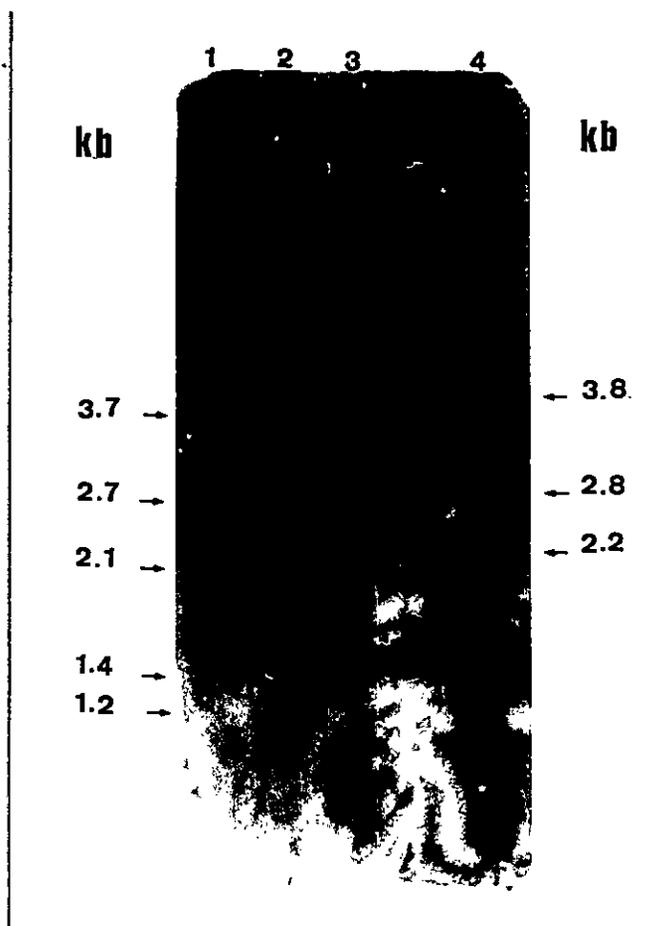


Figura 10 : Hibridación de DNA genómico total de *D. melanogaster* (cepa Oregón-R), usando como sonda el fragmento de cDNA de 3,8 kb que codifica la secuencia completa de HXK2 (PII) de *S. cerevisiae*. Canal 1 : 200 ng de DNA del fago λ digerido con *Hind*III, como estándar de tamaño molecular. Canal 2 : 5 μ g de DNA genómico total de levadura digerido con *Eco*RI. Canal 3 : 15 μ g de DNA genómico total de *D. melanogaster* digerido con *Eco*RI. Canal 4 : 10 ng de DNA del plásmido pMR 124/HXK2 digerido con *Eco*RI. La sonda se marcó con α - 32 P]-dCTP en presencia de 40 ng de cDNA de HXK 2. Se obtuvo una radiactividad específica de $4,2 \times 10^9$ cpm/ μ g de DNA. La hibridación se hizo en condiciones estrictas y los lavados post-hibridación en baja estrictez. La membrana fue expuesta a -70° C, por 19 horas.

la sonda para PII detecta, aunque muy débilmente, dos bandas de hibridación en DNA genómico de *Drosophila* de aproximadamente 2,8 y 2,2 kb (Figura 10 canal 3).

La figura 11, muestra una hibridación realizada con el fragmento de cDNA de 3,4 kb que codifica glucoquinasa de levadura. Como se puede observar la sonda de glucoquinasa, hibrida fuertemente con el fragmento de 3,4 kb que corresponde al inserto del plásmido YCp50/GLK1 digerido con *Hind*III y empleado como control positivo (canal 4). En DNA genómico homólogo de levadura se detecta una banda de 10,9 kb (canal 2). Sin embargo, no aparecen bandas de hibridación distinguibles en DNA genómico de mosca (canal 3).

4.3 Análisis de restricción de DNA genómico de *Drosophila*, usando el gen completo de HK B de rata.

Del análisis anterior realizado en DNA genómico de *Drosophila*, con las sondas disponibles, los más claros resultados se obtuvieron con la sonda que codifica la isoenzima B de rata. Además, de los genes de hexoquinasas de rata clonados, este gen es el mejor caracterizado a nivel de su secuencia de cDNA completa y de su estructura intrón-exón. Por tales razones se realizó un análisis de DNA genómico de *D. melanogaster*, digerido con varias enzimas de restricción y usando como sonda 100 ng de cDNA de 3,6 kb de HK B. En la figura 12, que muestra los resultados de este experimento, se puede apreciar una gran señal de hibridación con el fragmento de 3,6 kb del plásmido HKII(3.6) digerido con *Eco*RI, usado como control positivo (canal 2). Se usó un control representado por DNA genómico total de rata digerido con *Eco*RI (canal 3), donde se observa que la sonda detecta las mismas bandas de hibridación, de aproximadamente 7,0-3,0-2,3 y 1,8 kb, mostradas en la figura 6. La figura 12 muestra el patrón de bandas obtenido al cortar el DNA de mosca con las enzimas indicadas (Canales 4 al 15). Cada enzima produce un patrón característico, aún cuando la cantidad de DNA cortado es aproximadamente siempre la misma (15 µg) se producen grandes diferencias en las intensidades de las bandas. La tabla 4 resume los tamaños moleculares obtenidos al cortar con cada una de las enzimas empleadas en el estudio. Un análisis de la autorradiografía, mediante escaner y densitometría usando el programa Bioimage, reveló la existencia de más de un producto

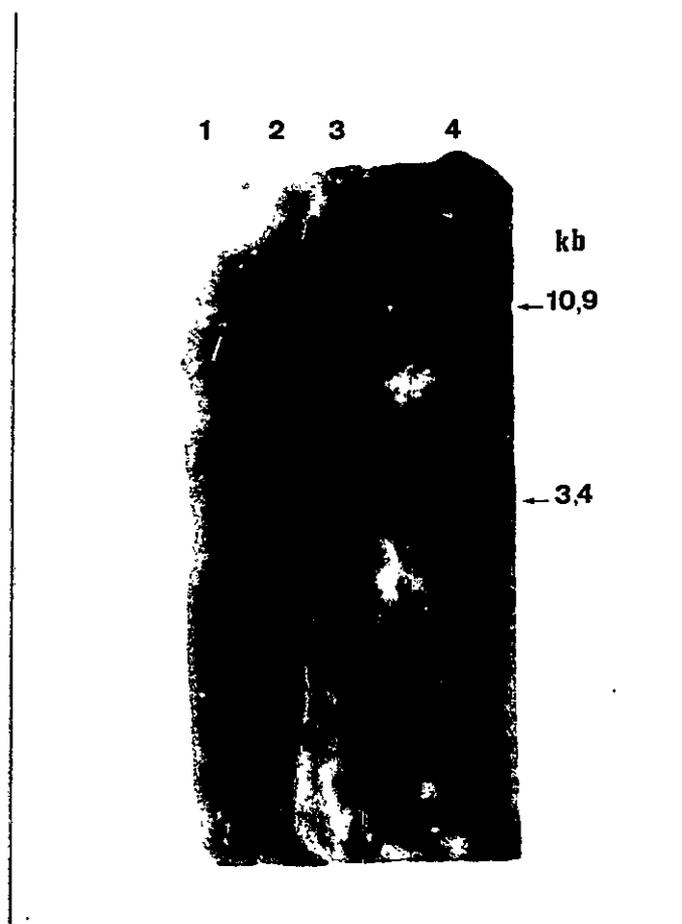


Figura 11 : Hibridación de DNA genómico total de *D. melanogaster* (cepa Oregón-R), usando como sonda el fragmento de cDNA de 3,4 kb que codifica la secuencia completa de glucoquinasa de *S. cerevisiae*. Canal 1 : 200 ng de DNA del fago λ digerido con *Hind*III, y usado como estándar de tamaño molecular. Canal 2 : 5 μ g de DNA genómico total de levadura digerido con *Eco*RI. Canal 3 : 15 μ g de DNA genómico total de *D. melanogaster* digerido con *Eco*RI. Canal 4 : 8 ng de DNA del plásmido YCp50/GLK1 digerido con *Hind*III.

Se marcaron 50 ng del con α - 32 P]-CTP, obteniéndose una radiactividad específica de 5×10^9 cpm/ μ g de DNA. La autorradiografía fue expuesta a -70° C, con pantalla de intensificación, durante 19 horas.

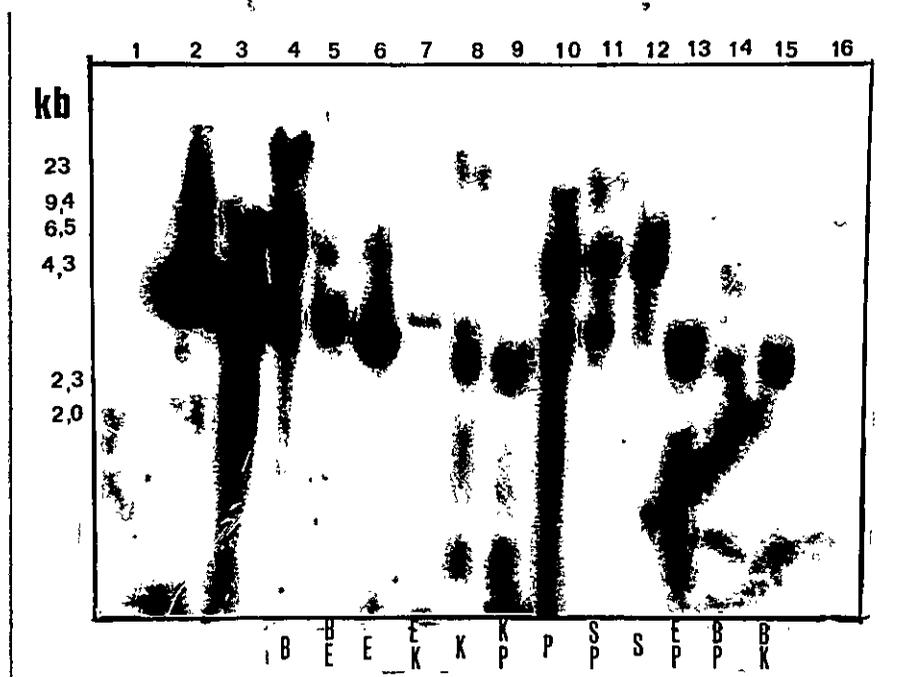


Figura 12 : Análisis de restricción de DNA genómico total de *D. melanogaster* (cepa Oregón-R), utilizando como sonda el fragmento purificado de cDNA que codifica la secuencia completa de HK B de rata. Canales 1 y 16 : 200 ng de DNA del fago λ digerido con *HindIII*, y empleado como estándar de tamaño molecular. Canal 2 : 8 ng de DNA del plásmido HK II(3.6) digerido con *EcoRI*. Canal 3 : 15 μ g de DNA genómico total de rata digerido con *EcoRI*. Canales 4 al 15 : aproximadamente 15 μ g de DNA genómico total de *D. melanogaster* digerido con: Canal 4) B. canal 5) B+E. Canal 6) E. Canal 7) E+K. Canal 8) K. Canal 9) K+P. Canal 10) P. Canal 11) S+P. Canal 12) S. Canal 13) E+P. Canal 14) B+P. Canal 15) B+K. B=*BamHI*, E=*EcoRI*, K=*KpnI*, P=*PstI*, S=*Sall*.

Se marcaron 100 ng de cDNA con α - ^{32}P -dCTP a una radiactividad específica de $3,2 \times 10^9$ cpm/ μ g de DNA. La hibridación se hizo en condiciones estrictas y los lavados post-hibridación en condiciones relajadas. La membrana fue expuesta a -70°C , durante 15 horas.

Tabla 4: Resumen de tamaños moleculares de los fragmentos obtenidos al cortar DNA genómico total de *D. melanogaster* con diferentes combinaciones de enzimas de restricción.

Canal	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
enzima	<i>Bam</i> HI	<i>Bam</i> HI + <i>Eco</i> RI	<i>Eco</i> RI	<i>Eco</i> RI + <i>Kpn</i> I	<i>Kpn</i> I	<i>Kpn</i> I + <i>Pst</i> I	<i>Pst</i> I	<i>Sal</i> I + <i>Pst</i> I	<i>Sal</i> I	<i>Eco</i> RI + <i>Pst</i> I	<i>Bam</i> HI + <i>Pst</i> I	<i>Bam</i> HI + <i>Kpn</i> I
tamaño (kb)	4,7 ^D 3,2	3,3 ^D	2,9 ^T	3,3	2,5 ^D	2,5 2,2 ^D	4,0 2,5	4,7 3,3	4,7 ^D	2,5 ^T	4,2	2,4 ^D

D = doblete

T = triplete

del mismo tamaño (dobletes y tripletes). Con estos resultados se construyeron los mapas parciales de restricción del DNA genómico de *Drosophila* mostrados en la figura 13. En ambos mapas, se observa que la zona detectada por la sonda completa abarca una región de aproximadamente 9 Kb (pero probablemente mayor) en DNA genómico de mosca, un tamaño demasiado grande para un gen de hexoquinasa que debiera estar codificado por una secuencia de aproximadamente 1,5 Kb, aún pensando en la existencia de intrones (Ver Discusión).

4.4 Análisis de hibridación del DNA genómico de otras especies de la familia *Drosophilidae*, usando el gen de HK B de rata.

Para determinar la presencia de secuencias similares a hexoquinasas en especies relacionadas a *Drosophila*, se realizó un experimento de hibridación, utilizando como sonda el gen de hexoquinasa B de rata. La figura 14 muestra los resultados de dicho experimento, donde se aprecia una intensa señal con el fragmento de 3,6 kb del plásmido HKII(3.6) cortado con *EcoRI* y usado como control positivo (canal 6). De la misma forma, el DNA genómico total de rata digerido con la misma enzima, muestra bandas de hibridación de 7,0-3,0-2,3 y 1,8 kb, antes descritas (canal 5). En DNA genómico de *Drosophila gaucha* se observan dos bandas de 6,8 y 3,5 kb (canal 2), mientras que *Drosophila pavani* muestra una banda similar de aproximadamente 3,5 kb y otra de 2,8 Kb. En *D. melanogaster*, la sonda detecta, muy intensamente, una banda de 3,5 kb. Estos resultados sugieren la existencia de polimorfismos en la organización estructural de los loci que codifican hexoquinasas en especies diferentes de esta familia de Dípteros.

5.- Análisis del DNA genómico de *D. melanogaster* mediante reacción de polimerización en cadena (PCR).

5.1 Construcción de los partidores para hexoquinasas.

La gran conservación de secuencia de nucleótidos y aminoácidos observada entre las hexoquinasas de mamíferos, permitió realizar un alineamiento múltiple de tres secuencias de cDNA que codifican estas isoenzimas, usando el programa computacional de análisis de secuencia del Genetic Computer Group (GCG) de la Universidad de Wisconsin.

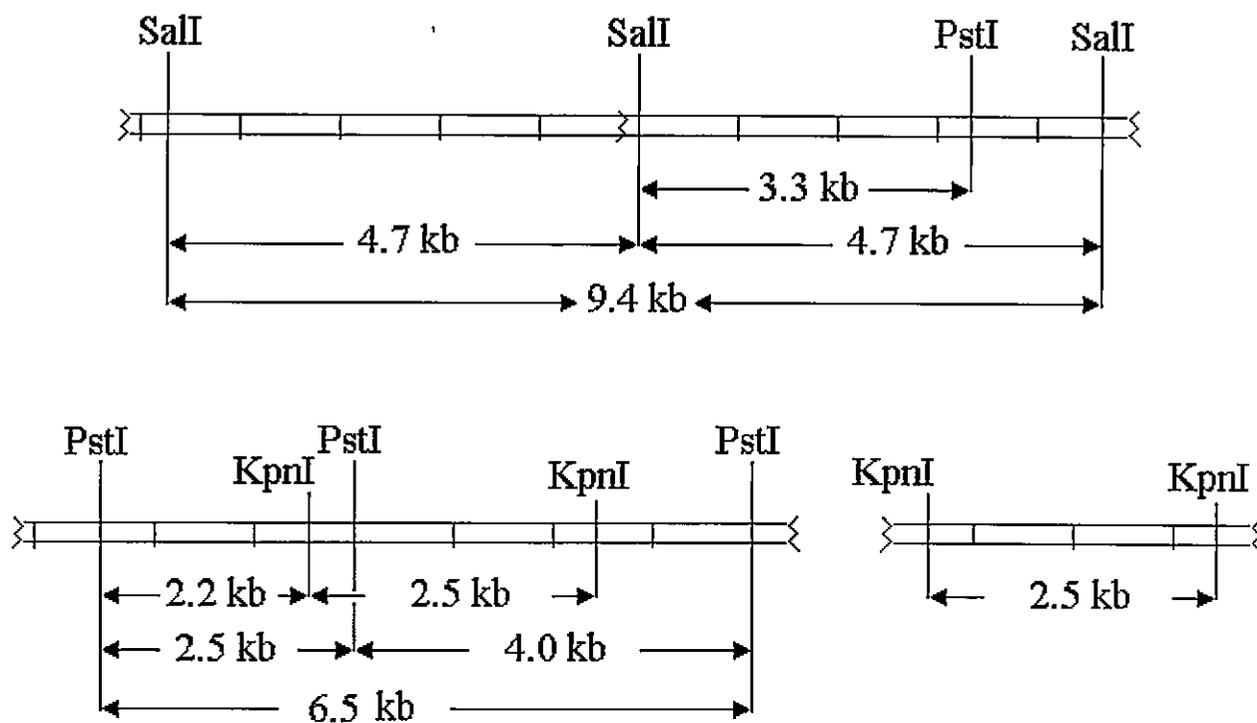


Figura 13 : Mapas de restricción heterólogos y parciales del DNA genómico de *D. melanogaster* (cepa Oregón-R), usando como sonda el fragmento de cDNA de 3,6 kb que codifica la secuencia completa de HK B de rata.

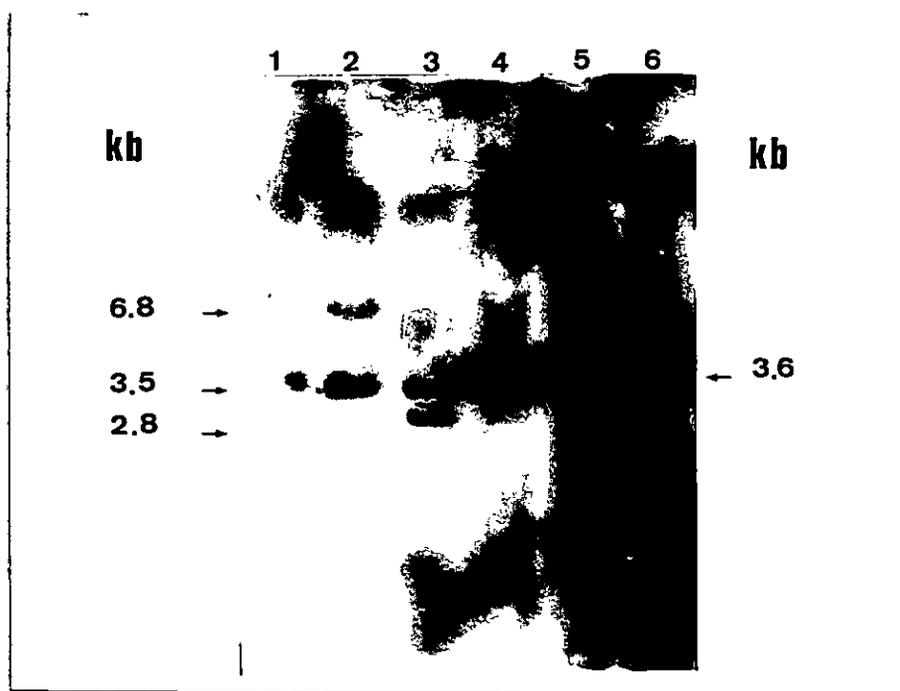


Figura 14: Hibridación de DNA genómico total de tres especies de la familia *Drosophilidae*, usando el fragmento de cDNA de 3,6 kb que codifica la secuencia completa de HK B de rata. Canal 1 : 200 ng de DNA del fago λ digerido con *Hind*III, usado como estándar de tamaño molecular. Canales 2, 3 y 4 : 15 μ g de DNA genómico total de *D. gaucha*, *D. pavani* y *D. melanogaster* digeridos con *Eco*RI. Canal 5 : 20 μ g de DNA genómico total de rata digerido con *Eco*RI. Canal 6 : 25 ng de DNA del plásmido HKII(3.6) digerido con *Eco*RI.

Se usaron 50 ng de cDNA de la sonda, marcados con α - 32 P]-dCTP, a una radiactividad específica de 8×10^8 cpm/ μ g de DNA. La hibridación se realizó en condiciones estrictas, los lavados en estrictez media y la membrana fue expuesta a -70° C por 48 horas.

La figura 15 muestra el alineamiento múltiple de las secuencias que codifican hexoquinasa A en toro (*Bos taurus*), humano (*Homo sapiens*) y rata (*Rattus norvegicus*). Como se puede apreciar, el apareamiento de secuencias, realizado por el programa GCG, las alinea a partir del nucleótido 136 hasta el nucleótido 2297. Antes y después de estos nucleótidos no es posible establecer semejanzas entre dichas secuencias. Las flechas gruesas indican la dirección de síntesis de los partidores y los números, a los lados de cada flecha, indican los nucleótidos a partir de los cuales se obtuvo el consenso. Al partidor obtenido a partir de la región conservada incluida entre los nucleótidos 316 y 338 se le denominó PHK 23-4 (partidor hexoquinasa de 23 nucleótidos y cuatro bases mal apareadas). El partidor PHK 26-2A se obtuvo de la región génica comprendida entre los nucleótidos 778 y 803, pero corresponde a una cadena complementaria a la hebra codificante de las secuencias alineadas. El partidor PHK 26-2B es exactamente complementario a la secuencia del partidor PHK 26-2A. El partidor PHK 14-1 fue obtenido a partir de los nucleótidos 1442 y 1429, que corresponden a otra región altamente conservada de los genes de hexoquinasa A. Para llevar a cabo las reacciones de amplificación se hicieron tres mezclas de partidores (Figura 15 A y B), las cuales teóricamente amplifican fragmentos de tamaño conocido en cDNA que codifica hexoquinasa A de rata. La mezcla I, formada por los partidores PHK 23-4 y PHK 26-2A, debiera amplificar un fragmento de 0,473 kb, al usar como templado dicho DNA. Con la mezcla II, constituida por los partidores PHK 26-2B y PHK 14-1, el tamaño del fragmento amplificado, con el mismo molde, es de 0,667 kb. La mezcla III, formada por los partidores PHK 23-4 y PHK 14-1, sintetiza un fragmento que corresponde a la suma de los fragmentos amplificados por las mezclas I y II y cuyo tamaño debería corresponder a 1,141 kb.

La tabla 5 muestra algunas características relevantes de los partidores sintetizados. Por ejemplo, a cada uno de ellos se le adicionaron en el extremo 5' los nucleótidos correspondientes a la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción *EcoRI*, de tal forma de facilitar el posterior clonamiento de los fragmentos amplificados. El número de bases mal apareadas oscila entre 4, para el partidor PHK23-4 y 1 para el partidor PHK14-1. Pero se tomó extrema precaución de situar estos nucleótidos mal

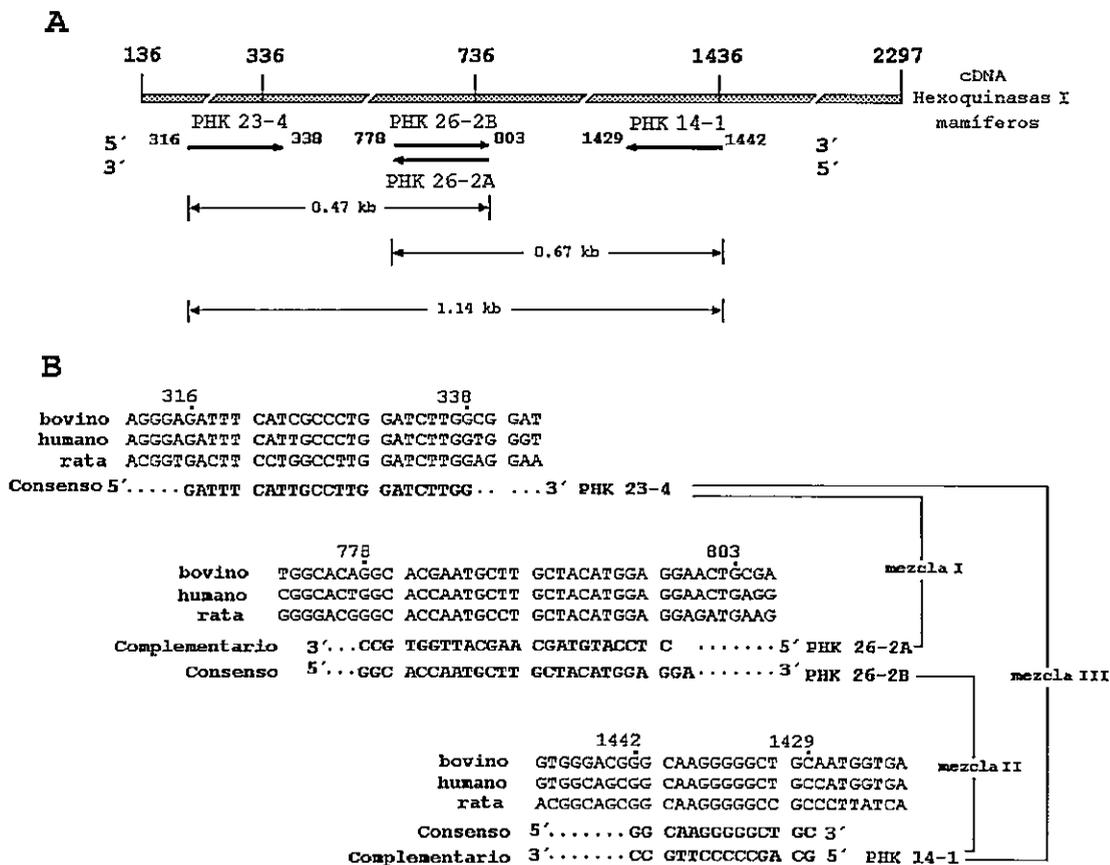


Figura 15 : Diseño de los partidores para hexoquinasa. A) Representación gráfica del alineamiento múltiple de secuencias de cDNA de hexoquinasa A de *Bos taurus* (toro), *Homo sapiens* (hombre) y *Rattus norvegicus* (rata), realizado con el programa GCG. B) Visión detallada de cada una de las regiones graficadas en A, que muestra el alineamiento de las tres secuencias, la secuencia consenso obtenida en cada caso y los partidores diseñados para las respectivas mezclas: PHK 23-4 y PHK 26-2A (MI), PHK 26-2B y PHK 14-1 (MII), PHK 23-4 y PHK 14-1 (MIII).

Tabla 5 : Características relevantes de los partidores sintetizados para hexoquinasas de mamíferos.

Nombre	Nº nucleot. Conservado	Secuencia	Bases mal apareadas	Longitud (pb)	% G+C	* Tm (°C)	** T° de alineam.
PHK23-4	23 (316-338)	5'gaattcga tttcattgcc ttggatcttgg3'	4	29	41	82	77
PHK26-2A	26 (803-778)	5'gaattcctc catgtagcaag cattggtgcc3'	2	30	50	90	85
PHK26-2B	26 (778-803)	5'gaattcgg caccaatgcttgc tacatggagga3	2	32	50	96	91
PHK14-1	14 (1442-1429)	5'gaattcgca gcccccttggc3'	1	20	65	66	61

*: Calculada según la fórmula $T_m (°C) = 4 (G+C) + 2 (A + T)$
(Hoelzel *et al*, 1992)

** : Calculada según la fórmula $T_a (°C) = 4 (G + C) + 2 (A + T) - 5$
(van Zeeland *et al*, 1989)

apareados por lo menos 10-12 bases antes del extremo 3' del partidador, para no obstaculizar el comienzo de la síntesis de DNA durante la amplificación. El partidador más corto mide 20 bases y el más largo es de 32 bases, longitud que debiera permitir el alineamiento más estrecho de las regiones altamente conservadas que fueron seleccionadas en el diseño de los mismos. Los porcentajes GC de cada uno de los partidadores sintetizados varían entre 41 y 60 %, y las temperaturas medias de fusión oscilan entre 66 y 96° C, permitiendo en algunos casos usar altas temperaturas de alineamiento y extensión en las reacciones PCR (Tabla 5).

5.2 Alineamiento de las mezclas de partidores I, II y III con los distintos moldes de DNA.

Con el objetivo de determinar las condiciones de amplificación adecuadas, con las cuales se obtienen los fragmentos de tamaño esperado, se realizaron una serie de experimentos en los que se ensayó un total de 10 programas de PCR distintos, usando las tres mezclas de partidores con los tres diferentes moldes de DNA. Para establecer las cantidades de sustrato adecuadas, las temperaturas y tiempos de desnaturación, alineamiento y extensión en cada ciclo y el número total de ciclos necesario para obtener el mejor rendimiento en cantidad del fragmento amplificado, cada una de las mezclas fue probada con cDNA de HK A de rata purificado, con DNA genómico de rata y mosca.

Se determinó que para obtener fragmentos de tamaño esperado y definido con cDNA de HK A y DNA genómico de rata se necesitaba trabajar con 10 ng y 1 µg de DNA, respectivamente. En cambio, con 100 ng de DNA genómico de *D. melanogaster* se obtuvo amplificación específica del fragmento de interés. La tabla 6 resume los resultados obtenidos y detalla los protocolos PCR adecuados para cada mezcla y tipo de DNA, especificando los parámetros óptimos de ciclaje.

a) Alineamiento de las diferentes mezclas de partidores al fragmento de cDNA de HK A de rata purificado.

Debido a que se conoce la secuencia completa del gen de HK A de rata, se puede determinar teóricamente los tamaños de los fragmentos que debe amplificar cada mezcla. La figura 16 A muestra el tamaño de los productos amplificados al usar un protocolo básico de PCR (Tabla 6, programa 1) con las mezclas de partidores I, II y III

Tabla 6: Tamaño (kb) y cantidad aproximada (ng totales) de los fragmentos amplificados, con las mezclas de partidores I, II y III, usando como molde 10 ng del fragmento de cDNA de HK A purificado (programa 1), 1 µg de DNA genómico de *R. norvegicus* (programa 2) y 100 ng de DNA genómico de *D. melanogaster* (programa 3).

Descripción del programa N°	Mezcla I (kb) (ng t)	M.A.I.	Mezcla II (kb) (ng t)	M.A.I.	Mezcla III (kb) (ng t)	M.A.I.
1 35 ciclos DI=95°Cx3' D=94°Cx30'' A=55°Cx30'' E=72°Cx3' EF=72°Cx10'	0,47 5000 0,62 15 0,71 15 1,19 15 1,35 15 1,6 30 2,2 10	++	0,67 6000 1,47 10 1,75 10	++	1,14 6000 2,2 10	++
2 40 ciclos DI=94°Cx5' D=94°Cx80'' A=37°Cx2' E=65°Cx3' EF=65°Cx7'	0,47 300 0,70 9	+++	(--)	+++	0,38 a 100 0,71	+++
3 40 ciclos DI=94°Cx5' D=94°Cx1' A=45°Cx1' E=65°Cx1' EF=65°Cx7'	0,44 150 0,54 150 0,56 120 0,64 300	+	0,46 20 0,55 500 0,67 500 1,14 25 1,6 20	+++	N.D.	N.D.

N.D. = No determinado

M.A.I. = Magnitud de la Amplificación Inespecífica:

+++ = gran cantidad

++ = moderada cantidad

+ = poca cantidad

(--) = amplificación inespecífica

(ng t) = nanogramos totales

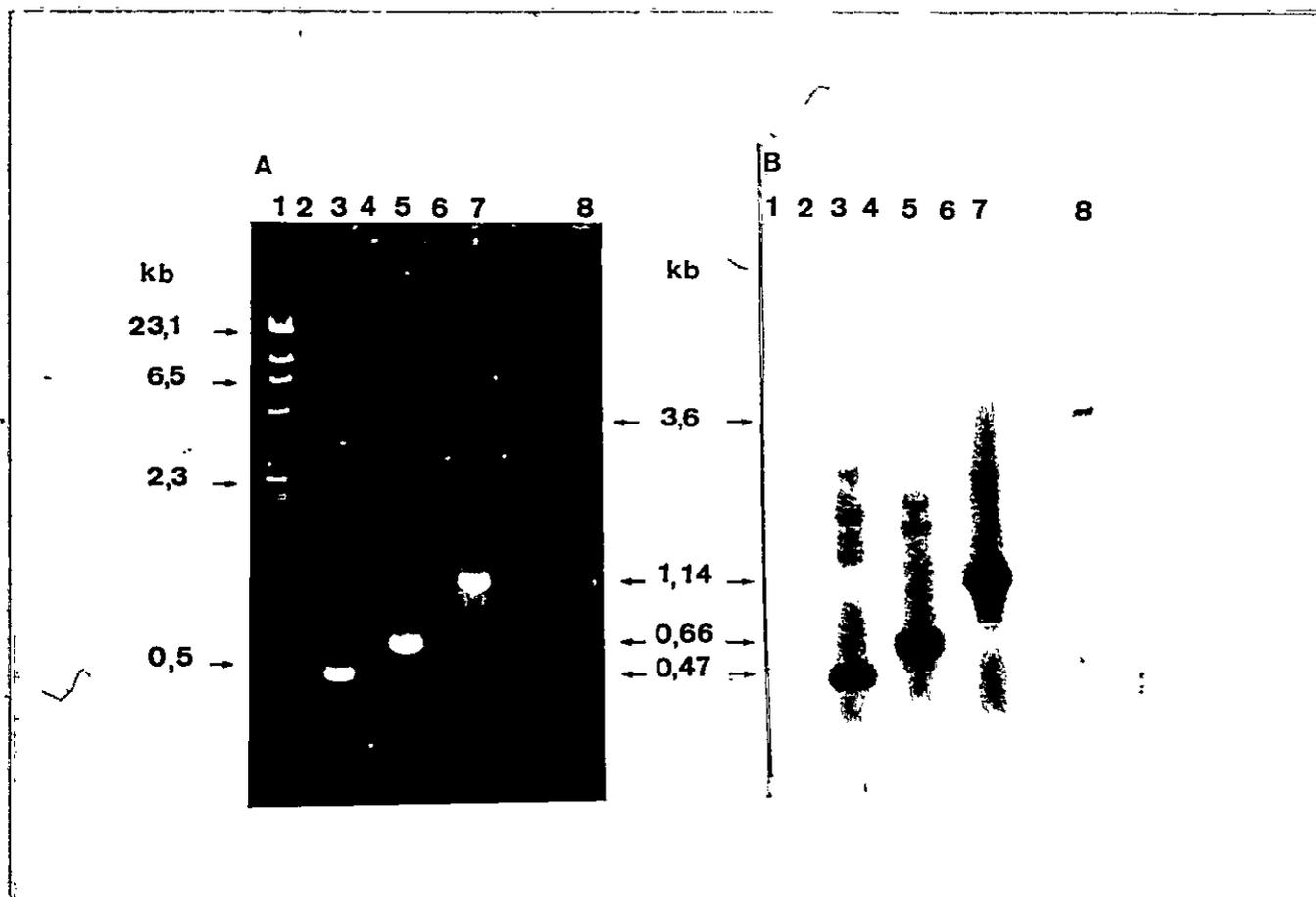


Figura 16. Análisis mediante PCR e hibridación de los productos amplificados con las tres mezclas de partidores y cDNA de HK A de rata como molde.

A) : Gel de agarosa al 1,4%. Canal 1 : 600 ng de DNA del fago λ digerido con *Hind*III, como estándar de tamaño molecular. Canales 2 y 3 : Fragmentos amplificados con la mezcla I de partidores sin cDNA y con 10 ng de cDNA de HK A, respectivamente. Canales 4 y 5 : Fragmentos amplificados con la mezcla II de partidores sin cDNA y con 10 ng de cDNA de HK A, respectivamente. Canales 6 y 7: Fragmentos amplificados con la mezcla III de partidores sin cDNA y con 10 ng de cDNA de HK A, respectivamente. Canal 8 : 3 ng de fragmento de cDNA de HK A de rata purificado.

B) Hibridación del gel mostrado en la parte A de la figura, usando como sonda 1,2 μ g del fragmento purificado de HK A de rata marcado con biotina.

La PCR se realizó en 25 μ l de reacción en las siguientes condiciones: Desnaturalización Inicial (DI) = 95°C x 3', 35 ciclos de Desnaturalización (D) = 94°C x 30''; Alineamiento (A) = 55°C x 30''; Extensión (E) = 72°C x 3' y Extensión Final (EF) = 72°C x 10' (Tabla 6, programa 1).

usando como molde cDNA purificado del fragmento que codifica HK A de cerebro de rata. Se puede observar efectivamente, que la mezcla I amplifica un fragmento de aproximadamente 0,47 kb (Figura 16 A, canal 3). La mezcla II amplifica un fragmento de 0,67 kb (Figura 16 A, canal 5) y la mezcla III sintetiza un fragmento de aproximadamente 1,14 kb que correspondería a la suma de los fragmentos amplificados por las mezclas I y II (Figura 16 A, canal 7). Las mezclas de partidores no amplifican fragmentos de tamaño definido cuando se realiza la reacción sin cDNA molde (Figura 16 A, canales 2, 4 y 6).

La figura 16 B muestra la hibridación de la membrana del gel mostrado en la parte A, utilizando como sonda el fragmento de cDNA de 3,6 kb de HK A. La sonda reconoce muy intensamente los fragmentos de 0,47 kb y 1,6 kb, sintetizados con la mezcla I, además detecta otros cinco fragmentos, apenas perceptibles en el gel, cuyos tamaños son 0,62-0,71-1,19-1,35 y 2,2 kb (Figura 16 A y B, canal 3 y Tabla 6, programa 1). La sonda HK A también reconoce el fragmento principal de 0,67 kb, sintetizado por la mezcla II, junto con otros dos fragmentos de 1,47 y 1,75 kb (Figura 16 A y B, canal 5 y Tabla 6, programa 1). De la misma manera, el fragmento de 1,14 kb, amplificado con la mezcla III, es intensamente reconocido por la sonda, al igual que otro fragmento de 2,2 kb (Figura 16 A y B, canal 7 y Tabla 6, programa 1). La sonda también detecta una señal importante con el fragmento homólogo de HK A, usado como control positivo, a pesar de la pequeña cantidad depositada en el gel (Figura 16 A y B, canal 8). Los fragmentos de tamaño superior a los esperados, amplificados con cada una de las mezclas de partidores, corresponderían a formas multiméricas de éstos.

b) Alineamiento de las diferentes mezclas de partidores al DNA genómico homólogo de *R. norvegicus*.

La tabla 6 muestra que, con el protocolo 2 y la mezcla I de partidores, se obtiene el fragmento de tamaño esperado de 0,47 kb, además de otro fragmento de 0,7 kb en menor cantidad.

Con la mezcla II de partidores (Tabla 6, programa 2) se aprecia solamente una moderada cantidad de amplificación inespecífica [amplificación de DNA sin amplificación de fragmentos de tamaño definido]. Sin embargo, al acortar el número de ciclos de 40 a 35 en

el protocolo 2 (No mostrado en la Tabla 6), se amplifican fragmentos de 0,38-0,47 y 0,62 kb en cantidades similares. Aceptando un margen pequeño de error en las mediciones, suponemos que el fragmento de 0,62 kb corresponde al fragmento esperado de 0,67 kb.

Con la mezcla de partidores III (Tabla 6, programa 2) se obtiene una serie de cinco fragmentos que varían en tamaño entre 0,38 y 0,71 kb. No se observa el fragmento de 1,14 de tamaño esperado.

c) Alineamiento de las diferentes mezclas de partidores al DNA genómico heterólogo de *D. melanogaster*.

En la tabla 6 se observa que, al usar como molde 100 ng de DNA genómico de *D. melanogaster*, con la mezcla I de partidores y el programa 3 se amplifican cuatro fragmentos de aproximadamente 0,44-0,54-0,56 y 0,64 kb, de los cuales el fragmento de 0,44 kb debe corresponder al fragmento esperado de 0,47 kb (ver sección 5.3 de Resultados: Figura 17, canal 3).

Con la mezcla de partidores II, en las mismas condiciones antes mencionadas (Tabla 6, programa 3), aparecen cinco fragmentos entre 0,46 a 1,6 kb, dentro de los cuales hay amplificación del fragmento de tamaño esperado de 0,67 kb (ver sección 5.3 de Resultados: Figura 17, canal 7).

5.3 Análisis de hibridación de los productos amplificados en DNA genómico, usando como sonda el fragmento de cDNA de 3,6 kb que codifica HK A de rata.

Como muestra la figura 17, la mezcla de partidores I y II sintetizan fragmentos de tamaño definido, además de amplificación inespecífica, tanto en DNA genómico homólogo de rata como en DNA genómico heterólogo de *D. melanogaster* (ver además Tabla 6, programas 2 y 3). En la parte A de la figura se observa que con la mezcla I de partidores se obtienen 4 fragmentos de 0,44-0,54-0,56 y 0,64 kb en DNA de *Drosophila* (canal 3) y un solo fragmento de aproximadamente 0,47 kb en DNA de rata (canal 4). La mezcla II, amplifica 5 fragmentos de 0,46-0,55-0,67-1,14 y 1,6 kb en DNA genómico de mosca (canal 7) y sólo un fragmento de 0,47 kb en el DNA homólogo de rata (canal 8). Con el objeto de identificar en ambos DNA's genómicos los fragmentos que contienen secuencias semejantes a HK A se realizó una hibridación de este gel, usando como sonda el fragmento

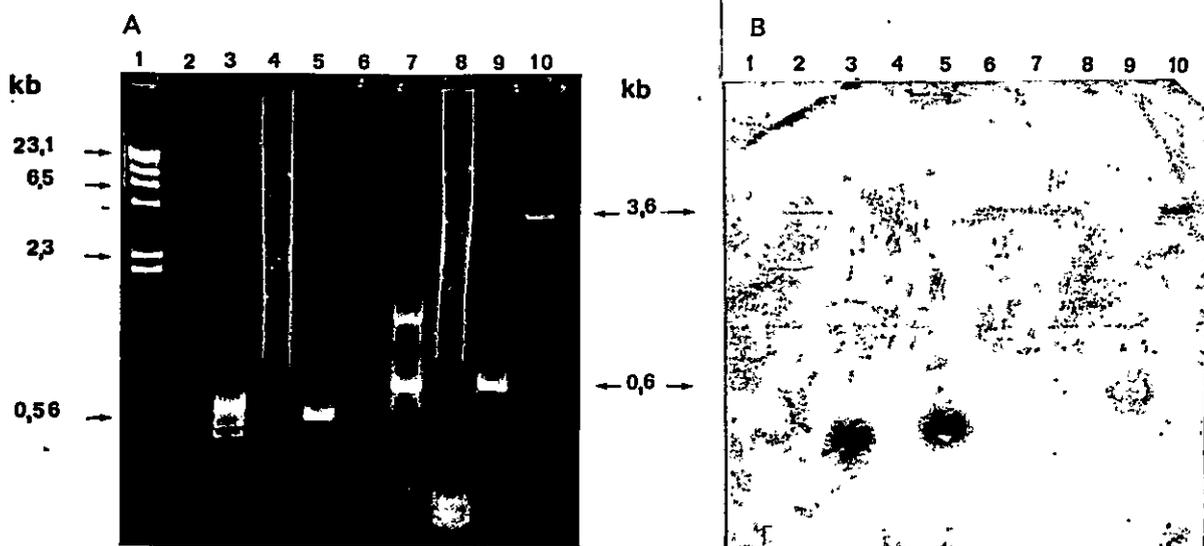


Figura 17: Análisis mediante PCR e hibridación de los productos amplificados con las mezclas I y II de partidores en DNA genómico de rata y *D. melanogaster*.

A) Gel de agarosa al 1,4 %. Canal 1: 600 ng de DNA del fago λ digerido con *Hind*III, como estándar de tamaño molecular. Canales 2 y 6: Controles de las reacciones amplificadas con la mezcla I y II de partidores sin DNA templado, respectivamente. Canales 3, 4, 5 y 7, 8, 9: Reacciones amplificadas con las mezclas de partidores I y II en 100 ng de DNA genómico de *D. melanogaster*, 1 μ g de DNA genómico de rata y 10 ng de cDNA de HK A, respectivamente. Canal 10: Aproximadamente 10 ng de cDNA de HK A purificado. B) Hibridación de la membrana del gel mostrado en A con 180 ng de cDNA de HK A marcado con biotina.

La PCR se realizó en 25 μ l de reacción en las siguientes condiciones: DI = 94°C x 5', 40 ciclos de D = 94°C x 1'; A = 45°C x 1'; E = 65°C x 1' y EF = 65°C x 7' (Tabla 6, programa 3).

de cDNA completo de 3,6 kb que codifica la isoenzima A de rata. Se marcaron 180 ng de DNA de la sonda con biotina y los pasos de hibridación y lavados post-hibridación se realizaron en condiciones estrictas. Como se aprecia en figura 17 B, la sonda reconoce una zona amplia que comprende los fragmentos de 0,54-0,56 y 0,64 kb, amplificados con la mezcla I, en DNA genómico de *Drosophila* (canal 3). El fragmento más pequeño y de menor intensidad de 0,44 kb no es reconocido por la sonda (canal 3). HK A reconoce intensamente un fragmento de aproximadamente 0,47 kb sintetizado, con el cDNA de HK A de rata como sustrato y con la mezcla I de partidores en la reacción PCR (canal 5). La sonda además reconoce débilmente el fragmento de 0,67 kb sintetizado por la mezcla II de partidores con 100 ng de DNA genómico de mosca (canal 7), pero no se observan bandas de hibridación con el producto amplificado con 1 µg de DNA genómico de rata (canal 8). El fragmento de aproximadamente 0,67 kb sintetizado con cDNA de HK A como molde, y con la misma mezcla II, es intensamente reconocido por la sonda (canal 9), al igual que el control positivo representado por 10 ng del fragmento de HK A purificado (canal 10). No se aprecian señales en las muestras control de la reacción de amplificación que no contienen DNA templado (canales 2 y 6).

Posteriormente, se procedió a purificar, a partir de un gel, el fragmento PCR de 0,67 kb amplificado por la mezcla II con 100 ng de DNA genómico de *Drosophila* y se realizó una nueva prueba de hibridación de dicho fragmento con la sonda completa de HK A. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 18. En la parte A de la figura, se observa un gel de agarosa con el fragmento PCR de 0,67 kb, purificado por el método de afinidad a sílica (canal 2), y en el canal 3 el control positivo que corresponde a 10 ng del fragmento de 3,6 kb de HK A purificado. La figura 18 B muestra la membrana del gel hibridado, en condiciones de alta estrictez, con 100 ng de DNA del fragmento de 3,6 kb de HK A, marcado con biotina. Claramente se aprecia que la sonda reconoce el fragmento de 3,6 kb de HK A, además del fragmento PCR de 0,67 kb purificado de *Drosophila*.

La figura 19 A muestra un experimento confirmatorio, en el que se incluyó la reacción de amplificación completa, que contiene todos los fragmentos amplificados con la

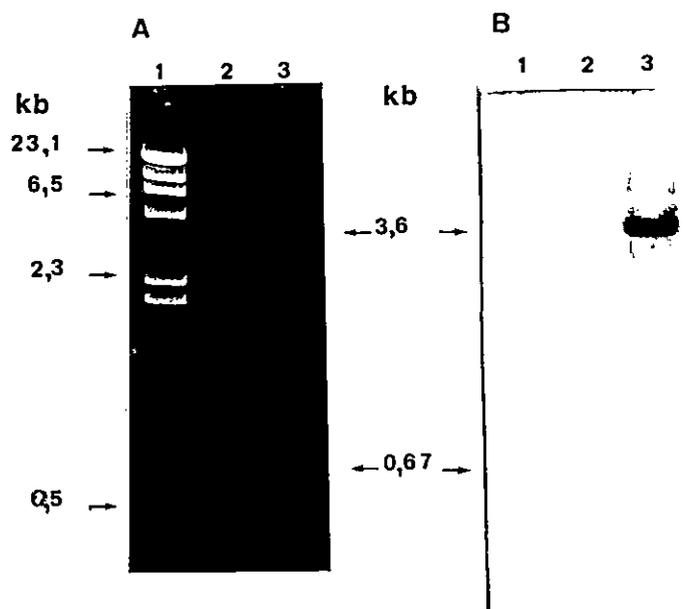


Figura 18 : Análisis de hibridación del fragmento PCR de 0,67 kb de *D. melanogaster* con cDNA de HK A de rata.

A) Gel de agarosa al 1,4 %. Canal 1 : 600 ng de DNA del fago λ digerido con *Hind*III, como estándar de tamaño molecular. Canal 2 : 50 ng del fragmento PCR de 0,67 kb de *D. melanogaster* purificado. Canal 3 : 10 ng de cDNA de HK A de rata purificado.

B) Hibridación del gel mostrado en A con 100 ng de cDNA de HK A marcado con biotina.

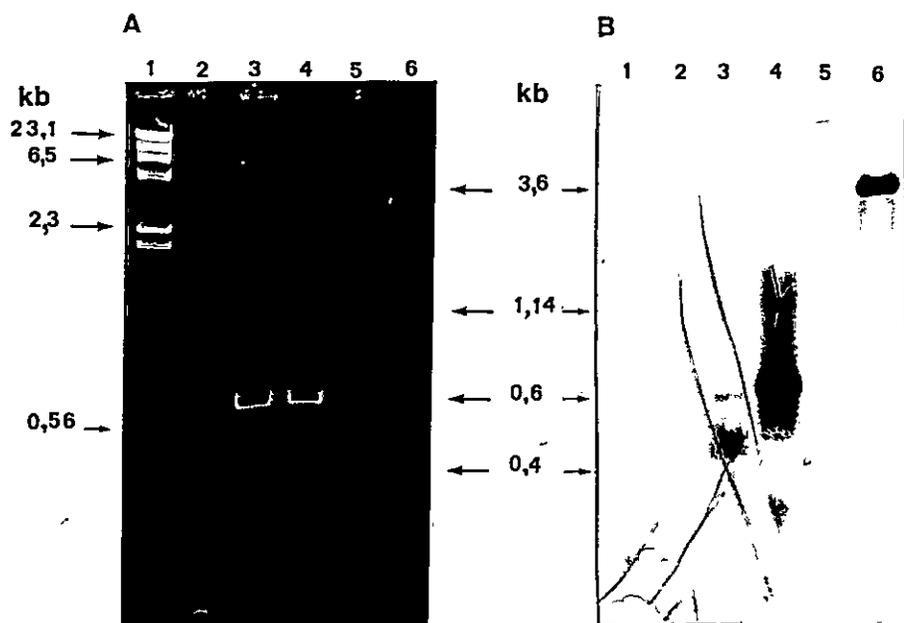


Figura 19 : Análisis mediante PCR e hibridación, con cDNA de HK A de rata, de los productos amplificados con la mezcla II de partidores, en DNA genómico de *D. melanogaster* y rata

A) Gel de agarosa al 1,4 %. Canal 1 : 600 ng de DNA del fago λ digerido con *HindIII*, como marcador de tamaño molecular. Canal 2 : Control de la reacción de amplificación sin DNA templado. Canal 3 : Amplificación de 100 ng de DNA genómico de *D. melanogaster*. Canal 4 : Amplificación de 10 ng de cDNA de HK A de rata. Canal 5 : Aproximadamente 10 ng de DNA del fragmento PCR de 0,67 kb de *Drosophila* purificado. Canal 6 : 10 ng de cDNA de HK A de rata purificado.

B) Hibridación del gel mostrado en A con 180 ng de cDNA de HK A de rata marcado con biotina. La PCR se realizó en 25 μ l de reacción en las siguientes condiciones : DI = 94°C x 5', 40 ciclos de D = 94°C x 1' ; A = 40°C x 1' ; E = 65°C x 1' y EF = 65°C x 7'.

mezcla II a partir de DNA de *Drosophila*, cuyos tamaños son 0,46-0,67 y 1,14 kb (canal 3), el fragmento PCR de 0,67 kb de rata, amplificado con esta misma mezcla en presencia de 10 ng de cDNA de HK A (canal 4), 10 ng del fragmento PCR de 0,67 kb de *Drosophila*, amplificado por la mezcla II con 100 ng de DNA genómico de mosca (canal 5) y 10 ng de cDNA de HK A purificado (canal 6). La figura 19 B muestra las señales de hibridación reveladas en el gel presentado en la parte A, con 180 ng del fragmento de cDNA de 3,6 kb que codifica HK A, marcado con biotina. Al observar el canal 3, se confirma que la sonda reconoce el fragmento de 0,67 kb, pero además hibrida con el fragmento más pequeño de 0,46 kb. Se observan señales de hibridación intensas en el canal 4 y 6, representadas por el fragmento homólogo esperado de 0,67 kb con esta mezcla y por el fragmento de 3,6 kb de HK A purificado. En cambio la señal observada con el fragmento PCR de 0,67 kb de *Drosophila* es bastante débil, posiblemente debido a la baja cantidad total depositada y a que se trata de una secuencia heteróloga (canal 5). Finalmente, se decidió clonar el fragmento de 0,67 kb, reconocido por HK A, ya que su mayor tamaño molecular facilitaría manipulaciones futuras.

5.4 Clonamiento del fragmento de 0,67 kb de *D. melanogaster* amplificado por la mezcla II de partidores en DNA genómico.

El DNA de este fragmento, sin cortar con *EcoRI*, fue clonado en el sitio *HincII* del vector de expresión plásmido Bluescript SK⁻. Se realizaron varias mezclas de ligado conteniendo distintas proporciones de DNA del inserto a DNA del vector y con ellas se transformó la cepa DH5 α de *E. coli*. Se obtuvo un total de 11 colonias blancas transformantes. Se realizó una preparación de DNA plasmidial de cada una de estas colonias y se verificó, mediante electroforesis en geles de agarosa, el tamaño y la migración del DNA plasmidial extraído. El análisis de ácidos nucleicos reveló que sólo tres colonias, denominadas D1.1- E1.4 y E2.3 presentaban DNAs plasmidiales con un tamaño molecular superior al plásmido original de clonamiento (2,9 kb) Posteriormente, se realizó un análisis electroforético, en un gel de agarosa al 0,8%, del DNA de estas colonias digerido con *EcoRI*. Los resultados de dicha digestión se muestran en la figura 20. La colonia D1.1 tiene un fragmento de 4 kb correspondiente al vector y un fragmento de 1,7 kb correspondiente

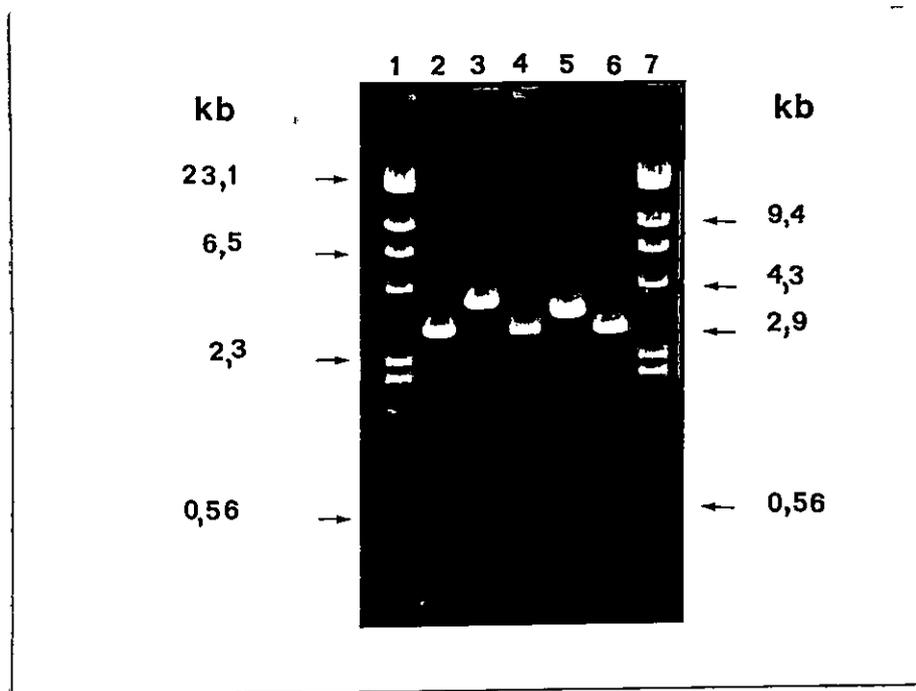


Figura 20 : Análisis de restricción del DNA plasmidial de las colonias obtenidas en el experimento de transformación con DNA del fragmento PCR de 0,67 kb de *Drosophila*. Canales 1 y 7 : 400 ng de DNA del fago λ digerido con *Hind*III, como marcador de tamaño molecular. Canales 2 y 6 : 200 ng de DNA del plásmido Bluescript SK digerido con *Eco*RI. Canal 3 : 250 ng de DNA plasmidial de la colonia transformante D1.1 digerido con la misma enzima. Canal 4 : 200 ng de DNA plasmidial de la colonia E1.4 digerido con *Eco*RI. Canal 5 : 250 ng de DNA plasmidial de la colonia E2.3 digerido con la misma enzima.

al inserto (canal 3). La colonia E2.3 presenta un vector de 3,3 kb y un inserto de 1,5 kb (canal 5). Debido a estos resultados, ambas colonias fueron descartadas como clones positivos. Sin embargo, la colonia E1.4 tiene un fragmento lineal de 2,9 kb que coincide con el tamaño molecular del plásmido Bluescript digerido con *EcoRI* (canales 2 y 6) y un fragmento más pequeño de 0,5 kb aproximadamente (canal 4).

Como este fragmento de 0,5 kb es más pequeño que el tamaño estimado del fragmento PCR de *Drosophila*, se corrieron las muestras de DNA plasmidial de la colonia E 1.4, en un gel de agarosa más concentrado (1,4%), con el objeto de detectar el posible fragmento ausente más pequeño, suponiendo que el inserto tuviera un sitio de restricción interno *EcoRI*. La figura 21 A muestra aproximadamente 300 ng de DNA del plásmido Bluescript sin digerir (canal 2), la misma cantidad de la forma linearizada del vector digerido con *EcoRI* (canal 3), aproximadamente 800 ng de DNA del plásmido pBS-E1.4 sin digerir (canal 4), la misma cantidad de dicho vector digerido con *EcoRI* (canal 5) y finalmente 30 ng de DNA del fragmento PCR de 0,67 kb de *Drosophila* amplificado con la mezcla II. En la figura se aprecia, efectivamente, que el DNA del plásmido Bluescript E1.4 digerido con *EcoRI* presenta tres fragmentos uno de 2,9 kb correspondiente al vector lineal y otros dos más pequeños de aproximadamente 0,45 y 0,22 kb cuya suma restablece el tamaño molecular del fragmento PCR de aproximadamente 0,67 kb de *Drosophila*. Según estos resultados se verifica que el fragmento clonado de 0,67 kb contiene, en uno de sus extremos, un sitio de reconocimiento para la enzima *EcoRI*.

5.5 Análisis del plásmido pBS-E1.4 mediante digestión con enzimas de restricción.

Para corroborar que el plásmido pBS-E1.4 realmente llevaba el inserto de 0,67 kb proveniente de *Drosophila* se realizó un análisis de restricción adicional del plásmido. Para ello, aproximadamente 1 µg de DNA del recombinante fue digerido simultáneamente con las enzimas de restricción *XhoI* y *ClaI*, cuyas secuencias de reconocimiento se ubican en cada lado, muy cercanas al sitio *HincII* dentro de la secuencia de policlonamiento. De esta manera la digestión con ambas enzimas permitiría recuperar el fragmento PCR de 0,67 kb intacto si es que no hay sitios internos *XhoI* y *ClaI*. La figura 21 B muestra los resultados

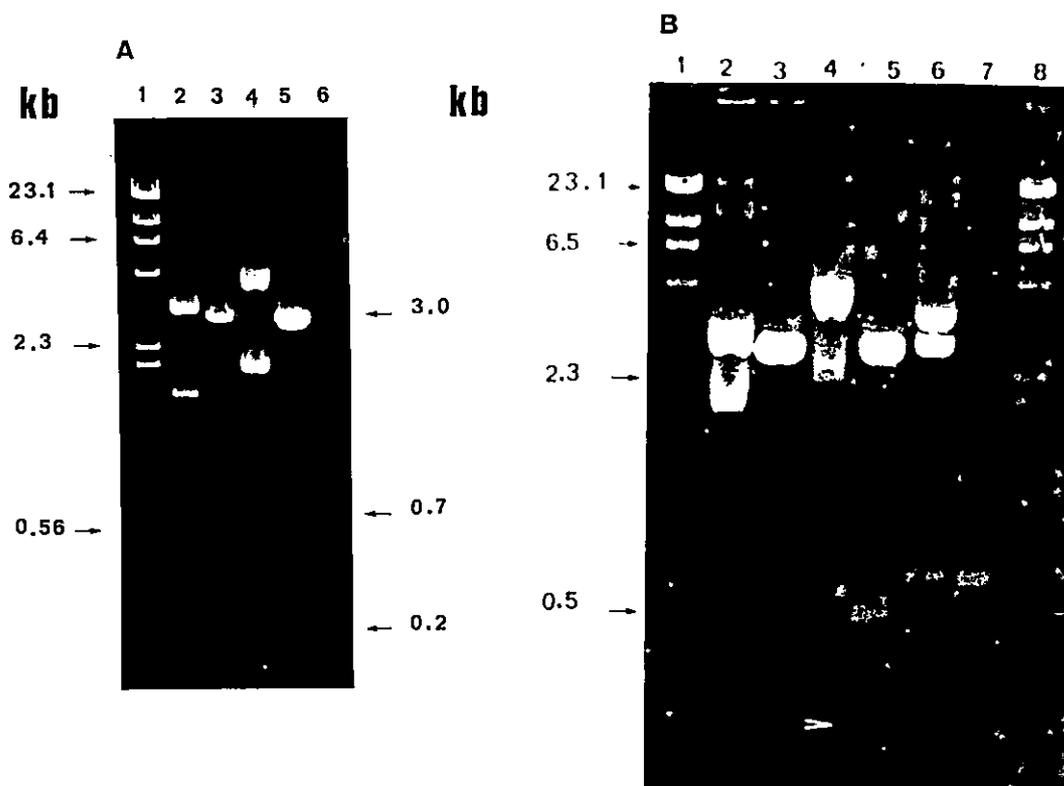


Figura 21 : Análisis de restricción del plásmido pBS-E1.4.

A) : Canal 1 : 400 ng de DNA del fago λ digerido con *Hind*III, como marcador de tamaño molecular. Canales 2 y 3: 300 ng de DNA del plásmido pBluescript SK⁻ sin digerir y digerido con *Eco*RI, respectivamente. Canal 4 y 5 : 800 ng del plásmido pBS-E1.4 sin digerir y digerido con *Eco*RI, respectivamente. Canal 6 : 30 ng de DNA del fragmento PCR de 0.67 kb purificado.

B) : Canal 1 : 400 ng de DNA del fago λ digerido con *Hind*III. Canales 2 y 3 : 1 μ g de DNA del plásmido pBluescript SK⁻ sin digerir y digerido con *Eco*RI, respectivamente. Canales 4, 5 y 6 : 1 μ g del plásmido pBS-E1.4 sin digerir, digerido con *Eco*RI y digerido simultáneamente con *Xho*I y *Cla*I, respectivamente. Canal 7 : 30 ng de DNA del fragmento PCR de 0.67 kb purificado. La cabeza de flecha blanca indica la posición del fragmento de aproximadamente 0,22 kb.

de este análisis. En los canales 2 y 3 se observan aproximadamente 1 µg de DNA del plásmido Bluescript sin digerir y digerido con *EcoRI*, respectivamente. En los canales 4, 5 y 6 se depositó la misma cantidad de DNA del plásmido pBS-E1.4 sin digerir, digerido con *EcoRI* y digerido simultáneamente con *XhoI* y *ClaI*. En el canal 7 se puso aproximadamente 30 ng de DNA del fragmento PCR de 0,67 kb sin tratamiento alguno. La digestión con *EcoRI* (canal 5) da los fragmentos esperados de 2,9 kb del vector lineal, y los dos más pequeños de 0,45 kb y 0,22 kb (cabeza de flecha blanca). La digestión con *XhoI* y *ClaI* (canal 6) genera tres fragmentos de aproximadamente 3,6-2,9 y 0,67 kb, que corresponden a vector más inserto digerido parcialmente, vector linearizado e inserto PCR de 0,67 kb, respectivamente. En el canal 7 se observa que el inserto PCR purificado tiene una migración similar al inserto PCR proveniente de la digestión total *XhoI-ClaI*, confirmando su tamaño.

5.6 Análisis de hibridación del gen de HK A de rata, usando como sonda el fragmento PCR de 0,67 kb de *Drosophila*.

Se quiso averiguar a qué parte del gen de HK A de rata se parece más el fragmento de 0,67 kb de *Drosophila*. Para ello, la secuencia completa de cDNA de 3,6 kb de HK A, obtenida de un banco de datos (EMBL) fue sometida a un análisis de digestión con varias enzimas de restricción, mediante el programa computacional Digest. Las siguientes enzimas probadas cortan la secuencia de 3,6 kb en no más de 5 fragmentos: *BamHI*, *BglII*, *EcoRI*, *SmaI*, *PstI*, y *XbaI* (2 fragmentos); *AvaI* y *PvuI* (3 fragmentos); *PvuII* y *TaqI* (5 fragmentos). Las enzimas probadas que no cortan el cDNA de HK A son: *HindIII*, *KpnI*, *NotI*, *SalI* y *SphI*. Como se muestra en la figura 22 A, el cDNA del gen que codifica HK A fue digerido totalmente con la enzima *HindIII*, que no corta el fragmento por lo que sirve como control de la reacción de digestión (canal 2), y con la enzima *PvuII*, que produce fragmentos de 0,9-1,5-0,07-0,2 y 0,8 kb, ordenados desde el extremo 5' al extremo 3' del gen (canal 3). Se incluyó, además, el fragmento PCR de 0,67 kb como control positivo (canal 4), el plásmido Bluescript digerido con *EcoRI* y purificado por el método de afinidad a sílica (canal 5) y el plásmido pBS-E1.4 digerido con *EcoRI* (canal 6).

Para responder nuestra interrogante inicial, con el gel mostrado en la parte A de la figura 22, se realizó una hibridación, usando como sonda el fragmento PCR de 0,67 kb

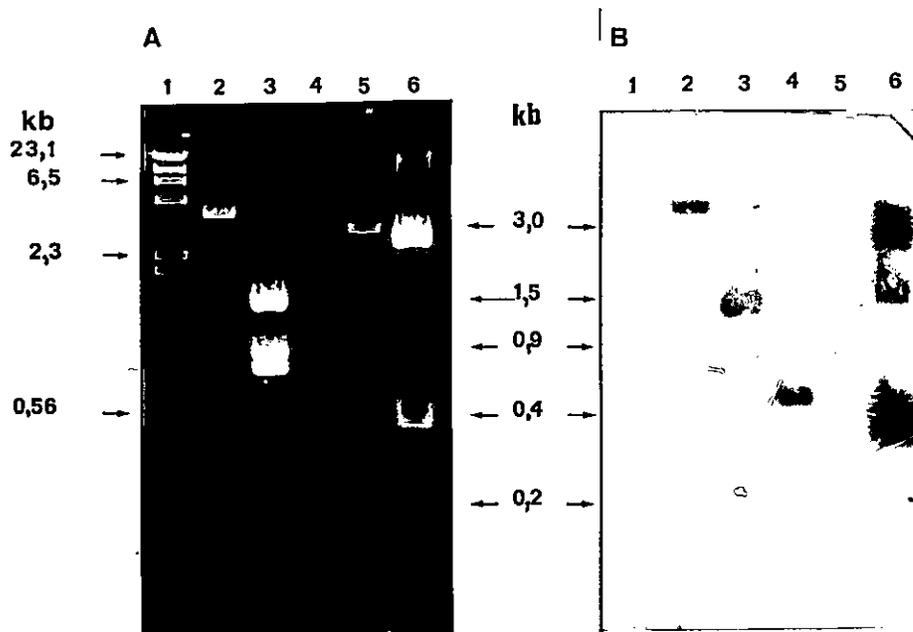


Figura 22 : Análisis de restricción e hibridación del fragmento cDNA de 3,6 kb que codifica HK A de rata, usando como sonda el fragmento PCR de 0,67 kb.

A) Electroforesis en gel de agarosa al 1,4 %. Canal 1 : 600 ng de DNA del fago λ digerido con *Hind*III, como marcador de tamaño molecular. Canal 2 : 60 ng de cDNA de HK A de rata digerido con *Hind*III. Canal 3 : 1 μ g de cDNA de HK A de rata digerido con *Pvu*II. Canal 4 : 5 ng de fragmento PCR de 0,67 kb de *D. melanogaster*, purificado. Canal 5 : 12 ng de DNA del plásmido Bluescript SK⁻ digerido con *Eco*RI. Canal 6 : 1 μ g de DNA del plásmido pBS-E1.4 digerido con *Eco*RI.

B) Hibridación del gel mostrado en la parte A de la figura, con 200 ng de DNA del fragmento PCR de 0,67 kb de *Drosophila*, marcado con biotina.

de *D. melanogaster* (Figura 22 B). La sonda detecta una señal moderadamente intensa con cDNA de HK A digerido con *Hind*III (canal 2). Cuando este mismo cDNA se digiere con *Pvu*II, el fragmento de 1,5 kb muestra una importante señal (canal 3), mientras que los fragmentos de 0,9 y 0,8 kb presentan una señal más débil. Esto significa que la sonda hibrida prácticamente con toda la secuencia de cDNA que codifica HK A, pero muestra un reconocimiento más pequeño del extremo 3' del gen representado por la señal obtenida con el fragmento de 0,8 kb. Por otra parte, el fragmento PCR de 0,67 kb es detectado por la sonda como similar (canal 4), mientras que el plásmido Bluescript cortado con *Eco*RI presenta una señal de hibridación casi imperceptible (canal 5). Por el contrario, las señales detectadas por la sonda en los fragmentos de 0,45 y 0,22 kb son bastante intensas, reflejo de la gran cantidad de DNA total depositada en el bolsillo del gel, comparada con las otras señales (canal 6).

5.7 Secuenciación del plásmido pBS-E1.4 y análisis computacional de la secuencia obtenida.

a) Resultados del procedimiento de secuenciación del plásmido pBS-E1.4.

El plásmido pBS-E1.4 fue secuenciado por ambos extremos con los partidores T7 y SK específicos del vector pBluescript. Los resultados de la secuencia de nucleótidos del fragmento PCR de 0,67 kb de *D. melanogaster* se muestran en la figura 23. Se secuenció un total de 780 pb, de las cuales 693 corresponden al fragmento PCR (secuencia de color negro en la figura 23) y 87 pb corresponden al vector de clonado (secuencia de color verde). Este inserto tiene un sitio interno de reconocimiento para la enzima de restricción *Eco*RI que, según la secuencia obtenida, genera dos fragmentos de 538 pb y 155 pb, cuya suma corresponde a 693 pb. De estas 693 pb solamente 681 pb corresponden a DNA genómico de *D. melanogaster*, puesto que los extremos *Eco*RI del partididor no forman parte de la secuencia de hexoquinasas conservada. De tal forma que para realizar las comparaciones de secuencias se utilizó sólo el fragmento de 681 pb. En esta misma figura, las cajas abiertas señalan regiones de la secuencia clonada de *Drosophila* que son similares con el gen de hexoquinasa A de rata (celeste y azul = T7; café claro y oscuro = SK).

1 KpnI ApaI XhoI HcII* **Partidor** HK 14-1 70
T7 5' CGAATGGGT ACCGGGCCCC CCTCGAGGTC **GAATTCGCA**G CCCCCTTGCC CCCTCATT TCCATGAGCG
SK 3' CCAG **CTTAAGCAT**C GGGGCAACGG GGGAGTAAA AGGTACTCGC
EcoRI

71 140
CCCACACGGG CATCATCGCA TCCAAAGTGT AGTAAGTGCA CTTTGTGAGT GCGGCCAGGG TTGCCAGCGC
GGGTGTGCC GTAGTAGCGT AGGTTTCACA TCATTACGTT GAAACTCA CGCCGGTCCC AACGGTCGGC

141 210
TATTGCAAGC GCTATTTGAG CAATTGTTGG GTGGGAACGG GCGAG**GAATT** CAATGAATGG GAAAAACAAGG
ATAACGTTCC CGATAAACTC GTTAACAACC CACCCTTGCC CGCTC**CTTAA** GTTACTTACC CTTTGTTC

211 280
TGCACACAAA AGAAAATCAC CCGAAAGAAA TTTGCAGGGA ATGTTAATTT CGCGCAGTTA ATTACTACAC
ACGTGTGTTT TCTTTTAGTG GGCTTCTTT AAACGTCCCT TACAATTAAA GCGCGTCAAT TAATGATGTG

281 350
GCCGATTATC CACAATCAAT TATAGTGCGC AACTTTTGCA ATTAACAAG TCTTACATTG TTGTGAAATA
CGGCTAATAG GTGTTAGTTA ATATCACGCG TTGAAAACGT TAATTTGTTT AGAATGTAAC AACACTTTAT

351 420
AGATAGGGGG TCGAATGCAG CTTAAAGTTT ATTTAAATAT GTAGTTGTTT TATGTTAGAA ATTTAAATCA
TCTATCCCC AGCTTACGTC GAATTTCAA TAAATTTATA CATCAACAAG ATACAATCTT TAAATTTAGT

421 490
CTGATTGAAG AGTCTGGGG CGGAGAAAC ATTCTTAAT CTTTTATTA TTCCCTTAAA ATGTATCAAA
GACTAACTTC TCAAGACCCC GCCTCTTTG TAAGAGATTA GAAATAATT AAGGGAAATT TACATAGTTT

491 560
TATACGTTAT GACATTTAAT TATTTTAAACA ACCAATTTAT ATTATTCTCA CTATTTTGG TATAAAAAAG
ATATGCAATA CTGTAAATTA ATAAAATTGT TGGTTAAATA TAATAAGAGT GATAAAAACC ATATTTTTTC

561 630
ATTTGAGGTT CCAAATAAA ATAAAATTTA ATTTAATTTA ATTATGCTAC TGAAGTCAAT TCTATTGGAT
TAAACTCCAA GGTTTATTT TATTTTAAAT TAAATTAAT TAATACGATG ACTTCAGTTA AGATAACCTA

631 700
TTTCCAGCGT GCGTCTGGTA ACCCTGAAAT TGCAAGAGAA TCGTGGGTTG CACGCAGTGG AGAATTGGCT
AAAGGTCGCA CGCAGACCAT TGGGACTTTA ACGTTCTCTT AGCACCAAC GTGCGTCACC TCTTAACCGA

701 770
TATGGCAAGG GGGCTGCGAA **TTCGACGGTA** TCGATAAGCT TGATATCGAA TTCCTGCAGC CCGGGGGATC
ATACCGTTCC CCCGACGCTT **AAGCTGCCAT** AGCTATTCTGA ACTATAGCTT AAGTACGTCG GGCCCCCTAG
Partidor HK 14-1 HcII* EcoRI PstI SmaI BamHI

771 780
CACTAGTTCT - 3' T7
GTGATCAAGA - 5' SK

Figura 23. Secuencia nucleotídica del inserto de 0.67 kb de *D. melanogaster* clonado en el vector pBluescript II SK. Secuencia de color verde corresponde al vector. Secuencia de color negro corresponde al inserto. En negrita se muestra los sitios *EcoRI*. Las cajas de colores señalan regiones que son similares al gen de hexoquinasa A de rata.

*: *HcII* corresponde a la mitad del sitio *HincII*, en ambos extremos de la secuencia.

El fragmento de 0,67 kb fue obtenido amplificando DNA genómico de mosca con la mezcla de partidores II. Por lo tanto es razonable esperar que dicho inserto contenga en cada extremo la secuencia de uno de los partidores HK 26-2B ó HK 14-1 que forman la mezcla. Sin embargo, como se aprecia en la figura 23, ambas hebras de DNA presentan la secuencia correspondiente al partidor HK 14-1.

b) Resultados del análisis computacional de la secuencia nucleotídica del fragmento clonado de *D. melanogaster*.

La secuencia de 681 pb del fragmento PCR fue analizada con el programa computacional GCG de la Universidad de Wisconsin, versión 9.1. Para este análisis cada una de las hebras de la secuencia obtenida se designaron como E1.4-T7 y E1.4-SK, respectivamente (Figura 23). La tabla 7 muestra los resultados obtenidos al comparar la secuencia E1.4-T7 con la secuencia completa del gen de HK A de rata y con las secuencias nucleotídicas que codifican el extremo amino y carboxilo terminal de la enzima. Se puede observar que una zona de la secuencia E1.4-T7, comprendida entre los nucleótidos 407-428, reconoce una región de 22 pb (nucleótidos 2281-2302) con 77,2 % de identidad en la secuencia de HK A e identifica la misma secuencia cuando la comparación se realiza con la región del gen que codifica el extremo carboxilo terminal de la molécula. Al comparar la secuencia E1.4-T7 con la región del gen de HK A que codifica el extremo amino terminal de la proteína se observa que la región ubicada entre los nucleótidos 39-73 reconoce una zona de 35 pb localizada entre los nucleótidos 784-818 en el extremo amino de HK A, con 65,7 % de identidad. Se realizó el mismo tipo de análisis con la secuencia nucleotídica E1.4-SK y los resultados obtenidos se muestran en la tabla 8. Cuando la comparación se realiza con la secuencia de nucleótidos que codifica HK A completa, o con la región que codifica la mitad carboxilo terminal de la enzima, la zona comprendida entre los nucleótidos 42-73 de la secuencia E1.4-SK reconoce con 68,7 % de identidad, una región de 32 pb ubicada entre las bases 2445-2476 del gen de HK A. Finalmente, una región terminal de la secuencia E1.4-SK (nucleótidos 650-678) muestra un 68,9 % de identidad con una zona de 29 pb comprendida entre los nucleótidos 1421-1449 en la región que codifica el extremo amino de HKA.

Tabla 7: Comparación de la secuencia nucleotídica de E1.4-T7 con la secuencia de cDNA que codifica HK A de rata y con las secuencias nucleotídicas que codifican los extremos amino y carboxilo de la proteína.

Nombre de las secuencias comparadas	Secuencias comparadas	Longt. (pb)	% S	% I
E1.4-T7 (1-681) HK A (1-3656) completa	⁴⁰⁷ GGAGAAACATTCTCTAATCTTT ⁴²⁸ III II IIIIIIIII II I GGACGAATATTCTCTAAACTCT ₂₂₈₁ ₂₃₀₂	22	77,2	77,2
E1.4-T7 (1-681) HKA (1-1492) Amino	³⁹ CACGGGCATCATCGCATCCAAAGTGTAGTAAGTGC ⁷³ III IIIII II II I I I IIIIIIIII CACAGGCACCAATGCTTGCTACATGGAGGAACTGC ₇₈₄ ₈₁₈	35	65,7	65,7
E1.4-T7 (1-681) HK A (1493-3656) carboxilo	⁴⁰⁷ GGAGAAACATTCTCTAATCTTT ⁴²⁸ III II IIIIIIIII II I GGACGAATATTCTCTAAACTCT ₂₂₈₁ ₂₃₀₂	22	77,2	77,2

I = Identidad.

Tabla 8: Comparación de la secuencia nucleotídica de E1.4-SK con la secuencia de cDNA que codifica hexoquinasa A de rata y con las secuencias nucleotídicas que codifican los extremos amino y carboxilo de la proteína.

Nombre de las secuencias comparadas	Secuencias comparadas	Longt. (pb)	% S	% I
E1.4-SK (1-681) HK A (1-3656) completa	⁴² CCACGATTCTCTTGCAATTCAGGGTTACCAG ⁷³ III I IIIIII II II II II III I ²⁴⁴⁵ CCAAGTTTCTCTCTCAGATTGAGAGTGACCGG ²⁴⁷⁶	32	68,7	68,7
E1.4-SK (1-681) HKA (1-1492) amino	⁶⁵⁰ CTCATGGAAAATGGAGGGGGCAACGGGGC ⁶⁷⁸ III II I III IIIIII IIIII ¹⁴²¹ CTCTCAGAGAGTGGCACGGGCAAGGGGGC ¹⁴⁴⁹	29	68,9	68,9
E1.4-SK (1-681) HK A (1493-3656) carboxilo	⁴² CCACGATTCTCTTGCAATTCAGGGTTACCAG ⁷³ III I IIIIII II II II II III I ²⁴⁴⁵ CCAAGTTTCTCTCTCAGATTGAGAGTGACCGG ²⁴⁷⁶	32	68,7	68,7

I = Identidad.

Las secuencias nucleotídicas de E1.4-T7 y SK fueron comparadas en forma independiente con la base de datos de secuencias disponible en el programa GCG. Para ambas secuencias la búsqueda no mostró similitud con secuencias génicas específicas de hexoquinasas o con miembros pertenecientes a la misma Familia o Superfamilia de genes (Bork *et al*, 1993., Hurley, J.,1996) Pero, cuando ambas secuencias fueron comparadas con la base de datos específica de *D. melanogaster*, mediante el programa de alineamiento Blast se encontró que la secuencia E1.4-SK, comprendida entre los nucleótidos 230-531, tiene 60 % de identidad en 301 pb entre los nucleótidos 1691 y 1991 de un mRNA que codifica una proteína quinasa dependiente de calmodulina, cuya secuencia codificante se encuentra entre las bases 251 y 1723 del mensajero de 2977 nucleótidos.

La tabla 9 muestra la comparación de la secuencia nucleotídica E 1.4 de *D. melanogaster* (681 pb) con algunos genes de hexoquinasas de invertebrados, con genes de vertebrados, con secuencias exónicas e intrónicas del gen de HK B (II) de rata y con el pseudogen de HK B (II) humano. Las longitudes de comparación varían entre 27 y 100 pb y los porcentajes de similitud e identidad entre 60 y 78,7 %. Del análisis de la tabla se puede inferir que la secuencia de nucleótidos E 1.4 de *Drosophila* se parece bastante a algunas secuencias nucleotídicas de hexoquinasas de invertebrados (protozoos, levaduras, bacterias, platelminto), a hexoquinasa de la planta *Arabidopsis thaliana*, al exón 6 y pseudogen de HK B de rata y humano, respectivamente. De este grupo sólo las secuencias de hexoquinasa 1 de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar*, la secuencia de HK D de *Plasmodium falciparum* y exón 6 de HK B de *Rattus norvegicus* corresponden a regiones génicas que contienen secuencia codificante.

Para determinar las vecindades de unión exón-intrón se comparó las secuencias consenso descritas en eucariontes con la secuencia completa E1.4 T7/SK (Breathnach y Chambon, 1981). Las posibles secuencias identificadas no cumplen adecuadamente con el consenso ni coinciden con las interrupciones que presenta cada marco.

c) Resultados del análisis computacional de la traducción a aminoácidos de la secuencia clonada de *D. melanogaster*.

En forma adicional, se determinaron los seis posibles marcos de lectura de las

Tabla 9: Comparación de la secuencia de nucleótidos E 1.4 de 681 pb de *D. melanogaster* con algunas hexoquinasas de invertebrados, con hexoquinasas de otros vertebrados, con secuencias exónicas e intrónicas del gen de HK B de rata, con el pseudogen de HK B de humano y con el gen HXK 1 de plantas.

Especie Nº	Tipo de HK y longitud(pb)	Nucleótidos comparados	Longitud de comp. (pb)	% S	% I	Nº de acceso
1. <i>Entamoeba histolytica</i>	HXK1 1372	506-590 613-688	85	67,1	67,1	X82197
2. <i>Entamoeba dispar</i>	HXK1 1371	537-591 351-406	56	67,2	67,2	Y11114
3. <i>Plasmodium falciparum</i>	HK IV(D) 1743	537-599 685-753	69	66,6	66,6	M92054
4. <i>Schwanniomyces occidentalis</i>	HXK 1870	510-568 82-148	67	69,4	69,4	S78714
5. <i>Schistosoma mansoni</i>	HK 2449	516-567 1938-1986	52	71,4	71,4	L04480
6. <i>Xenopus laevis</i>	GK 3005	539-568 2776-2805	30	73,3	73,3	X93494
7. <i>Homo sapiens</i>	HK B (II) Pseudogen 5580	506-567 4677-4737	64	72,8	72,8	U28387
8. <i>Arabidopsis thaliana</i>	HXK1 2023	519-562 1970-2013	44	68,1	68,1	U28214

Continuación de la Tabla 9:

9. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	HXK1 (PI) 2778	473-519 2421-2462	47	68,0	68,0	M14410 M11184
10. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GLK1 3144	521-550 562-591	30	70,0	70,0	M24077
11. <i>Saccharomyces pombe</i>	HXK1 1900	518-550 1864-1900	37	78,7	78,7	X92894
12. <i>Escherichia coli</i>	GLK 1278	454-483 89-118	30	70,0	70,0	U22490
13. <i>Rattus norvegicus</i>	HK B (II) Exón 6 292	459-508 162-212	51	64,0	64,0	Z46358
14. <i>Kluyveromyces lactis</i>	RAG 5 2551	344-438 277-376	100	60,0	60,0	X61680
15. <i>Rattus norvegicus</i>	HK B (II) Intrón 12 182	342-391 71-120	50	60,0	60,0	Z46377
16. <i>Mus musculus</i>	GK 2245	628-654 932-958	27	74,0	74,0	L38990

secuencias nucleotídicas E1.4 T7 y SK (Tabla 10). Como se puede apreciar en la tabla, los seis marcos de lectura (a-f) presentan varias señales de término (*) en su interior que dividen el total de 226 y/o 227 aminoácidos, que debiera codificar la secuencia de 681 pb, en marcos de lectura con 9 (marco e) y hasta 18 péptidos (marco f). Estos resultados permiten deducir que la secuencia de 681 pb aparentemente no contiene un marco de lectura definido. Sin embargo, como la secuencia analizada corresponde a un fragmento de DNA genómico de *Drosophila*, existe la posibilidad que la presencia de algún extremo codificante se vea interrumpida por la existencia de una secuencia intrónica en medio de la secuencia de 681 pb o en los extremos 5' o 3' de la misma. Para ello, se realizó un análisis exhaustivo, mediante la búsqueda de similitud de secuencias de aminoácidos con la base de datos de proteínas del programa GCG (Fasta), de cada marco de lectura completo (Tabla 10: marco 1.4 a.pép-1.4 f.pép), de los dos péptidos más grandes de cada marco de lectura (Números en negrita en la Tabla 10: 1.4 a 63.pép, 1.4 a 31.pép, 1.4 b 34.pép, 1.4 b 32.pép, etc.) y de los péptidos amino y carboxilo terminales de cada marco de lectura (Números subrayados en la Tabla 10: 1.4 a 21.pép, 1.4 a 20.pép, etc.). Este tipo de análisis "funcional" pretende atribuir una función determinada, por semejanzas con otras proteínas, al péptido seleccionado en cada marco de lectura. Además, permite tener una idea aproximada de lo que a nivel de aminoácidos podría corresponder a un exón en el marco de lectura completo (análisis "estructural"), asumiendo que un exón en *Drosophila* estaría formado por un número mínimo de 20 aminoácidos (Ver Discusión). Se aplicó ambos criterios (funcional y estructural) para determinar los posibles marcos de lectura a analizar. Este análisis mostró que funcional y estructuralmente los marcos a, b, d y e son posibles. Los marcos a y b contienen péptidos carboxilo terminales (1.4 a 20.pép y 1.4 b 34.pép, respectivamente) que podrían corresponder a un exón con semejanzas a proteínas quinasas. El marco d contiene un péptido (1.4 d 37.pép) comprendido entre los aminoácidos 63 a 99 del marco completo que presenta similitud con proteínas quinasas. El marco e tiene un péptido amino terminal (1.4 e 42.pép) que presenta también semejanzas con proteínas quinasas.

En la tabla 11 se muestran los resultados de una comparación directa (Best fit)

Tabla 10: Resultados de la traducción a aminoácidos de las dos hebras de DNA de la secuencia E1.4 de 681 pb de *D. melanogaster*, mediante el uso del programa GCG.

Hebra secuenciada	Designación del Marco de lectura	Longitud de los péptidos (amino a carboxilo)	Total de péptidos por marco
E1.4-T7	E1.4- a.pep	<u>21</u> **17* 63 *7*10* 16* 31 *7*3*19*1* <u>20</u>	12
	E1.4-b.pep	<u>9</u> *16*25(1)*24*17*6* 15*9*25(2)* 32 *3* <u>34</u>	12
	E1.4-c.pep	<u>72</u> *15*16*9*9*3* 13*2*9*2*15*5*3* <u>40</u>	14
E1.4-SK	E1.4-d.pep	<u>5</u> *25(1)*1*2*2*18** 1* 37 *5*6*18*11*5* 25(2)* <u>51</u>	15
	E1.4-e.pep	<u>42</u> *25*7*9*16*10* 12*10* <u>87</u>	9
	E1.4-f.pep	<u>37</u> *2*21*3*2*2*6* 2**16*9* 28 *6**5*8 *24*3*18* <u>15</u>	18

* = Codón de término

Números en negrita indican los péptidos de mayor tamaño en cada marco de lectura.

Números subrayados señalan los péptidos amino y carboxilo terminales de cada marco de lectura.

del marco e completo y de los péptidos 42 e y 87 e con HK A de rata cada 200 aminoácidos. Se puede apreciar que HK A contiene dos zonas entre los aminoácidos 332-344 y 606-614 que tienen 53,8 y 55,5 % de similitud e identidad con las regiones comprendidas entre los aminoácidos 28-40 y 3-11 del marco e completo, respectivamente, e identifican el péptido 42 e del mismo marco de lectura. El análisis mediante Fasta reveló que el péptido 42 e es una zona que tiene 40,7- 42,9 y 43,5 % de identidad en 27-28 y 23 aminoácidos con proteínas proto-oncogénicas de *Xenopus laevis*, *Gallus gallus* y *Homo sapiens*, respectivamente, las cuales presentan actividad proteínas quinasas Ser/Thr.

Por otra parte, el análisis comparativo directo (Best fit) con HK A de rata muestra que el péptido 87 e contienen una zona de 10 aminoácidos comprendida entre los residuos 217-226 del marco e completo que reconoce los aminoácidos 444-453 en la mitad amino y 893-902 en la mitad carboxilo de HK A, con 70 % de similitud e identidad (Tabla 11). Esta última región corresponde al sitio de unión a ATP alternativo 2 propuesto por Griffin *et al*, 1991 que se encontraría entre los aminoácidos 896 (GSGKGAA) y 902 en la mitad carboxilo de HK A. Ningún otro marco de lectura, ni péptido específico, muestra similitud con sitios de secuencia conocida e importantes que participan en unión a ambos sustratos dentro de la molécula de HK A. Cabe mencionar que, sin embargo, cuando se realiza un Fasta del péptido 87 e con la base de datos de proteínas del programa GCG no se encuentra similitud con hexoquinasas o proteínas de función semejante. La comparación de los respectivos péptidos 42 e y 87 e con la mitad amino y carboxilo de HK A de rata arroja los mismos resultados que los obtenidos al comparar estos péptidos con HK A cada 200 aminoácidos (Tabla 11).

Basados en este tipo de análisis el marco e podría corresponder a una región del DNA genómico de *Drosophila* que contiene un intrón en el centro (desde el aminoácido 43 al 139) y dos posibles exones, uno de ubicación amino terminal de 42 o más aminoácidos y otro carboxilo terminal de 87 o más aminoácidos. Con la información de secuencia disponible actualmente es imposible determinar el tamaño real de los péptidos que podrían corresponder a exones.

Tabla 11: Comparación del marco de lectura e completo con HK A de rata cada 200 aminoácidos, y de los péptidos 42 e y 87 e con las mitades amino y carboxilo de HK A de rata.

Secuencias comparadas	Aminoácidos semejantes en la comparación	Long. de la comparación (Nº de aa's)	% S	% I	Pépt. Identificado en el marco <u>e</u>
1.4 e.pép (1-226) HK A rata (1-200)	123-129 10-16	7	71,4	57,1	12 e, 10[2] e
1.4 e.pép (1-226) HK A rata(201-400)	28-40 332-344	13	53,8	53,8	42 e
1.4 e.pép (1-226) HK A rata (401-600)	217-226 444-453	10	70,0	70,0	87 e
1.4 e.pép (1-226) HK A rata (601-800)	3-11 606-614	9	55,5	55,5	42 e
1.4 e.pép (1-226) HK A rata (801-918)	217-226 893-902	10	70,0	70,0	87 e
1.4 e 42.pép (1-42) HK A rata ami (1-475)	28-40 332-344	13	53,8	53,8	---
1.4 e 42.pép (1-42) HK A carbox(479-918)	3-11 606-614	9	55,5	55,5	---
1.4 e 87.pép (140-226) HK A rata ami (1-475)	217-226 444-453	10	70,0	70,0	---
1.4 e 87.pép (140-226) HK A carbox (476-918)	217-226 893-902	10	70,0	70,0	---

(-) = Longitud y numeración los aminoácidos en las secuencias comparadas.

6.- Análisis del DNA genómico de *D. melanogaster*, mediante el uso de cromosomas artificiales de levadura (YAC), que contienen DNA de la sección 8 del cromosoma I (X).

Para realizar este estudio, se decidió analizar siete clones YAC de colección que han sido localizados, mediante hibridación *in situ*, en la región citológica definida para los genes Hex A-B (8D4-E1) (DIS 62, 1985). Estos clones fueron proporcionados por el Dr. Ian Duncan de la Universidad de Washington. En la sección 1.7 de Materiales se muestra una lista que resume algunas características relevantes respecto de los mismos. Los clones DY son cromosomas artificiales de levadura que contienen DNA genómico de embrión de *Drosophila* digerido con *NotI*, y fueron clonados en el vector pYAC5. En cambio, los clones DYR y DYE portan DNA genómico de moscas adultas parcialmente digerido con *EcoRI* y fueron clonados en el vector pYAC4. Los clones designados como V, VI y VII contienen repetidos dispersos en su interior y los dos últimos clones presentan hibridación con el cromocentro. En la figura 24, que muestra la cobertura de los diferentes clones YAC, se aprecia que sólo una pequeña parte de la sección 8 del cromosoma I (X) (8C3-13) no queda cubierta por éstos, aún cuando, según la ubicación citogenética determinada para los genes Hex A-B, la mayor parte de los YAC caen en esta región (sombreada en el esquema de la figura 24).

6.1 Selección de los cromosomas artificiales (clones YAC) en el perfil cromosómico de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Con el objetivo de determinar la ubicación de los clones YAC dentro del genoma de la levadura, se realizó electroforesis de campo pulsado de cada una de las cepas de *S. cerevisiae*, portadoras de los cromosomas artificiales que llevan el DNA genómico de *D. melanogaster* correspondiente a la sección 8 del cromosoma I (X). La figura 25 muestra los resultados obtenidos cuando se usa, como sonda de hibridación, 2 µg de DNA del plásmido pBR322, marcados con biotina, lo que permite la identificación de los clones YAC. La parte A de la figura 25 muestra una electroforesis de campo pulsado realizada en un gel de agarosa al 1% en tampón TBE, corrida con pulsos de 60-120 segundos, a 150 volts por 28 horas. Esta condición permite la visualización de los cuatro cromosomas más

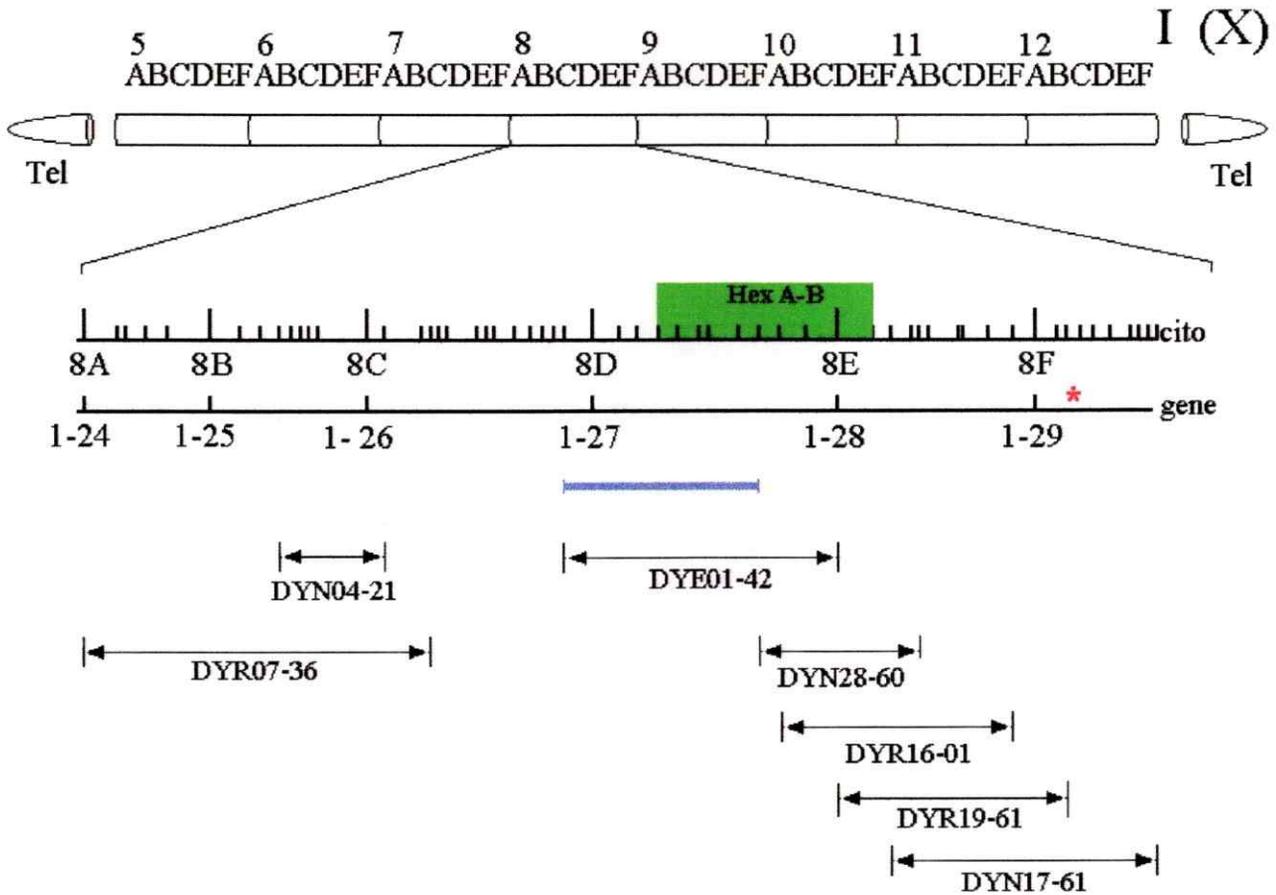


Figura 24. Cobertura de los YACs en la sección 8 del cromosoma I (X) de *Drosophila melanogaster*. En color verde se muestra la zona donde se ubican los genes Hex A-B por técnicas citogénéticas. El asterisco rojo indica la ubicación de dichos genes mediante recombinación genética y la barra azul representa la ubicación de los genes mediante hibridación de los clones YAC con el fragmento de 0,67 Kb de *D. melanogaster*.

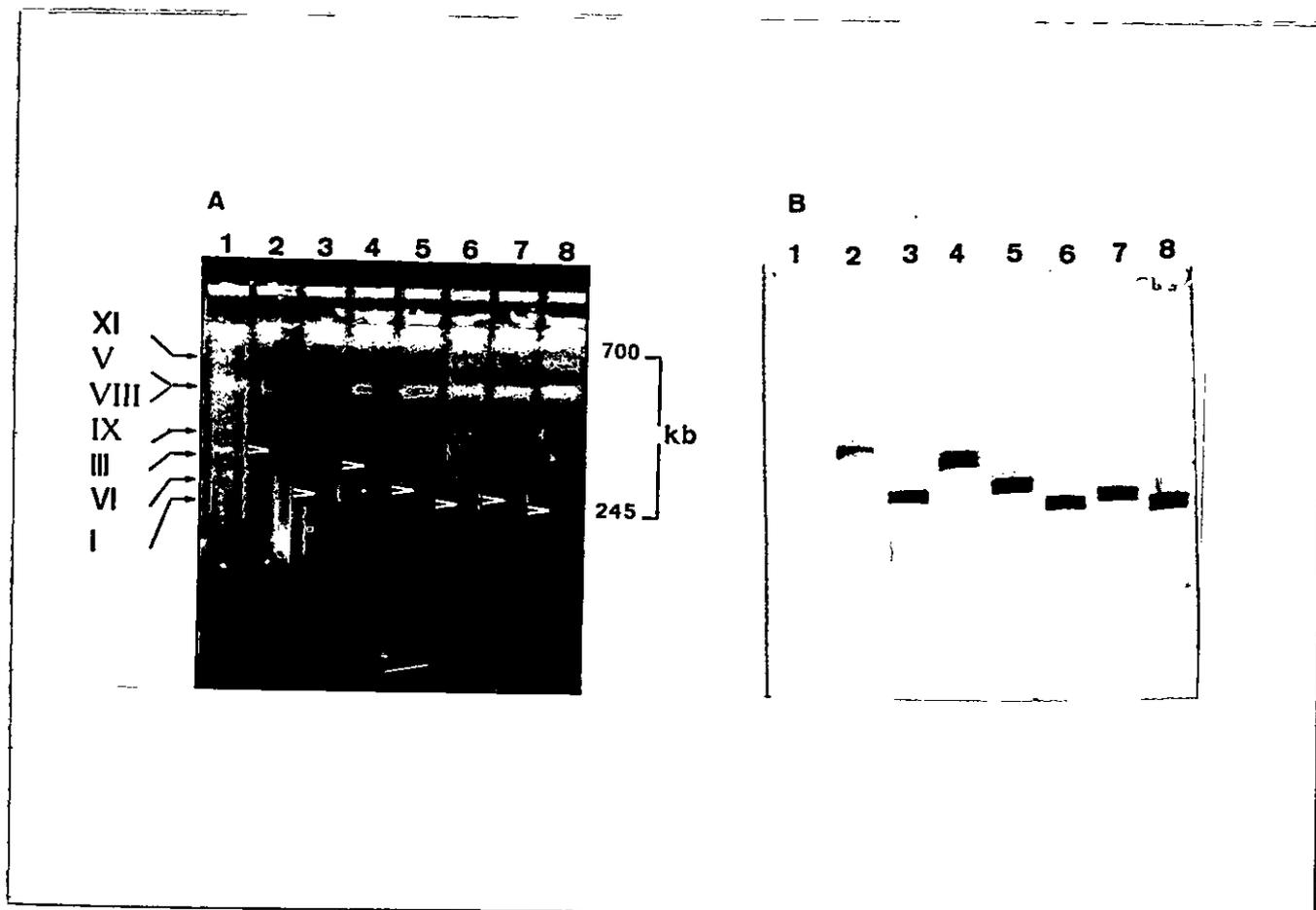


Figura 25 : Ubicación de los cromosomas artificiales de levadura (YAC), que contienen DNA de la sección 8 del cromosoma X de *Drosophila*, usando como sonda el plásmido pBR322. A) Electroforesis de campo pulsado del DNA cromosómico de las cepas de *S. cerevisiae* portadoras de los clones YAC. Canal 1 : DNA cromosómico intacto de la cepa AB1380, usada como marcador de tamaño molecular. Canales 2 al 8 : DNA cromosómico intacto de los clones DYN04-21, DYE01-42, DYR07-36, DYN28-60, DYR16-01, DYR19-61 y DYN17-61, respectivamente. B) Hibridación del gel mostrado en la parte A de la figura con DNA del plásmido pBR322 usado como sonda. Las electroforesis fue realizada en gel de agarosa al 1% en tampón TBE 0,5 X. Las condiciones de corrida fueron : pulsos de 60-120 segundos, 150 volts durante 28 horas.

pequeños de *S. cerevisiae*. En la foto se indica, con una cabeza de flecha blanca, la posición aproximada de las bandas correspondientes a cada cromosoma artificial, según la distancia de migración medida en la membrana del gel hibridada. La hibridación y los lavados post-hibridación se realizaron en altas condiciones de estrictez. En la figura 25 B se aprecian las señales de hibridación detectadas por pBR322 correspondientes a los clones DYN04-21 de 370 kb (canal 2), DYE01-42 de 325 kb (canal 3), DYR07-36 de 350 kb (canal 4), DYN28-60 de 260 kb (canal 5), DYR16-01 de 210 kb (canal 6), DYR19-61 de 230 kb (canal 7) y DYN17-61 de 180 kb (canal 8). En tanto que, no se observa señal de hibridación con DNA genómico de levadura (cepa AB1380) usado como estándar de tamaño molecular y control de hibridación cruzada con los genes de hexoquinasas del hongo (canal 1).

6.2 Análisis de hibridación de los cromosomas artificiales de levadura (YAC) con el fragmento de 0,67 kb de *D. melanogaster*, amplificado con la mezcla II de partidores.

Con el fragmento de 0,67 kb amplificado con la mezcla de partidores II y con 100 ng de DNA genómico de *D. melanogaster*, se realizó un análisis de la sección 8 del cromosoma I (X) que debiera contener el locus Hex A-B. Para ello, siete clones que contienen cromosomas artificiales de levadura con diferentes porciones de DNA genómico de la sección 8 del cromosoma X fueron resueltos mediante electroforesis de campo pulsado, variando ligeramente las condiciones antes descritas. Las muestras fueron corridas en un gel de agarosa al 1,3% en tampón TBE 0,5X y sometidas a pulsos de 70 seg por 24 horas y luego a pulsos de 120 seg por 11 horas más (35 horas en total) a 165 Volts (figura 26). Como se muestra en la parte A de la figura 26, estas nuevas condiciones permiten una mejor resolución de los cuatro cromosomas más pequeños de levadura y con ello de los cromosomas artificiales que tienen tamaños moleculares comprendidos entre 180 y 370 kb.

La parte B de la figura 26 muestra la hibridación del mismo gel mostrado en la parte A con 30 ng del fragmento de 0,67 kb marcado con α -³²P-dATP a una radiactividad específica de aproximadamente 1×10^8 cpm/ μ g de DNA. Los lavados post-hibridación de la membrana se realizaron en condiciones de alta estrictez y ésta fue expuesta a una película autorradiográfica por 72 horas a -70°C con pantalla de intensificación. Se puede observar

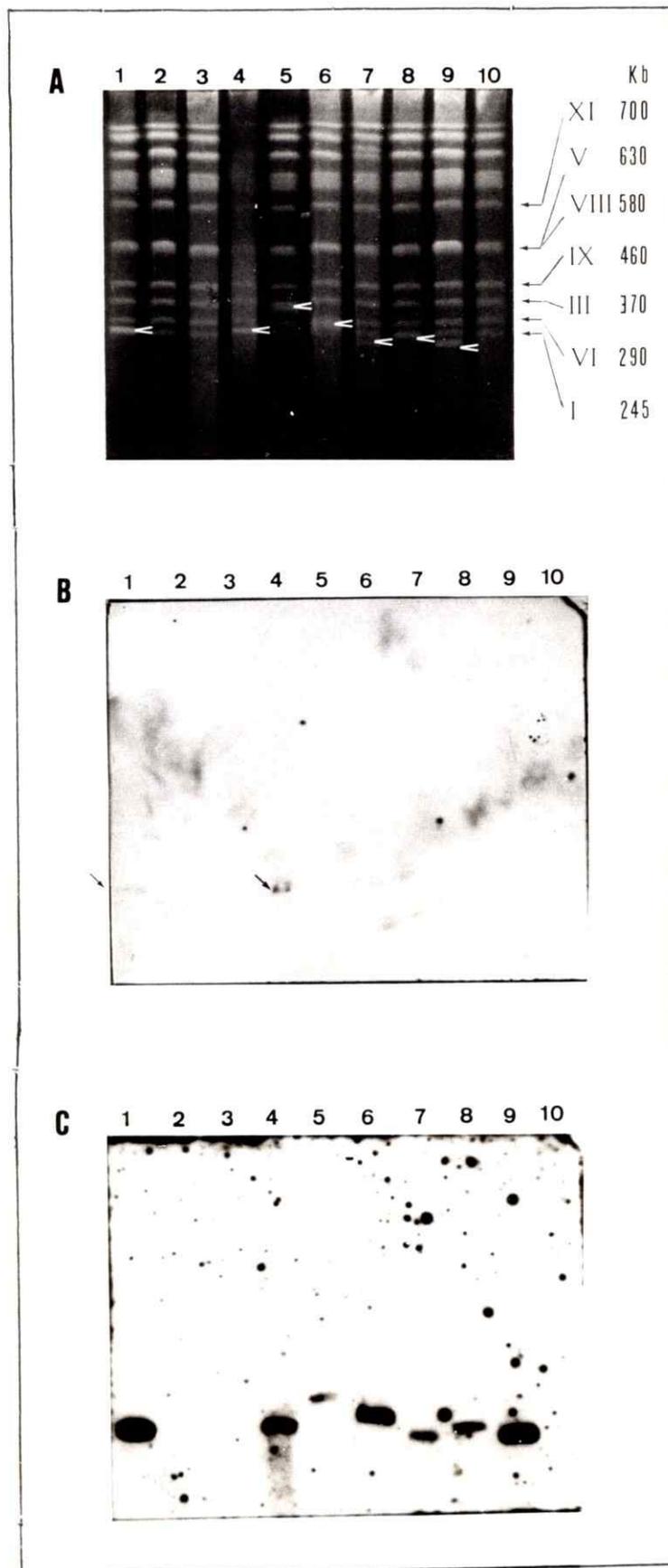


Figura 26 : Análisis de hibridación de DNA genómico de la sección 8 del cromosoma X de *Drosophila*. A) Electroforesis de campo pulsado que muestra el DNA cromosómico intacto de la cepa AB 1380 de *S. cerevisiae* (canales 2 y 10), usado como estándar de tamaño molecular, y el DNA cromosómico intacto de los clones YAC II DYE01-42 (canales 1 y 4), YAC I DYN04-21 (canal 3), YAC III DYR07-36 (canal 5), YAC IV DYN28-60 (canal 6), YAC V DYR16-01 (canal 7), YAC VI DYR19-61 (canal 8), YAC VII DYN17-61 (canal 9). La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 1,3% en tampón TBE 0,5X corrido a 165 Volts con pulsos de 70-70 seg por 24 horas y 120-120 seg por otras 11 horas. B) Hibridación del gel mostrado en la parte A con DNA del plásmido pBR322. C) Hibridación del gel mostrado en A con DNA del fragmento PCR de 0,67 kb de *Drosophila* amplificado con la mezcla II.

que la sonda detecta dos señales de hibridación débiles (indicadas con las flechas negras en la figura 26B). Con el objetivo de determinar a qué clones YAC corresponden las señales de hibridación detectadas por la sonda de 0,67 kb de *Drosophila*, se realizó una deshibridación y posterior rehibridación de esta misma membrana con 50 ng de DNA del plásmido pBR322. El plásmido fue marcado con α - 32 P-dATP a una radiactividad específica de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ cpm/ug de DNA y tanto la hibridación como los lavados post-hibridación fueron llevados a cabo en condiciones de alta estrictez y la membrana fue expuesta por 37 horas a -70°C . Con los resultados obtenidos en este experimento, los cuales se muestran en la figura 26 C (canales 1 y 4), se pudo determinar, mediante la superposición de las respectivas autorradiografías, que dichas señales corresponden al mismo cromosoma artificial de levadura II (clon DYE01-42), el cual se ubica en la región citológica 8C13 ; D11. Además, la hibridación con pBR322 nos permitió observar que en los canales 2 y 10 de la figura 26 B, que contiene los cromosomas de la cepa AB 1380, usada como estándar de tamaño molecular y como control negativo del experimento, no se observan bandas de hibridación.

La débil señal detectada por el fragmento de 0,67 kb de *Drosophila* (Figura 26 B) podría deberse a que éste reconoce solamente una pequeña zona de las 325 kb presentes en el clon YAC II. Estos resultados indican que la secuencia de 0,67 kb de mosca, que tiene similitud con HK A de rata, se ubica en alguna zona de estas 325 kb y la localización exacta en esta amplia región no puede ser determinada por este método. Sin embargo, es importante destacar que la ubicación del clon YAC II, mediante hibridación con la sonda de 0,67 kb, coincide con la ubicación del locus Hex A-B determinada por métodos citogenéticos.

DISCUSIÓN

1.- Determinación del patrón isoenzimático de hexoquinasas en *D. melanogaster* (cepa Oregón-R).

a) Electroforesis en geles de poliacrilamida.

En *D. melanogaster* se han descrito tres bandas principales de actividad hexoquinasa sobre geles nativos teñidos específicamente para la enzima. Las bandas han sido denominadas Hex A, Hex B y Hex C y tienen tamaños moleculares aproximados de 50 kDa (Murray *et al*, 1967, Jelnes, 1971, Madhavan *et al*, 1972, Moser *et al*, 1980). Algunos estudios bioquímicos e inmunológicos han revelado que el patrón electroforético que presentan estas tres enzimas se debe probablemente a la existencia de dos genes estructurales. Los estudios inmunológicos específicamente, sugieren que sólo un gen estructural daría origen a las isoenzimas A y B mediante modificaciones epigenéticas. Sin embargo, el análisis de recombinación genética indica que los genes que codifican hexoquinasas A y B se encuentran estrechamente ligados en el cromosoma I (X). Por otra parte, hexoquinasa C estaría codificada por un gen diferente, ubicado en el cromosoma II (Jelnes, 1971, Voelker *et al*, 1978). El estrecho ligamiento entre los genes de Hex A y Hex B podría dificultar su identificación como entidades independientes, impidiendo la recombinación entre ambos. Esto lleva a pensar que existan dos genes distintos que codifican Hex A y Hex B, y por lo tanto significaría que existen más de dos genes estructurales que codifican hexoquinasas en *D. melanogaster*.

Nuestro interés en dilucidar la organización estructural de los loci que codifican hexoquinasas, nos condujo a abordar diversas alternativas para resolver el problema. Una primera etapa del trabajo consistiría en purificar hexoquinasas de moscas adultas para producir anticuerpos policlonales, los cuales serían posteriormente usados como sondas para detectar el gen en una genoteca de cDNA. El proceso de purificación, implicaba conocer el patrón de isoenzimas presente en los extractos crudos de *D. melanogaster*.

Para ello, se determinó el patrón de isoenzimas de hexoquinasa en la cepa silvestre Oregón-R de esta especie, utilizando homogeneizados de moscas adultas individuales, ya sea machos o hembras. La detección de bandas de actividad enzimática se realizó en geles de poliacrilamida nativos y además en geles de almidón (No mostrado). La cepa silvestre Oregón-R presenta un patrón de bandas similar al descrito (Murray *et al*, 1967), es decir, tres bandas principales de actividad (Hex A, Hex B y Hex C). El nivel de resolución electroforética no permite observar la banda que ha sido descrita por estos mismos autores y que es específica del macho. Sin embargo, las bandas observadas en las isoenzimas B y C indican la presencia de las variantes B1-B2 y C1-C2 descritos para la cepa Samarkand por otros métodos (Moser *et al*, 1980). Además, se observa una banda ancha en la zona correspondiente a Hex A que sugiere la presencia de dos bandas. A diferencia de la cepa Samarkand, la cepa Oregón-R podría contener variantes en la zona de migración correspondiente a Hex A.

b) Separación por cromatografía de intercambio aniónico.

Para averiguar si la actividad de las isoenzimas de hexoquinasa permanecía constante en la mosca adulta o era dependiente de la edad y del sexo, empleamos un método radioisotópico muy sensible y específico que permite detectar niveles tan bajos como 0,01 mU de actividad hexoquinasa (Radojkovic *et al*, 1978). Los resultados obtenidos permitieron establecer que tanto en machos como en hembras adultas el patrón de isoenzimas es muy similar: con dos picos principales de actividad, denominados 1 y 2, más algunos picos de menor actividad entre los dos principales. El patrón de picos intermedios es complejo, apareciendo picos derivados que posiblemente correspondan a degradación proteolítica de la especie presente en el pico principal. En general, las diferencias entre machos y hembras en las distintas edades son poco significativas desde el punto de vista del patrón de isoenzimas principales, representado por los picos 1 y 2, de tal forma que para efectos de separación y purificación, se decidió usar extractos crudos mezclando machos y hembras en proporciones azarosas de entre 3 y 9 días de edad.

La purificación de las isoenzimas de *Drosophila* (cepa Samarkand) sobre una columna DE-52, con una gradiente lineal de 0-0,3 M NaCl, mostró que la isoenzima menos retenida fue Hex B, ya que Hex C eluía en un paso anterior, y la isoenzima más retenida resultó ser Hex A (Moser *et al*, 1980). Una situación similar fue observada en la purificación de las isoenzimas de la cepa Oregón-Rc, en que Hex C es menos retenida que Hex A.

El patrón de isoenzimas detectado por el método espectrofotométrico, en fracciones provenientes de una cromatografía en DEAE-celulosa, es similar al observado por el método radiactivo y a los resultados obtenidos mediante electroforesis en geles nativos. Las dos fracciones reunidas en el pico intermedio muestran bandas que migran entre las isoenzimas A y C. La banda que migra más rápido que Hex C podría corresponder a un producto de agregación o degradación proteolítica de la isoenzima C con modificación de las propiedades de retención en la columna DEAE-celulosa, haciendo que esta nueva especie proteica sea más fuertemente retenida y aparezca formando un pico de actividad que eluye después (primer pico intermedio). La banda más difusa y larga que migra entre Hex A y B podría corresponder a un producto de agregación o degradación proteolítica de hexoquinasa B presente en el pico intermedio 2. Si la fracción correspondiente al primer pico intermedio o al segundo es la que contiene la isoenzima B es un problema no resuelto y que requiere la identificación electroforética independiente de ambas fracciones, que hemos denominado pico intermedio. Otra alternativa es que las bandas presentes en el pico intermedio correspondan a productos de agregación o degradación proteolítica de la especie principal presente en el pico 2.

2.- Purificación parcial de las isoenzimas de hexoquinasa A y C de *D. melanogaster* (cepa Oregón-R).

La mayor parte de los métodos de purificación de hexoquinasas descritos combinan una serie de técnicas convencionales, con las cuales se obtienen rendimientos adecuados. De hecho, se han purificado a homogeneidad las diferentes formas de hexoquinasas de levadura (Barnard, 1975), algunas hexoquinasas de mamíferos, como HK A de cerebro

de rata (Chou *et al*, 1972), HK B de rata (Holroyde *et al*, 1976, Qadri *et al*, 1980), HK D de hígado de rata y de páncreas (Holroyde *et al*, 1976, Meglasson *et al*, 1983), HK C de hepatoma de Novikoff (Radojkovic & Ureta, 1987), etc. También se ha descrito un protocolo para la purificación de las isoenzimas A y C de *D. melanogaster* (Moser *et al*, 1980, Lee, 1982). El procedimiento de purificación para la isoenzima A contempla un paso de cromatografía de afinidad sobre una columna AAD-sepharose, una cromatografía de intercambio iónico en DE-52, un paso de cromatografía de filtración en Sephadex G-75 y finalmente un paso de cromatografía de afinidad en una columna de glucosamine-Sepharose. La actividad específica final reportada es de 137 U/mg con una purificación de 1370 veces, partiendo de 200 g de moscas adultas congeladas. Según estos autores también se logra purificar a homogeneidad las isoenzimas C1 y C2, mediante un paso de isoelectroenfoque preparativo y posterior separación de la actividad en una columna de afinidad 8-(6-aminohexil)amino ATP-sepharose, con la cual se obtienen 60 U/mg de proteína y 600 veces de purificación.

Uno de los objetivos planteados en este trabajo era purificar alguna de las isoenzimas de hexoquinasa de *Drosophila* con el fin de utilizar dicha preparación en la obtención de anticuerpos policlonales. Para ello, emprendimos el procedimiento de purificación haciendo pruebas a pequeña escala en las que se utilizaban como máximo entre 2 a 3 g de moscas adultas congeladas. En el laboratorio se usó el siguiente protocolo con materiales cromatográficos similares a los descritos por Moser *et al*, 1980 : un paso inicial de cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa con el cual se lograba separar claramente la actividad correspondiente a Hex C y A. Posteriormente, la actividad de cada pico en forma independiente era adsorbida en minicolumnas que contenían distintas resinas de afinidad y condiciones de pH. Con la cromatografía en DEAE-celulosa se logró obtener una actividad específica 1,6 U/mg y 1,5 veces de purificación para Hex C. Se obtuvo una actividad específica mayor para Hex A de 6,47 U/mg, lográndose purificarla 6,4 veces. El rendimiento total del procedimiento cromatográfico fue de 35,1 %, lo cual concuerda con lo teórico esperado para el método

Después de numerosos ensayos en mini-columnas observamos que solamente dos resinas, azul de cibacrón y fosfoultrogel, en las condiciones descritas, lograban retener un bajo porcentaje de actividad hexoquinasa. Estos resultados no eran muy prometedores tomando en cuenta las cantidades de proteínas que se requieren para poder producir anticuerpos, por lo cual finalmente se decidió no invertir más esfuerzos en esta aproximación.

3.- Reactividad inmunológica cruzada de extractos crudos de *D. melanogaster*.

La utilización de anticuerpos policlonales en experimentos de inmunolectroforesis, difusión en geles, inmuno-inhibición, e inmunoprecipitación han determinado que existe reactividad inmunológica cruzada entre las tres principales isoenzimas de HK A, B y C de rata (Lawrence *et al*, 1983, Lawrence *et al*, 1984). Si bien, estos mismos estudios no detectaron reactividad inmunológica cruzada entre las isoenzimas de mamíferos y las de levadura se sugiere que la gran conservación de secuencias de nucleótidos y aminoácidos entre esta familia de proteínas, revelada por análisis más recientes de sus secuencias, debería ser argumento suficiente para detectar reactividad inmunológica cruzada en extractos crudos de *Drosophila*, utilizando anticuerpos poli o monoclonales como herramienta de análisis. De hecho, se disponía de anticuerpos policlonales y de una batería de anticuerpos monoclonales producidos contra HK A de cerebro de rata. Esto constituyó una aproximación alternativa para la comparación de las isoenzimas, cuyo valor radica en que se han localizado epítomos reconocidos por algunos de los anticuerpos monoclonales en regiones específicas de la molécula de HK A, las cuales a su vez han sido relacionadas con propiedades funcionales específicas de la enzima (Polakis *et al*, 1984, Wilson *et al*, 1985).

Se utilizaron los anticuerpos monoclonales 2B, 3C, 5A, 13 y 20, además del monoclonal 21 (que es específico para HK A de rata), y que en estudios previos habían mostrado tener alta reactividad cruzada con la misma isoenzima de otras especies, principalmente mamíferos (Ureta *et al*, 1986). Se pudo observar que los anticuerpos monoclonales 3C, 5A y 13 detectan bandas débiles de reacción cruzada en el extracto

crudo de *Drosophila*, que por el tamaño molecular podrían corresponder a hexoquinasas (tabla 3). No se realizó ningún experimento posterior con geles nativos para determinar la identidad de las bandas de reacción cruzada detectando simultáneamente la actividad enzimática.

El anticuerpo monoclonal 3C reconoce un epítipo localizado dentro del fragmento de 10 kDa derivado de la región amino terminal de la isoenzima A. Este anticuerpo también reconoce una zona similar en hexoquinasas de otras especies. El fragmento de 10 kDa se considera un dominio de unión de HK A a la membrana mitocondrial externa y hasta donde se ha observado, todas las hexoquinasas examinadas tienen la capacidad de unirse al organelo. De tal forma que no es sorprendente que la estructura del dominio de unión, representado en este caso por el epítipo para el anticuerpo monoclonal 3C, presente reacción cruzada con hexoquinasa de *Drosophila*. Tal conservación, no implica similitud de organización funcional, puesto que las hexoquinasas de *Drosophila* tienen tamaños moleculares aproximados de 50 kDa y no se conoce su estructura de dominios. Sin embargo, es probable que exista una secuencia importante en la unión de la proteína a la mitocondria que es altamente conservada y se mantiene también en este organismo.

El anticuerpo monoclonal 5A reconoce un epítipo que se ubica dentro de un segmento de 40 kDa localizado en el extremo carboxilo terminal de HK A de cerebro de rata que se asocia con la función catalítica de la enzima, es decir, contiene los sitios de unión a glucosa y ATP. El epítipo reconocido por 5A en hexoquinasa de *Drosophila* podría representar una secuencia de aminoácidos importante en la función catalítica, la cual es altamente conservada entre estas enzimas.

Se ha descrito previamente que el anticuerpo monoclonal 13 tiene un efecto inhibitorio pequeño sobre la capacidad de la enzima para unirse a la membrana mitocondrial y por otros estudios se ha determinado que reconocería un epítipo presente entre el fragmento de 50 y 10 kDa de HK A, lo que conduce a pensar que la reacción cruzada que detecta este anticuerpo en el extracto crudo de *Drosophila* podría deberse a una secuencia conservada presente en la unión de ambos dominios de la enzima de rata que también es conservada en hexoquinasas de otras especies.

Finalmente, también determinamos la existencia de reacción inmunológica cruzada de extracto crudo de *Drosophila* con anticuerpos policlonales contra HK A de rata. Se observó la presencia de numerosas bandas débiles de reacción en la zona de migración correspondiente al tamaño molecular de hexoquinasa de mosca (tabla 3), pero los resultados obtenidos con el suero control demostraron la inespecificidad de algunas de esas bandas, implicando la necesidad de someter el suero inmune a un procedimiento de purificación más acucioso.

4.- Análisis genético molecular de los genes de hexoquinasa en *D. melanogaster*, mediante el uso de sondas heterólogas.

El aislamiento de los cDNA's que codifican las isoenzimas A, B y C de rata ha permitido establecer que ellas son muy parecidas, con tamaños moleculares de alrededor de 100 kDa y formadas por la repetición de una secuencia peptídica de aproximadamente 50 kDa. En cambio, HK D (GK) de mamíferos y las hexoquinasa de levadura, las cuales tienen tamaños moleculares de alrededor de 50 kDa, consisten de una cadena peptídica simple que es similar a la mitad de la estructura duplicada de las isoenzimas de hexoquinasa de mamíferos de 100 kDa (Kogure *et al*, 1993). Por ejemplo, si se comparan las mitades amino y carboxilo de las isoenzimas A, B, y C de rata entre sí y las mitades respectivas de las isoenzimas A de humano y ratón se observan porcentajes de identidad que varían entre 47-59 %. Cuando se compara la secuencia de HK D de rata con las distintas mitades amino y carboxilo de las isoenzimas mencionadas los porcentajes de identidad están entre 42-57 %. Para las comparaciones realizadas con glucoquinasa (GLK) de levadura y las mitades amino y carboxilo de las isoenzimas de mamíferos, los porcentajes de identidad bajan a 31-36 %. (Para detalles de comparaciones específicas y porcentajes de identidad referirse a la matriz de identidad de secuencias aminoacídicas de hexoquinasa publicada por Fothergill-Gilmore *et al*, 1993).

Estos datos de secuencia permiten sugerir que, si las isoenzimas de hexoquinasa son tan conservadas, es posible realizar un análisis del DNA genómico de una especie distante filogenéticamente usando una sonda de mamífero. Un ejemplo de esta

aproximación en *Drosophila* lo constituye el clonamiento de los genes que codifican para α -amilasas y la determinación de su organización estructural con una sonda de ratón (Gemmill *et al*, 1985, Levy *et al*, 1985). Con esta información en mente se realizó un análisis de DNA genómico de *D. melanogaster* usando sondas heterólogas de rata y levadura.

4.1 Análisis de hibridación de DNA genómico de *D. melanogaster* con las sondas de rata.

Como las HK A, B y C son altamente conservadas y las secuencias de aminoácidos de sus mitades amino y carboxilo presentan identidades del orden de 50%, se espera que esta similitud de secuencias se repita a nivel de las secuencias nucleotídicas (sin tomar en cuenta la degeneración del código genético). Además, se espera que las cuatro sondas de rata (cDNA's que codifican las isoenzimas A, B, C y D completas) detecten fragmentos de tamaños similares en DNA genómico de la misma especie digerido con una enzima de restricción determinada. Más aún, si la organización de la estructura intrón-exón se mantiene en las cuatro isoenzimas, cosa que sólo ha sido determinada y demostrada para HK D (Magnuson *et al*, 1989, Kogure *et al*, 1993), HK B de rata (Printz *et al*, 1993) y HK B de humano (Malkki *et al*, 1994, Lehto *et al*, 1995, Printz *et al*, 1995) se espera mayor parecido en el patrón de restricción obtenido usando las sondas de cDNA disponibles.

Aceptando un cierto margen de error en el cálculo de los tamaños moleculares (resumidos en la tabla 12), se pudo determinar que las sondas A, B y D detectan tres fragmentos distintos de aproximadamente 3,0-3,3 y 2,3 kb en el DNA genómico de rata digerido con *EcoRI*, además las sondas B y D detectan fragmentos adicionales de 7,0 y 4,6 kb, respectivamente. Estos podrían corresponder a productos de digestión incompleta, de los fragmentos de 3,3 y 2,3 kb antes descritos. La sonda B detecta un fragmento más pequeño de aproximadamente 1,8 kb que no es detectado por ninguna de las sondas que codifican las otras isoenzimas. Esto podría explicarse si la secuencia de cDNA de HK B, cuyo tamaño es 3,6 kb, contiene en su interior un segmento de secuencia que no tiene homólogo exacto en las otras secuencias. Una explicación

Tabla 12. Análisis de DNA genómico de *D. melanogaster* mediante el uso de sondas heterólogas.

Sonda de Análisis		Tamaño (kb) de los fragmentos de restricción <i>EcoRI</i> que dan señal de hibridación en el DNA genómico de :		
Secuencia codificada	Tamaño cDNA (kb)	<i>R. norvegicus</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>D. melanogaster</i>
HK A rata	3,6	3,3 - 2,3	N.D.	3,6
Hex B rata	3,6	7,0 - 3,0 - 2,3 - 1,8	N.D.	3,5 - 3,1
Hex C rata	2,5	2,3	N.D.	(-)
Hex D rata	2,3	4,6 - 3,5 - 3,0	N.D.	4,8 - 3,5 - 2,8 - 0,7
HXK1 levadura	3,5	N.D.	4,6 - 2,1	5,4
HXK2 levadura	3,8	N.D.	3,7- 2,7- 2,1- 1,4- 1,2	2,8 - 2,2
GLK (Glucoquinasa levadura)	3,4	N.D.	10,9	(-)

N.D. : No determinado.

(-) : Señal de hibridación no detectada.

alternativa es que el fragmento *EcoRI* de 1,8 kb, reconocido por la sonda B sea una secuencia inespecífica detectada por esta sonda solamente, lo cual podría quedar avalado por el hecho de que la señal de hibridación es bastante débil. Por otra parte, la sonda C sólo reconoce el fragmento de 2,3 kb reconocido por A, B y posiblemente D (que reconoce el digerido parcial de 4,6 kb).

Las sondas de cDNA que codifican HK A, B y D de rata detectan un fragmento de aproximadamente 3,5 kb en DNA genómico de *Drosophila* digerido con *EcoRI*, que podría corresponder a una misma secuencia altamente conservada y detectada por estas sondas en DNA genómico de rata. La sonda B detecta un fragmento adicional de 3,1 kb y la sonda D otros tres fragmentos de aproximadamente 4,8-2,8 y 0,7 kb. Los fragmentos de 4,8 y 2,8 kb podrían corresponder, aceptando cierto margen de error en el cálculo de los tamaños moleculares, a los fragmentos de 4,6 y 3,0 kb detectados por la sonda D en rata. Si este es el caso, el fragmento de 0,7 kb parece ser un fragmento específico presente en *Drosophila* y reconocido allí sólo por la sonda D. Alternativamente, los fragmentos de 2,8 y 0,7 kb de *Drosophila*, detectados por esta misma sonda (D) podrían ser productos de digestión parcial del fragmento de 3,5 kb, ya que la suma de ambos restablece su tamaño. Una explicación alternativa es que ambos fragmentos de 2,8 y 0,7 kb representen secuencias diferentes a las reconocidas por las otras sondas, que sólo son reconocidas por D, lo cual podría explicarse tomando en cuenta que el parecido entre las isoenzimas A, B y C es mayor que el parecido entre estas mismas y la isoenzima D. La sonda C no detecta ninguna señal de hibridación en DNA genómico de *Drosophila*, al menos en las condiciones experimentales descritas en este trabajo. Finalmente, como se aprecia en la tabla, no se realizaron experimentos de hibridación con las sondas de rata en DNA genómico de *S. cerevisiae*.

4.2 Análisis de hibridación del DNA genómico de *Drosophila* con las sondas de levadura.

Hexoquinasas PI y PII de levadura (HXK 1 y 2, respectivamente) presentan 78 % de identidad a nivel de secuencia de aminoácidos, en tanto que la identidad entre cualquiera de ellas y glucoquinasa (GLK) del mismo organismo es de aproximadamente

39 % (Fothergill-Gilmore *et al*, 1993). Estos datos sugieren que las sondas de levadura HXK PI y PII deberían presentar un patrón de reconocimiento similar en experimentos de hibridación de DNA genómico homólogo y digestión con una misma enzima de restricción. En tanto que GLK podría presentar un patrón ligeramente divergente a las sondas anteriores.

Los resultados resumidos en la tabla 12 muestran que este no es el caso y se puede observar la presencia de solamente un fragmento en común de aproximadamente 2,1 kb que podría corresponder a un segmento altamente conservado y reconocido por ambas sondas. La sonda para GLK de levadura detecta un fragmento de alto peso molecular, que como es de esperar, tampoco es reconocido por las sondas para PI y PII. La sonda para PII detecta un fragmento de 2,8 kb y otro de 2,2 kb en *D. melanogaster* que, aceptando un pequeño margen de error, podrían corresponder a una misma secuencia conservada que es detectada también en DNA genómico de *S. cerevisiae* (fragmentos de 2,7 y 2,1 kb, respectivamente).

Es importante recordar que no se conoce la organización funcional y estructural detallada de otras isoenzimas de 50 kDa, diferentes de hexoquinasas de levadura, por lo cual las sondas de rata y levadura no necesariamente deben presentar un patrón de reconocimiento similar en DNA genómico de *Drosophila* al detectado por las mismas sondas en los DNA homólogos respectivos. Por lo tanto la interpretación de los resultados dada aquí es meramente especulativa y se basa en los datos recopilados en la literatura y en lo que teóricamente debiera esperarse según esta información.

4.3 Análisis de restricción de DNA genómico de *D. melanogaster*, usando el cDNA completo que codifica HK B de rata.

El DNA genómico de *D. melanogaster* fue sometido a digestiones totales simples y dobles con varias enzimas de restricción en distintas combinaciones. Se seleccionaron enzimas de restricción que tienen secuencias de reconocimiento de 6 pb en el DNA, de acuerdo a información pertinente a algunos mapas de restricción de las sondas disponibles. El DNA así tratado fue posteriormente analizado mediante hibridación con el cDNA completo que codifica HK B de rata. Algunos de los resultados

de este análisis permitieron construir dos mapas heterólogos y parciales de restricción. Estos mapas muestran que la zona detectada por la sonda en DNA genómico de *D. melanogaster* abarca una región con un tamaño mínimo de aproximadamente 6.5 - 9 kb. Esta zona podría ser más grande si se tiene en cuenta que en algún punto debe existir una conexión entre ambos mapas parciales, pudiendo abarcar hasta 18 o más kb, lo que con los datos actuales no podemos determinar. Más aún, debido a que la sonda es cDNA, ésta podría estar reconociendo segmentos no contiguos en el genoma de *Drosophila*, dificultando de esta manera la asignación correcta de algunos sitios de restricción. Por esta razón los mapas construidos sólo pueden ser considerados como una proposición. La interpretación de estos resultados no es fácil, pero se apoya en algunos datos bibliográficos para reafirmar lo planteado.

Se sabe que el cambio desde genes no interrumpidos a genes interrumpidos ocurre en los eucariones inferiores. En hongos (excepto levadura) la mayoría de los genes son interrumpidos, pero ellos tienen un pequeño número de exones y sus tamaños no son mayores que 5 Kb. El cambio a genes largos ocurre dentro de los eucariontes superiores y en general en insectos los genes llegan a ser significativamente más grandes. El estudio de la organización del genoma en *D. melanogaster* muestra que el 17 % de los genes son no interrumpidos, un 30-40 % tiene 2 exones, el 17 % tiene 3 exones, el 10 % tiene 4 exones y el 15 % tiene 5 exones. Muy pocos genes tienen entre 7 y 14 exones y aproximadamente el 1 % tiene más de 40 exones. Es decir, que aproximadamente el 70-80 % de los genes en *Drosophila* tiene entre 2 y 5 exones. En eucariontes superiores no existe ninguna correlación entre el tamaño del gen y el tamaño del mRNA. Es más, tampoco existe una buena correlación entre el tamaño génico y el número de exones del mismo. Por lo tanto el tamaño de un gen depende en su mayor parte de las longitudes de sus intrones individuales. Como regla general se acepta que en mamíferos, insectos y aves el gen promedio tiene aproximadamente 5 veces la longitud de su mRNA (Lewin, B., 1997).

Dada esta información, es necesario referirse a casos puntuales descritos en la literatura acerca de la organización de algunos genes que codifican enzimas que

participan en el metabolismo de los hidratos de carbono en *Drosophila*. Por ejemplo, se ha determinado que los genes para α -amilasas de *D. melanogaster*, una enzima monomérica de 54,5 kDa, existen en forma duplicada e invertida en el genoma de la mosca (Levy *et al*, 1985). Los análisis de restricción e hibridación usando como sonda un clon λ que contiene la región codificante α -amilasa derivada del DNA genómico del organismo, revelan que la región abarcada por estos loci duplicados es de aproximadamente 14 kb. Dentro de esta región los genes *amy*¹ y *amy*³ han sido asignados a fragmentos de 3,8 y 5,6 kb respectivamente, es decir, ambos genes abarcan una región de aproximadamente 9,4 kb (Levy *et al*, 1985, Gemmill *et al*, 1985).

Un análisis similar realizado en *D. miranda* en este mismo locus (*amy*), usando como sonda un clon λ de *D. melanogaster* mostró que la región *amy* funcional está contenida en un fragmento de 5,4 kb. Sin embargo, debido a que la sonda detecta una zona mucho mayor, de aproximadamente 13 kb, los autores presumen que el locus *amy* podría estar duplicado también en esta especie (Doane *et al*, 1987).

También se ha descrito que la enzima sn-glicerol-3-fosfato deshidrogenasa de *D. melanogaster*, una enzima dimérica con un tamaño molecular de subunidad de aproximadamente 38,8 kDa, está codificada por un gen de aproximadamente 5 kb (incluyendo 8 exones y 7 intrones) que se encuentra duplicado en tándem. La copia duplicada del gen original, denominado *gen 3'*, está formado por los seis últimos exones solamente y abarca una región de 4,5 kb. El par de genes, en conjunto, comprenden una región de aproximadamente 10 kb en el DNA genómico de *Drosophila* (Bewley *et al*, 1990., Kusakabe *et al*, 1990., Reed *et al*, 1993., Takano *et al*, 1993).

Otra enzima exhaustivamente estudiada en poblaciones naturales de *D. melanogaster* es alcohol deshidrogenasa. Es una enzima dimérica que tiene un tamaño molecular subunitario de aproximadamente 27,8 kDa y es codificada por un gen que contiene 3 exones separados por dos intrones, en una región de aproximadamente 4,5 kb de DNA. Se ha encontrado que las ocho especies del subgrupo *melanogaster* poseen un simple gen *adh* funcional y 300 pb río abajo de este gen está *adhr*, de función desconocida pero que obviamente surgió a partir de *adh* por un evento de duplicación.

Esto significa que ambos genes ocupan una región de aproximadamente 9-10 kb en el DNA genómico de las especies del subgrupo (González-Duarte *et al*, 1986., Jeffs *et al*, 1994). Otros estudios realizados en los genes *adh* encontrados en especies del grupo *Repleta* muestra que la mayor parte de ellas tiene tres genes arreglados en tándem (*adh-Ψ*, *adh-2* y *adh-1*) que abarcan alrededor de 9 kb de DNA (Sullivan *et al*, 1994).

Un ejemplo distinto lo constituyen los dos genes separados que codifican gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa en *Drosophila*. Esta es una enzima de aproximadamente 37 kDa cuyos genes han sido detectados y aislados usando una sonda de 2,1 kb del gen de levadura. La región codificante de dicha sonda detecta una región de aproximadamente 2 kb en un clon genómico y una región de aproximadamente 3 kb en otro clon. Posteriormente se demostró que ambos clones codifican formas diferentes de la enzima e hibridan en cromosomas distintos de la mosca. Es decir, dos genes no ligados que codifican formas distintas de la misma enzima abarcan en total aproximadamente 5-6 kb de DNA no contiguo (Sullivan *et al*, 1995).

Las isoenzimas de hexoquinasas de *D. melanogaster* analizadas en este trabajo tienen tamaños moleculares aproximados de 50 kDa. Una proteína de este tamaño debiera estar formada por aproximadamente 450 aminoácidos y codificada por al menos 1,35 kb de DNA (Sambrook *et al*, 1989). Por lo tanto, basados en los datos de la literatura antes mencionados, se propone la posibilidad que la amplia región de DNA, de aproximadamente 9 kb o más, reconocida por la sonda de HK B de rata, podría contener los genes de Hex A y B estrechamente ligados [ubicados en el cromosoma I (X)] aún si tuvieran una estructura intrón-exón similar a la descrita para sn-glicerol-3-fosfato deshidrogenasa. Si los genes de Hex A-B y Hex C tienen alta homología entre sí, la amplia zona reconocida por la sonda de HK B de rata podría estar representando la región de DNA genómico que codifica Hex C en *Drosophila* (localizada en el cromosoma II). Una explicación alternativa es que la sonda de HK B esté reconociendo los posibles genes estructurales para Hex A, B y C simultáneamente y por esta razón no es posible unir los dos mapas heterólogos parciales obtenidos.

En mamíferos, cuando se compara la longitud de los genes con la longitud de

sus productos de mRNA se observa que los mensajeros son todos más pequeños que 10 Kb, mientras que los genes pueden tener hasta 100 Kb. Genes muy grandes son el resultado de intrones muy grandes y no el resultado de aumento en la capacidad codificante de sus mRNA's (Lewin, B., 1997). De esta forma, teniendo en cuenta el tamaño aumentado del genoma de los mamíferos respecto del genoma de *Drosophila*, uno debiera esperar genes de hexoquinasas más complejos en los mamíferos del punto de vista estructural. Por ejemplo, se conoce la estructura intrón-exón de los genes que codifican GK y HK B de rata y humano. Se sabe que el gen de GK de hígado de rata, que codifica una proteína de 50 kDa, consiste de 10 exones separados por 9 intrones dentro de una región de 15,5 kb (Magnuson *et al*, 1989, Kogure *et al* 1993). La isoenzima B de rata, una proteína de masa molecular 100 kDa, está codificada por un gen mucho más grande que abarca una región con una longitud mínima de 41 kb y que consiste de 18 exones separados por 17 intrones (Printz *et al*, 1993). Al respecto, se debe recordar que el genoma de los mamíferos es más complejo que el genoma de *Drosophila*. De hecho, el tamaño del genoma haploide de rata (3×10^9 pb) es un orden de magnitud mayor que el genoma de mosca ($1,7 \times 10^8$ pb). De tal forma que no es sorprendente encontrar que la organización estructural de los genes de hexoquinasas en organismos superiores sea de mayor complejidad, como lo demostrado en los genes de HK B y D de rata y HK B de humano (Malkki *et al*, 1994, Lehto *et al*, 1995, Printz *et al*, 1995).

4.4 Análisis de hibridización de DNA genómico de otras especies de la familia *Drosophilidae*, usando el gen de HK B de rata.

Estos estudios mostraron hibridación de la sonda que codifica para HK B en DNA genómico digerido con *EcoRI* de otras dos especies de la familia *Drosophilidae*. *D. gaucha* presenta dos bandas de hibridación de 6,8 y 3,5 kb mientras que *D. pavani* muestra una banda similar de 3,5 kb y otra de 2,8 kb, lo que sugiere la existencia de polimorfismos en la organización estructural de los loci que codifican hexoquinasas en esta familia de Dípteros.

Dentro del género *Drosophila* y el subgénero *Drosophila Fallén* se ha descrito

el grupo *Mesofragmática* que incluye las especies *D. mesofragmática*, *D. gaucha* y *D. pavani*. Las tres forman un grupo de especies fácilmente confundibles por lo que se dice que son especies gemelas. De hecho, el cruzamiento entre las tres especies produce híbridos estériles (Brncic, 1957). Estos antecedentes sugieren que sería raro encontrar diferencias a nivel de DNA en especies que por características fenotípicas son tan semejantes. Sin embargo, en el subgrupo de especies de *D. melanogaster*, existe evidencia molecular que confirma conservación de la estructura duplicada de los loci para alfa-amilasas en la mayor parte de las especies del subgrupo, pero también revela la existencia de polimorfismos en dicha región génica, específicamente en las especies gemelas *D. orena*, *D. erecta* y *D. teissieri* (Payant *et al*, 1988).

5.- Análisis de DNA genómico de *D. melanogaster* mediante reacción de polimerización en cadena (PCR).

5.1 Construcción de los partidores para hexoquinasas.

Los partidores fueron construidos a partir de las regiones de secuencia más conservadas de un alineamiento múltiple de tres cDNA de HK A de mamíferos. Las zonas más conservadas de los genes de HK A de los tres mamíferos se ubican entre los nucleótidos 136, donde empieza el alineamiento múltiple de las tres secuencias, y 1437. Este alineamiento encuentra el mejor ajuste comparando la región génica que codifica las mitades amino terminales de los genes de HK A de Bovino y humano con la región génica que codifica la mitad carboxilo terminal de HK A de rata. Del tal manera que en el resto del alineamiento la secuencia de nucleótidos de cDNA comprendida entre las bases 1437-2297 no muestra otras zonas conservadas de la misma longitud y secuencia, encontradas entre los nucleótidos 136 y 1437.

La figura 27 muestra en forma parcial el alineamiento de las secuencias de aminoácidos deducidas de la mitad amino y carboxilo de HK A de cerebro de rata y HXK1 de levadura. En ella se destacan los sitios probables de unión a ATP (azul) y glucosa (rojo), además de otros dos sitios alternativos de unión a ATP (púrpura) propuestos por Griffin *et al*, 1991. Por otra parte, Schwab *et al*, 1988 y 1989 han

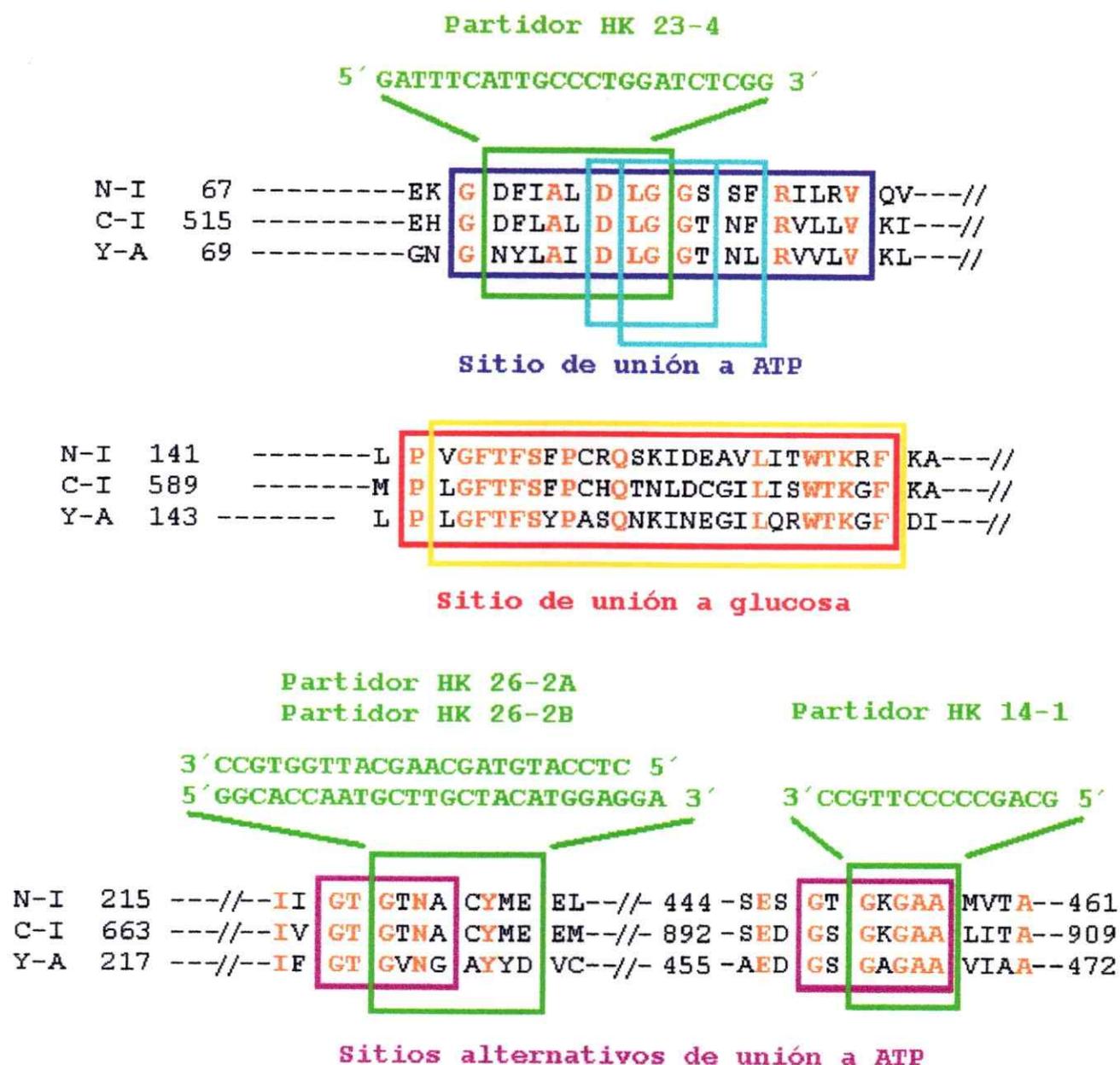


Figura 27 : Alineamiento parcial de las secuencias de aminoácidos deducidos de la mitad amino y carboxilo de HK A de rata y HK PI de levadura. Se destacan los sitios propuestos de unión a glucosa (cajas de color rojo y amarillo), ATP (cajas en azul y calipso) y sitios de unión alternativos a ATP (cajas de color púrpura) y las secuencias de los partidores diseñados (cajas de color verde).

planteado la existencia de dos sitios potenciales y diferentes de unión a ATP entre los aminoácidos 84-89 (mitad amino terminal de HK A) y 532-536 (mitad carboxilo terminal de HK A) [calipso] y la existencia de un sitio potencial de unión a glucosa entre los aminoácidos 149-175 (mitad amino terminal de HK A) [amarillo]. La ubicación de estos sitios conservados, en HK A y levadura, y tan importantes catalíticamente en ambas isoenzimas ha sido realizada tomando en cuenta los datos de cristalografía existentes para hexoquinasas de levadura y por comparación con sitios de unión a nucleótidos secuenciados de otras proteínas (Schwab *et al*, 1988., Schwab *et al*, 1989., Griffin *et al*, 1991). En color verde se destaca la ubicación de la secuencia de nucleótidos de los partidores diseñados y la secuencia de aminoácidos deducida que abarcan dichos partidores. Como se puede observar en la figura, el partidor HK 23-4 se ubica al comienzo del probable sitio de unión a ATP descrito. Los partidores HK 26-2A y 26-2B, que son complementarios, se localizan parcialmente dentro de un sitio de unión a ATP alternativo, al igual que el partidor HK 14-1 que se ubica enteramente dentro del otro sitio de unión a nucleótido alternativo. De esta manera, un fragmento amplificado por la mezcla I de partidores (PHK 23-4 + PHK 26-2A) debería contener el sitio principal de unión a ATP, uno de los sitios alternativos y el sitio completo de unión a glucosa. La mezcla de partidores II (PHK 26-2B + PHK 14-1) debería amplificar un fragmento que contenga ambos sitios de unión a ATP alternativos. La mezcla de partidores III en cambio, debería amplificar un fragmento que contenga los cuatro sitios importantes descritos. Es importante mencionar que ambas mitades de las proteínas de 100 kDa son muy similares y también muy similares con HXK1 y HXK2 de levadura (isoenzimas PI y PII) y en ambas mitades están presentes los sitios de unión descritos y mostrados en la figura 27. Se cree que pequeñas variaciones en la secuencia de aminoácidos y substituciones no conservativas de algunos residuos dentro de estas secuencias son la razón de la falta de función catalítica de estos sitios en la mitad amino terminal de la molécula (Griffin *et al*, 1991).

Basados en lo previamente expuesto, pensamos que al menos alguna de las mezclas de partidores debiera amplificar en *D. melanogaster* alguna secuencia con

similitud a HK A. El diseño de estos partidores ha contemplado las zonas de mayor importancia dentro de la molécula de hexoquinasa, como lo son los sitios probables de unión a ambos sustratos. Si bien el diseño mismo augura resultados positivos, ello no es garantía, puesto que se requiere optimizar las condiciones de reacción en cadena de la polimerasa con cada mezcla de partidores para obtener los fragmentos de tamaños esperados en cDNA de HK A y luego amplificar fragmentos con semejanza a hexoquinasa en ambos DNA genómicos de rata y mosca.

Los partidores diseñados poseen algunas características que podrían ser ventajosas para un proceso de amplificación eficiente. Por ejemplo poseen longitudes de nucleótidos comprendidas entre 14 y 26 pb, un contenido G-C que varía entre un 41 y 65 % y todas las posibles bases mal apareadas fueron ubicadas en el extremo 5' del partidor respectivo. Por otra parte, las temperaturas de fusión (T_m) varían entre 66° y 96° C, lo que da temperaturas de alineamiento estimadas ($T_m-5^\circ\text{C}$) entre 61° y 91° C, permitiendo darle mayor especificidad a la reacción. Las temperaturas de fusión para la mezcla II y III dan diferencias de 30° y 16° C respectivamente, lo que pudo constituir un inconveniente ya que se recomienda que las T_m 's de una pareja de partidores sea lo más parecida posible. No obstante, es importante destacar que la temperatura de alineamiento de un par de partidores en la reacción PCR no sólo depende de la temperatura de fusión del par molde-partidor menos estable, sino también del tamaño del producto PCR esperado, de la longitud de los partidores, del contenido relativo G-C, de la secuencia, de la estructura secundaria formada por los partidores y de la composición del tampón usado en la reacción (Rychlik *et al*, 1990., Hoelzel *et al*, 1992). De esta manera, la temperatura de alineamiento estimada siempre constituye un punto de partida y ellas deben ser determinadas y optimizadas experimentalmente para cada par de partidores. En nuestro caso, optimizamos las condiciones de PCR y demostramos que las tres mezclas de partidores amplifican fragmentos del tamaño esperado cuando se usa como molde cDNA de HK A de rata. Las mezclas de partidores I y II, en las condiciones determinadas en este trabajo, amplifican fragmentos con semejanza a hexoquinasa de rata cuando el molde es DNA genómico de *D. melanogaster*.

5.2 Alineamiento de las mezclas de partidores I, II y III a los diferentes moldes de DNA.

a) Hibridación de las tres mezclas con cDNA de HK A.

Las tres mezclas de partidores sintetizan fragmentos de tamaño esperado cuando se usa como molde cDNA de HK A ya que los partidores fueron diseñados a partir de secuencias de cDNA de HK A de mamíferos, y una de ellas corresponde a HK A de rata. De todas formas fue necesario determinar las condiciones óptimas para obtener el fragmento de interés con cada una de las mezclas.

Se usaron distintos parámetros de ciclaje y se pudo observar que la mezcla de partidores I sintetiza el fragmento de 0,47 kb en cantidad adecuada cuando se usa una temperatura de alineamiento de entre 50°- 60°C (Otros protocolos probados). Temperaturas mayores (72°C) bajan el rendimiento del fragmento de interés y temperaturas menores de 50° aumentan la amplificación inespecífica y la aparición de fragmentos de mayor tamaño al esperado, que parecen ser multímeros ya que duplican y triplican el tamaño molecular del fragmento esperado (No mostrado).

La mezcla de partidores II amplifica sólo un fragmento de aproximadamente 0,67 kb, sin amplificación inespecífica, cuando la temperatura de alineamiento es de 72°C (Otros protocolos ensayados). Al disminuir la temperatura de alineamiento progresivamente desde 60° a 45°C se observa que aparecen fragmentos de mayor tamaño molecular (posiblemente multímeros) y aumenta notablemente la amplificación inespecífica.

Cuando se usa la mezcla de partidores III con una temperatura de alineamiento similar a la T_m más baja del par de partidores (72° C) se obtiene el fragmento esperado y otros de menor tamaño en baja cantidad, pero no se observa amplificación inespecífica. Temperaturas de alineamiento de 55° y 60°C amplifican el fragmento esperado de 1,14 kb además de un multímero y al mismo tiempo aumenta la amplificación inespecífica.

b) Hibridación de las diferentes mezclas con el DNA genómico homólogo de *Rattus norvegicus*.

Se observó por ejemplo, que 100 ng de DNA genómico de rata no son suficientes para amplificar fragmentos de tamaño definido, observándose solamente

amplificación inespecífica con esa cantidad en varias condiciones de PCR. Esto se debe a que el tamaño del genoma de rata, que contiene 3×10^9 pb, requiere al menos 1 μ g de DNA para tener representada la secuencia de interés. Con el protocolo 2 ensayado con la mezcla I se amplifica el fragmento esperado de aproximadamente 0,47 kb. Sin embargo, cuando se usa el cDNA completo de HK A como sonda en un experimento de hibridación se observa que dicho fragmento no es reconocido por la sonda.

Cuando se usa la mezcla de partidores II en DNA genómico de rata para amplificar el fragmento esperado de 0,67 kb, se observa que sólo variando las condiciones del programa 2 se amplifica este fragmento, además de otros dos más pequeños. No se realizaron experimentos de hibridación para determinar si alguno de estos fragmentos era reconocido por HK A. Pero, cuando las reacciones PCR se realizaron con las condiciones descritas en el programa 3 se observó que el único fragmento de aproximadamente 0,4 kb amplificado tampoco es reconocido por la sonda.

En relación a la mezcla de partidores III, se realizó un experimento en las condiciones descritas en el programa 2. Se obtienen cinco fragmentos de 0,38 a 0,71 kb en buena cantidad, pero ninguno de ellos es del tamaño esperado (1,14 kb). Tampoco se determinó mediante hibridación si alguno de estos fragmentos tenía semejanzas con el cDNA de HK A de rata. Estos resultados negativos sugieren que probablemente se requieran otras condiciones de PCR para la amplificación de los fragmentos esperados con la mezcla I y II y análisis simultáneo de hibridación con la sonda para HK A. Sin embargo, no se puede excluir la posibilidad que ambas mezclas no puedan amplificar dicho fragmento debido a algún impedimento en el proceso de extensión, el cual podría ser explicado por la presencia de secuencias intermedias o intrones que detengan la reacción debido a su longitud. Si la estructura intrón-exón de todos los genes de hexoquinasa son conservadas como se cree (Kogure *et al*, 1993) y la estructura determinada para HK B es similar en HK A, esa podría ser la explicación del fracaso para amplificar fragmentos de 0,47 y 0,67 kb semejantes a HK A en DNA genómico de rata. La secuencia de nucleótidos del gen de HK A comprendida entre los partidores que

forman la mezcla I estaría interrumpida por dos intrones de tamaño desconocido, pero presumiblemente grandes ya que la separación de los tres primeros exones del gen de HK B es grande. La secuencia de nucleótidos comprendida entre los partidores que forman la mezcla II estaría interrumpida por cuatro intrones de tamaño más pequeño, según la estructura del gen de HK B (Printz *et al*, 1993).

A pesar de la posible presencia de intrones dentro del gen de HK A de rata, cabe señalar la posibilidad que los partidores puedan encontrar regiones de apareamiento dentro de las secuencias intermedias y de todas formas pudiese producirse amplificación de fragmentos de tamaño definido con semejanzas a HK A, aunque no necesariamente del tamaño esperado. Por otra parte, el fracaso para amplificar secuencias semejantes a hexoquinas en DNA genómico de rata no invalida la posibilidad de utilizar con éxito en *Drosophila* los partidores diseñados, puesto que es posible que la estructura intrón-exón no sea igual. Dichas secuencias intermedias, si existen, podrían ser más pequeñas y permitir la amplificación de fragmentos de tamaño desconocido en DNA genómico de mosca. Es importante recordar que no se conoce la estructura intrón exón en hexoquinas de organismos inferiores y no necesariamente debe parecerse a la estructura determinada para GK de rata.

c) Hibridación de las diferentes mezclas de partidores al DNA genómico heterólogo de *D. melanogaster*.

Se determinó que la cantidad adecuada de DNA genómico de mosca para obtener fragmentos de tamaño definido era de 100 ng. Esto se debe a que la complejidad del genoma de *Drosophila* de $1,7 \times 10^8$ pb hace posible que en una menor cantidad de DNA molde esté representada la secuencia de interés.

Cantidades mayores (500-800 y 1000 ng) resultaron en fracaso de la reacción de amplificación (No mostrado), probablemente debido a un exceso de secuencia blanco y mayor concentración de impurezas e inhibidores de la reacción en la muestra.

Según el análisis de hibridación algunos de los fragmentos más pequeños amplificados con la mezcla I, de 0,54 y 0,56 kb, son reconocidos por la sonda. Estos

fragmentos migran muy cerca unos de otros lo que podría dificultar su separación si eventualmente se decidiera clonar alguno de ellos.

Con la mezcla II se amplifica el fragmento de tamaño esperado además de otros de menor y mayor tamaño molecular. La sonda de HK A reconoce los fragmentos de 0,46 y 0,67 kb con menor intensidad que la señal homóloga. Se decidió clonar el fragmento de aproximadamente 0,67 kb, por su mayor tamaño molecular.

La mezcla de partidores III no amplifica el fragmento de tamaño esperado, aún cuando se obtienen otros fragmentos de tamaño más pequeño. No se realizaron experimentos de hibridación para determinar cual de ellos presentaba semejanzas con HK A de rata.

5.3 Análisis del plásmido pBS-E1.4 mediante digestión con enzimas de restricción.

El análisis de restricción del plásmido pBS-E1.4 con *EcoRI*, *XhoI* y *ClaI*, reveló que efectivamente éste corresponde a un inserto de aproximadamente 0,67 kb que contiene un sitio interno *EcoRI*, el cual origina dos fragmentos de aproximadamente 0,45 y 0,22 Kb.

5.4 Análisis de hibridación del gen de HK A de rata, utilizando como sonda el fragmento clonado de 0,67 kb de *Drosophila*.

Los resultados de este análisis revelaron que el fragmento PCR de 0,67 kb de *Drosophila* muestra una señal importante de hibridación con el fragmento de 1,5 kb. Además, también se observa una señal menos intensa con ambos fragmentos de 0,9 y 0,8 kb. Esto implica que la sonda encuentra similitud a través de toda la secuencia de cDNA que codifica el gen de HK A. La señal menos intensa dada por el fragmento de 0,8 kb se ubica en el extremo 3' del gen o mitad carboxilo terminal, lo cual no es sorprendente debido a que se conoce que ambas mitades comparten alta identidad y la disminución en la intensidad de la señal podría deberse sólo a un efecto de proporcionalidad en las cantidades de los fragmentos más pequeños de 0,8 y 0,9 kb. Por otra parte, este experimento pone de manifiesto que lo que se tiene clonado en el plásmido Bluescript es el inserto PCR de 0,67 kb de *Drosophila*, ya que se observa una notable señal de

hibridación con el fragmento *EcoRI* de 0,45 kb y una señal un poco más débil con el fragmento *EcoRI* de 0,22 kb, cuando se usa el mismo inserto como sonda.

5.5 Secuenciación del plásmido pBS-E1.4 y análisis computacional de la secuencia.

a) Análisis de la secuencia E1.4-T7/SK a nivel de nucleótidos.

El plásmido pBS-E1.4 contiene el inserto de 0,67 kb, determinado electroforéticamente, amplificado con los partidores HK 26-2B y HK 14-1 (mezcla II) en DNA genómico de *Drosophila* y clonado en el sitio *HincII* de dicho vector. Se realizó la secuenciación del inserto, en ambos sentidos, usando los partidores T7 y SK específicos para Bluescript, lo cual dio un total de 780 pb confirmadas. La información de secuencia permite determinar con exactitud la ubicación del sitio interno *EcoRI* y precisar el tamaño real de los fragmentos visualizados mediante electroforesis (450 y 220 pb = 670 pb). Dicho sitio divide al inserto PCR de *Drosophila* en dos fragmentos de 538 pb y 155 pb, con lo cual se obtiene un tamaño molecular de 693 pb. Las diferencias en los tamaños obtenidos por electroforesis y determinados por la información de secuencia no son considerables y pueden ser explicadas por pequeños errores en la medición de la distancia de migración de los fragmentos, ya que diferencias de 1 mm implican errores de aproximadamente 100 pb.

De acuerdo al diseño de los partidores y su orientación, se esperaba que una de las hebras secuenciadas presentara la secuencia del partidor HK 14-1 y la otra hebra la secuencia del partidor HK 26-2B. Sin embargo, ambas hebras secuenciadas, E1.4-T7 y E1.4-SK, presentan en sus extremos 5' la secuencia del partidor HK 14-1 completa. Tal hallazgo se puede explicar si existe una secuencia de hibridación complementaria a la secuencia del partidor HK 14-1 en orientación invertida. Estas condiciones permitirían obtener un producto PCR con el tamaño esperado y con el mismo partidor en ambas hebras. Al respecto, es importante mencionar que en la secuencia del gen de HK A de rata existe una secuencia entre los sitios de unión a ATP y glucosa (nucleótidos 1871-1877) que posee bastante similitud con el partidor HK 14-1 (aproximadamente 50 %) y se encuentra invertida en relación a la orientación de éste. En los experimentos de PCR realizados con cDNA de HK A de rata como molde se obtiene el producto de tamaño

esperado con la mezcla II (0,6 kb aproximadamente), pero como no se determinó la secuencia no podemos excluir la posibilidad que dicho producto contenga también en ambas hebras el partidor HK 14-1. Si la secuencia amplificada en *Drosophila* con la mezcla II presenta las características de secuencia y estructura antes mencionadas, que se observan en el gen de rata, no es sorprendente encontrar que las secuencias E1.4-T7 y E1.4-SK contengan el partidor HK 14-1 en sus respectivos extremos 5'.

La figura 28 es una representación esquemática de las regiones del gen de HK A de rata que son reconocidas por las secuencias E1.4-T7 y E1.4-SK. En la figura se observa que la hebra E1.4-SK, que presenta entre los nucleótidos 678-650 parte de la secuencia correspondiente al partidor HK 14-1, reconoce la zona ubicada entre las bases 1421-1449 del gen HK A (caja azul). La región de E1.4-SK comprendida entre los nucleótidos 73-42 reconoce las bases 2445-2476 en el gen de HK A de rata (caja azul). La primera zona se localiza en la parte terminal de la región del gen de rata que codifica el extremo amino de la enzima. La segunda zona también se ubica en la parte terminal, pero de la región génica que codifica la parte carboxilo de la molécula y se localiza entre dos sitios propuestos de unión a ATP alternativos (cajas amarillas).

Por otra parte, la secuencia de nucleótidos obtenida con el partidor T7 (E1.4-T7) presenta dos regiones que encuentran similitud cuando son comparadas con el gen de HK A de rata. La primera de estas regiones está formada por los nucleótidos 39-73 y reconoce la zona comprendida por los nucleótidos 784-818 en la parte del gen que codifica el extremo amino de hexoquinasa A (caja roja). La segunda es una zona comprendida entre los nucleótidos 407-428 y reconoce las bases 2281-2302 en HKA de rata (caja roja), secuencia que también se encuentra entre los sitios de unión a ATP alternativos (cajas amarillas).

El análisis Fasta de nucleótidos realizado con ambas hebras de E 1.4-T7/SK y con la base de datos específica para *D. melanogaster*, reveló que dicha secuencia tiene 60 % de identidad en 301 pb con una proteína quinasa dependiente de calmodulina. Con respecto a esto es importante mencionar que se ha descrito que hexoquinasa de cerebro de rata presenta actividad proteína quinasa, incluyendo autofosforilación (Volker *et al*,

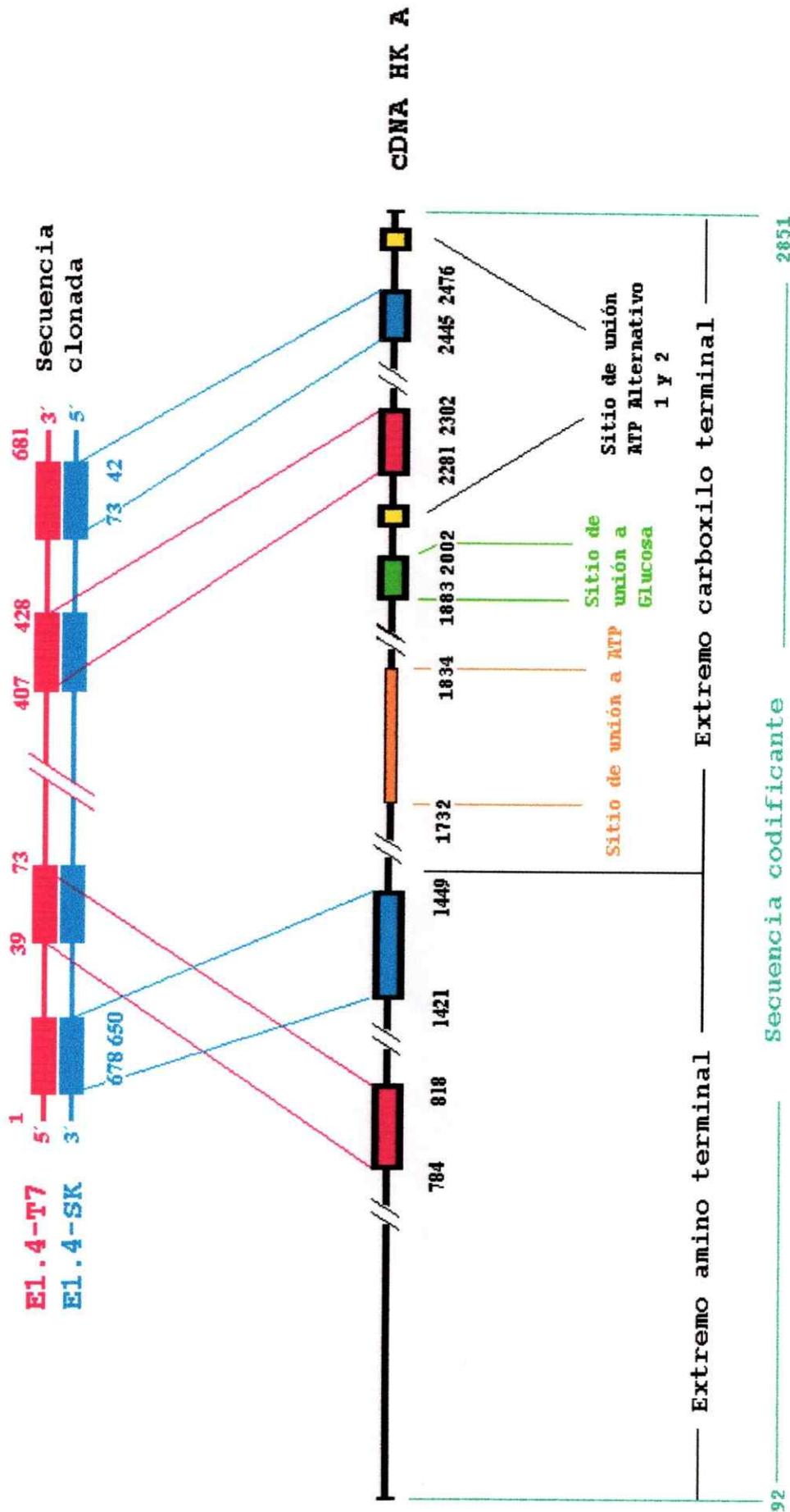


Figura 28 : Representación esquemática de las regiones del gen de HK A de rata reconocidas por las secuencias nucleotídicas de pBSE1.4-T7 y pBSE1.4-SK. Se destacan en color naranja y verde las regiones que codifican los aminoácidos implicados en unión a ATP y glucosa respectivamente. En azul y rojo las secuencias reconocidas por pBSE1.4-SK y pBSE1.4-T7 respectivamente. En amarillo se esquetmatizan las regiones que codifican aminoácidos implicados en sitios de unión a ATP alternativos.

1991). Se ha demostrado además, que hexoquinasa PII de levadura es una proteína quinasa y se ha identificado el residuo serina 15 como el único sitio de fosforilación (Herrero *et al*, 1989., Kriegel *et al*, 1994). Estos datos sugieren que la secuencia E1.4 podría codificar un pequeño segmento peptídico que podría tener semejanzas con motivos proteicos que unen nucleótidos.

A partir de los datos presentados en las tablas 7, 8 y figura 28 se puede observar que la secuencia clonada de *Drosophila* contiene regiones que reconocen zonas interesantes dentro del gen de HK A de rata que se ubican entre los sitios propuestos de unión a ATP alternativos. Esto a su vez significa que regiones importantes dentro de HK A de rata están también presentes en *Drosophila* y son reconocidas por los partidores empleados en este trabajo. Como la secuencia E1.4 es pequeña, poco o nada podemos decir del resto de la secuencia de mosca que no tiene semejanzas con las regiones descritas. Probablemente la secuencia clonada también incluya regiones intrónicas que pueden o no tener similitud con la secuencia de rata empleada como modelo de comparación.

Además, cuando se compara la secuencia nucleotídica E1.4-T7/SK con secuencias de nucleótidos de hexoquinasas de algunos vertebrados, invertebrados y plantas se observa que un fragmento de la secuencia clonada de *Drosophila* presenta valores de identidad del orden de 70 % con hexoquinasas de *Saccharomyces pombe*, *Mus musculus*, *Xenopus laevis*, *Homo sapiens* (pseudogen HK B), *Saccharomyces cerevisiae* y *Escherichia coli*. La longitud de comparación más larga en estas especies (64 nucleótidos) corresponde al pseudogen de HK B de humano. Otro aspecto importante de destacar es que con este tipo de análisis es posible identificar 5 zonas de alta identidad, en el extremo 5' de la secuencia E1.4-T7/SK. La primera zona, comprendida entre los nucleótidos 506-599 (hexoquinasas de las 8 primeras especies comparadas en la Tabla 9), corresponde a los últimos 15 aminoácidos del péptido 25 e y a los primeros 15 aminoácidos del péptido 42 e en la secuencia traducida de dicho marco de lectura. La segunda región, entre los nucleótidos 473-550, abarca el péptido 25 e solamente y agrupa a las hexoquinasas PI y GLK de *S. cerevisiae* y *S. pombe*, respectivamente (números 9-10

y 11 en la tabla 9). La tercera zona, ubicada entre nucleótidos 454-508, corresponde a los péptidos 7 e completo, a los primeros 2 aminoácidos del péptido 25 e en *E. coli* (número 12 en la tabla 9) y los primeros 10 aminoácidos del mismo péptido en el exón 6 de HK B de *R. norvegicus* (número 13 en la tabla 9). La cuarta zona, comprendida entre los nucleótidos 342-438, abarca los 8 últimos aminoácidos del péptido 10 e, el péptido 16 e completo y los primeros 5 aminoácidos del péptido 9 e en *K. lactis* (número 14 en la tabla 9) y los 9 últimos aminoácidos del péptido 10 e más los primeros 6 aminoácidos del péptido 16 e en el intrón 12 de HK B de *R. norvegicus* (número 15 en la tabla 9). Finalmente, la quinta región, ubicada entre los nucleótidos 628-654, contiene 9 aminoácidos de secuencia correspondiente al péptido 42 e de *M. musculus* (número 16 en la tabla 9).

De este análisis se puede concluir que una zona de aproximadamente 312 nucleótidos de longitud presente en la secuencia E1.4-T7/SK de 681 pb (es decir un 45,8 % de la secuencia clonada) es la que presenta las mayores identidades, a nivel de nucleótidos, con varias hexoquinas de algunos vertebrados, invertebrados y plantas. Esta región nucleotídica coincide, en la mayor parte de las especies comparadas, con parte de los péptidos 25 y 42 del marco de lectura e traducido.

b) Análisis de la secuencia E1.4-T7/SK a nivel de aminoácidos.

El estudio de la organización estructural de los genes en *D. melanogaster* muestra que, con respecto al tamaño de los exones, un 2 % de los genes tiene exones de hasta 50 pb (aproximadamente 16 aminoácidos), el 10 % de los genes posee exones de 100 pb (33 aminoácidos), el 35 % de los genes tiene exones de 150 pb hasta 250 pb (50-83 aminoácidos) y el 55 % de los genes estudiados tiene exones de 300 y más de 600 pb (200 y más aminoácidos) (Lewin, B., 1997).

Tomando en cuenta estos antecedentes, y el hecho que el tamaño mínimo de un polipéptido que puede asumir una estructura enrollada estable es de 20 a 40 aminoácidos (Lewin, B., 1997) se asumió que un exón en *Drosophila* puede estar formado por un número mínimo de 20 residuos. Esto, en conjunto con un análisis de similitud con otras proteínas (Fasta) y de la estructura misma que presentaba cada marco de lectura,

permitió decidir qué péptidos eran exones y cuáles intrones. De esta manera, los datos proporcionados por los fastas realizados con los péptidos más grandes de cada marco de lectura sugieren que el marco e podría corresponder a la hebra codificante en el DNA genómico de mosca.

Dicho marco de lectura podría ser parte de una secuencia de DNA interrumpida por un gran intrón central que abarca los nucleótidos 556 a 265 en la hebra E1.4-SK (aminoácidos 43 a 139 en el marco de lectura e traducido) y en cuyos extremos contendría parte de los exones derecho (nucleótido 680-557, péptido 42 e) e izquierdo (nucleótido 263-5, péptido 87 e). Desde el punto de vista del análisis funcional, el péptido 87 e tiene semejanzas con proteínas que se unen a DNA y podría codificar un motivo importante de unión a ATP, ya que contiene una secuencia de 10 aminoácidos correspondiente a un sitio de unión a ATP alternativo descrito en HK A de rata (Griffin *et al*, 1991) y que se encuentra repetida en ambas mitades de la enzima. Por otra parte, el péptido 42 e presenta aproximadamente 42 % de identidad en una pequeña región de 26 aminoácidos (en promedio) con proteínas proto-oncogénicas que tienen actividad proteínas quinasas del tipo Ser/Thr en tres especies de vertebrados. Este parecido sugiere que dicho péptido podría corresponder a un motivo proteico importante en la función de las enzimas quinasas, puesto que el análisis de secuencia realizado por varios investigadores sugiere que el dominio de unión a ATP de HK A es similar a este de las proteínas quinasas (Griffin *et al*, 1991). De hecho, se ha demostrado que HK A es una proteína quinasa capaz de catalizar autofosforilación como también fosforilación de otros sustratos proteicos (Volker *et al*, 1991).

Finalmente, es importante mencionar que la proposición del marco de lectura e como el codificante en el DNA genómico de *Drosophila* no se ve respaldada por los datos de secuencia nucleotídica en relación a la ubicación de intrones y exones. Las posibles secuencias de procesamiento del mRNA identificadas no cumplen exactamente con la secuencias consensos descritas (Breathnach y Chambon, 1981) y tampoco coinciden con la determinación de intrones y exones realizada en el análisis. Al respecto, es importante recordar que se supuso que la secuencia E1.4-T7/SK era correcta, ya que

fue leída por ambos extremos y por ello es poco probable que contenga errores. Esto implica que si los tiene, ellos deben estar formando parte la secuencia misma. La explicación podría ser la introducción de nucleótidos erróneos durante el procedimiento de amplificación de la secuencia, ya que éste se realizó a una temperatura de alineamiento poco estricta (45° C). La existencia de nucleótidos equivocados en la secuencia podría explicar la ausencia de un marco de lectura coherente, pero no explica la falta de señales de procesamiento.

En general, las comparaciones mediante Fasta no revelan grandes zonas de identidad con secuencias de hexoquinasas o con proteínas de esta familia. Además, las comparaciones directas (Best Fit) muestran pequeñas zonas de identidad con regiones importantes en la actividad catalítica de HK A de rata, usada como modelo de comparación. Debido a que se trata de una secuencia genómica pequeña (681pb) los datos obtenidos en el análisis de ésta pueden conducir a identificaciones erróneas respecto de la función de un péptido a través de la comparación con otras proteínas. Esto último conduce a plantear que no se puede descartar la posibilidad de que el fragmento completo clonado sea una secuencia intrónica. Los datos no son suficientes para decidir sobre ambas alternativas, sin embargo, el exhaustivo análisis realizado permitió hacer una proposición de la posible estructura de la secuencia clonada.

6.- Análisis de DNA genómico de *D. melanogaster* mediante el uso de cromosomas artificiales de levadura (YAC), que contienen DNA de la sección 8 del cromosoma I (X).

Los genes que codifican para hexoquinasas en *D. melanogaster* han sido localizados genéticamente, a través del cruzamiento de moscas con algunas variantes electroforéticas. A partir de este tipo de análisis, se conoce la ubicación de dichos genes en el mapa citogenético de *Drosophila*. Los genes para hexoquinasas A y B se ubican juntos en el cromosoma I (X), en la región citológica 8D4-E1 (Voelker *et al*, 1978) y el gen que codifica para hexoquinasa C se localiza en el cromosoma II, en la región 50C-52E (Mukai *et al* 1977, Jelnes, 1971). Actualmente, esta ubicación ha sido acotada a la región 51B-52E (Fly base-Cytosearch help).

En *Drosophila*, cada brazo cromosómico principal está dividido en 20 secciones numeradas. El cromosoma X acrocéntrico comprende las secciones 1-20, el cromosoma 2 las secciones 21-40 (brazo izquierdo) y 41-60 (brazo derecho) y el cromosoma 3 las secciones 61-80 (brazo izquierdo) y 81-100 (brazo derecho). El pequeño cromosoma 4 comprende las secciones 101-102. A su vez, cada sección numerada está dividida en seis subdivisiones letradas (A-F) y cada subdivisión letrada contiene un promedio de alrededor de 9 bandas (en el rango de 2 a 28 bandas). Dentro de cada subdivisión letrada las bandas se enumeran secuencialmente, de izquierda a derecha (Hartl, 1992., Ajioka, 1991). Así, la región 8D4-E1, que señala la ubicación de Hex A-B, significa que el o los genes caen en un punto no definido desde la cuarta banda de la izquierda en la subdivisión D, hasta la primera banda de la izquierda de la subdivisión E, en la sección 8 del cromosoma X de *Drosophila*. De la misma manera, la ubicación citológica 51B-52E, sitúa el gen que codifica hexoquinasa C en un punto no definido entre la subdivisión B de la sección 51 y la subdivisión E de la sección 52 en el brazo derecho del cromosoma 2.

Debido al gran tamaño de la región citológica que contiene el gen para hexoquinasa C, se decidió analizar siete clones YAC (cromosomas artificiales de levadura) que contienen DNA del genoma, cuyo mapa genético corresponde a la región citológica definida para los genes Hex A-B, según el último reporte del proyecto de mapa genético y secuenciación del genoma de *Drosophila* con clones YAC (Ajioka, 1991., Haini, 1994).

Con respecto a este tipo de vectores y a la cepa de levadura que los porta (AB 1380 de *S. cerevisiae*), dicha levadura contiene tres genes de hexoquinasa, los que han sido ubicados en el mapa genético del organismo. El gen que codifica hexoquinasa PI (HXK1) se ubica en el brazo derecho del cromosoma 6 (280 kb), el gen que codifica hexoquinasa PII (HXK2) se localiza en el brazo izquierdo del cromosoma 7 (1120 kb) y el gen que codifica glucoquinasa (GLK) ha sido situado en el brazo izquierdo del cromosoma 3 (350 kb) (Broach *et al*, 1991). Cabe destacar el tamaño molecular similar entre la mayoría de los clones YAC y el cromosoma 3 y 6 de *S. cerevisiae*, exceptuando el clon VII. Además, existe conservación de secuencias de aminoácidos y en

consecuencia de nucleótidos, entre los genes de hexoquinasas de rata y levadura. Por ejemplo, se ha determinado que GLK de levadura presenta identidades del orden de 35 % con las mitades amino y carboxilo de HK A, B y C de varios mamíferos (Fothergill-Gilmore *et al*, 1993., Schwab *et al*, 1991). Por ello, se concluye que las hexoquinasas son altamente conservadas y se presume que parte de este parecido debiera conservarse en *Drosophila*, y probablemente pudiera existir hibridación cruzada con los genes de levadura.

Por las razones antes expuestas, se determinó la mejor condición de separación electroforética de los YAC en geles de agarosa entre 1,0 y 1,4 %, con pulsos de 70 seg por 24 horas y luego pulsos de 120 seg por 11 horas adicionales (total 35 horas) a 165 Volts. En tales condiciones, se logró resolver los YAC de los dos cromosomas más pequeños de levadura que contienen los genes de hexoquinasas de dicho microorganismo.

El análisis de los clones YAC usando como sonda el fragmento PCR de 0,67 kb de *Drosophila* mostró que la sonda detecta una débil señal de hibridación en el clon YAC II (DYE01-42 de 325 kb), lo cual coincide con la ubicación citológica dada previamente para los genes Hex A-B. La señal de hibridación obtenida es específica ya que sólo aparece en los canales, y en la banda correspondiente, que contienen DNA de este clon y no en todas las muestras y en bandas que pudieran indicar hibridación cruzada con los genes de levadura. La sonda no detecta señal de hibridación en los clones YAC I y III a VII. Sin embargo, según la ubicación citológica de cada YAC, dos clones, YAC IV y V, presentan una pequeña región de superposición con el clon YAC II en la región D9-11. En conjunto estos datos permiten acotar un poco más la ubicación de los genes Hex A-B a las bandas C13-14 ; D8 en la sección 8 del cromosoma X de *Drosophila*. Por otra parte, la débil señal de hibridación detectada por la sonda en el clon II podría deberse a que sólo una pequeña zona de las 325 kb abarcada por este YAC presentan identidad con el fragmento PCR de 0,67 kb.

PROYECCIONES

Como resultado del presente trabajo se logró clonar un fragmento de DNA de 0,67 kb del genoma de *D. melanogaster*, mediante amplificación por PCR utilizando partidores específicos del gen de hexoquinasa A de rata. Este segmento, que muestra similitud con el gen de rata, fue localizado en la región 8C13;D8 del cromosoma X de *D. melanogaster* mediante experimentos de hibridación con cromosomas artificiales de levadura, portadores de DNA genómico de la sección 8 de dicho cromosoma.

El disponer de este fragmento de DNA de *Drosophila* permitiría en el futuro desarrollar una serie de estudios conducentes al clonado y análisis de los genes que codifican hexoquinasas en este organismo, trabajo que podría ser proyectado de la siguiente forma:

Se podría utilizar una genoteca de cDNA de *Drosophila* para amplificar, mediante PCR, fragmentos de cDNA de *Drosophila*, con los mismos partidores heterólogos obtenidos del gen de HK A de rata. Posteriormente, sería necesario rescatar los clones de cDNA de la genoteca mediante hibridación utilizando los fragmentos amplificados como sondas. La caracterización de los clones mediante secuenciación y comparación con el fragmento de 0,67 kb de DNA genómico permitiría determinar si el fragmento de 0,67 está representado en algún clon de cDNA.

Además, se pueden utilizar los clones de cDNA seleccionados, para localizarlos en los YAC portadores de la sección 8 del cromosoma X y luego, mediante la técnica de paseo cromosómico, determinar la ubicación exacta de tales clones en el cromosoma X, donde se han ubicado genética y citogenéticamente los genes *hex a-b*.

Adicionalmente, se podría realizar una prueba de funcionalidad de los genes clonados expresándolos en una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*, portadora de mutaciones nulas en hexoquinasas, y determinando su capacidad de complementar tales mutaciones. En este contexto, la caracterización bioquímica de los productos génicos

obtenidos en los ensayos de expresión podría aportar información categórica respecto de su identificación.

Por otra parte, una vez clonados y caracterizados los genes *hex a-b*, se podrá trabajar en aspectos específicos de los mecanismos de regulación de su expresión, en lo que se refiere a promotores, sitios de iniciación de la transcripción, procesamiento diferencial de los mensajeros, etc. Toda esta información puede ser de gran utilidad para comprender los mecanismos de expresión de estos genes en diferentes tejidos y estados del desarrollo de *Drosophila*.

Del trabajo realizado en esta tesis pueden desprenderse una serie de interrogantes colaterales. Por ejemplo, podría ser muy interesante detectar y cuantificar la presencia de pseudogenes y poder determinar qué eventos genéticos específicos los originaron.

Finalmente, otra tarea desafiante, desde el punto de vista de la evolución molecular de estos genes, sería la determinación de la estructura intrón-exón y la comparación de ésta para cada uno de los genes que codifican estas isoenzimas.

CONCLUSIONES

1. La cepa silvestre de *Drosophila melanogaster* (Oregón-R) presenta un patrón de tres bandas principales de actividad hexoquinasa, denominadas como Hex A, B y C. La bandas correspondientes a las isoenzimas B y C presentan las formas B1-B2 y C1-C2 respectivamente, en tanto que la banda correspondiente a Hex A presenta las variantes A1-A2.
2. El análisis de hibridación del DNA genómico *D. melanogaster*, con secuencias heterólogas, reveló que las sondas de HK A, B y D detectan señales de hibridación intensas con un fragmento *EcoRI* de 3,5 kb que podría corresponder a una misma secuencia altamente conservada.
3. Las sondas de hexoquinasas PI y PII de *S. cerevisiae* muestran señales de hibridación más débiles en *Drosophila*, representadas por un fragmento *EcoRI* de aproximadamente 2,1 kb que podría corresponder a una secuencia conservada entre ambas especies.
4. La amplia región de DNA, reconocida por la sonda para hexoquinasa B de rata en *Drosophila* (6,5 a 18 kb), podría contener los dos genes de hexoquinasa A y B estrechamente ligados, aún si tuvieran una estructura intrón-exón relativamente compleja.

5. El marco de lectura "e" podría corresponder a la hebra codificante en el DNA genómico de *Drosophila*. Esta secuencia tendría un gran intrón central, un exón izquierdo de 42 o más aminoácidos y un exón derecho de 87 o más aminoácidos. No se descarta la posibilidad de que la secuencia clonada corresponda a una secuencia intrónica.

6. El análisis de hibridación de siete clones YAC con la sonda de 0,67 kb de *Drosophila*, permiten acotar la ubicación citológica de los genes Hex A-B a la región 8C13 ; D8 en el clon DYE01-42 (YAC II) de 325 kb.

APENDICE N° 1

Medios de Cultivo :

a) Medio LB (Luria Bertani) :

Triptona	1,0 %
Extracto de levadura	0,5 %
Cloruro de sodio	0,5 %
Agar	2,0 %

b) Medio YM :

Extracto de levadura	0,3 %
Glucosa	1,0 %
Peptona	0,5 %
Extracto de malta	0,3 %
Agar	2,0 %

c) Medio YEPD :

Extracto de levadura	1,0 %
Peptona	2,0 %
Dextrosa	2,0 %
Agar	2,0 %

d) Medio YCD (pH 5,8) :

Glucosa	2,0 %
Base nitrogenada de levadura sin aminoácido	0,67 %
Hidrolizado ácido de caseína	1,0 %
Nutrientes, excepto uracilo y triptófano :	
lisina	50 µg/ml
histidina	20 µg/ml
arginina	40 µg/ml
isoleucina	60 µg/ml
leucina	60 µg/ml
metionina	20 µg/ml
fenilalanina	50 µg/ml
treonina	200 µg/ml
tirosina	50 µg/ml
adenina	20 µg/ml

e) Medio Agar-sémola *Drosophila* :

Sémola	6 %
Glucosa	4 %
Levadura seca	1 %
Agar	1,2 %
Tegosept (12,5 % en etanol)	1,2 %

f) Medio ϕ :

Triptona	2,0 %
Extracto de levadura	0,5 %
Cloruro de potasio	10 mM
Sulfato de magnesio	0,4 %

El medio debe ser llevado a pH 7,6 con hidróxido de potasio 1M.

APÉNDICE N° 2.

SOLUCIONES :

1.- Extracción de DNA :

a) Tampón de homogeneización A :

Trizma base (pH 7,5)	10 mM
NaCl	60 mM
EDTA	10 mM
Espermina	0,15 mM
Espermidina	0,15 mM
Sacarosa	5 %

b) Tampón de homogeneización B :

Trizma base (pH 7,5)	100 mM
Sacarosa	200 mM
EDTA	50 mM
SDS	0,5 %

c) Tampón de lavado (GeneClean II) :

Trizma base (pH 7,5)	10 mM
NaCl	50 mM
EDTA	2,5 mM
Etanol	50%

2.- **Transformación de *E. coli*** :a) TfβI :

Cloruro de rubidio	100 mM
Cloruro de manganeso tetrahidratado	50 mM
Acetato de potasio	30 mM
Cloruro de calcio	10 mM
Glicerol	15 %

b) TfβII :

MOPS pH 7,0	10 mM
Cloruro de rubidio	10 mM
Cloruro de calcio	75 mM
Glicerol	15 %

3.- **Electroforesis de proteínas y DNA** :a) Tampón Tricina :

Anodo.	
Tris (pH 8,9)	200 mM
Catodo.	
Tris (pH 8,25)	100 mM
Tricina	100 mM
SDS	0,1 %

b) Tampón Barbital :

Barbital	30 mM
EDTA	4 mM
Sulfato de magnesio	5 mM
Glucosa	50 mM
Ditiotreitol (DTT)	5 mM

c) Tampón de transferencia :

Tris (pH 7,8)	50 mM
Glicina	380 mM
SDS	0,1 %
Metanol	20 %

4.- **Transferencia de proteínas.**a) Tampón de bloqueo Blotto-tween :

Leche en polvo (no grasa)	5 %
Azida de sodio	0,02 %
Tween-20	0,2%
Se prepara diluida en TBS.	

5.- **Hibridación DNA :DNA (método radioactivo y Biotina)**a) Tampón citrato de sodio (SSC) 20X pH 7,0 :

NaCl	3 M
Citrato de sodio	0,3 M

b) Reactivo de Denhardt's :

Ficoll	1 %
Polivinilpirrolidona	1 %
BSA (fracción V)	1 %

c) Solución de pre-hibridación : (método radiactivo y Biotina)

Formamida	50 %	50 %
SSC	6 X	5 X
Denhardt's	5 X	5 X
SDS	0,5 %	-----
DNA de esperma de salmón	100 µg/ml	0,5 mg/ml
Fosfato de sodio (pH 6,5)	-----	25 mM

d) Solución de hibridación :

Formamida	50 %	45 %
SSC	5 X	5 X
Denhardt's	5 X	1 X
SDS	0,1 %	-----
DNA de esperma de salmón	100 µg/ml	0,2 mg/ml
Fosfato de sodio	-----	20 mM

6.- **Manipulación de clones YAC.**a) Tampón LET :

Trizma base (pH 7,5)	10 mM
EDTA	500 mM
β-Mercaptoetanol	7,5 %

b) Tampón NDS :

Trizma base (pH 7,5)	10 mM
EDTA	500 mM
Lauril-sarcosina	1 %
Proteínasa K	2 mg/ml

APÉNDICE Nº 3.

Tamaño y peso molecular de los fragmentos obtenidos al tratar el DNA del bacteriófago lambda con la endonucleasa de restricción *Hind*III:

Nº de fragmento	Tamaño molecular (kb)	Peso molecular (Megadalton)
1	23.130	15.00
2	9.419	6.12
3	6.557	4.26
4	4.371	2.84
5	2.322	1.51
6	2.028	1.32
7	0.564	0.37
8	0.125	0.08

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, V., Griffin, L. D., Gelb, B. D. y McCabe, E. R. B. (1991) Protein kinase activity of rat brain hexokinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177 : 1101-1106.
- Ajioka, J. W., Smoller, D. A., Jones, R. W., Carulli, J. P., Vellek, A. E. C., Garza, D., Link, A. J., Duncan, I. W. Y Hartl, D. L. (1991) *Drosophila* genome project : One-hit coverage in yeast artificial chromosomes. *Chromosoma* 100 : 495-509.
- Arora, K. K., Filburn, C. R. y Pedersen, P. L. (1991) Glucose phosphorylation. Site-directed mutations which impair the catalytic function of hexokinase. *J. Biol. Chem.* 266 : 5359-5362.
- Arora, K. K., Filburn, C. R. y Pedersen, P. L. (1992) Structure/function relationships in hexokinase. *FASEB J.* 6 : A62.
- Arora, K. K., Filburn, C. R. y Pedersen, P. L. (1993) Structure/functions relationships in hexokinase. Site-directed mutational analyses and characterization of overexpressed fragments implicate different functions for the N-and C-terminal halves of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 268 : 18259-18266.
- Baijal, M. y Wilson, J. E. (1992) Functional consequences of mutation of highly conserved serine residues, found at equivalent positions in the N-and C-terminal domains of mammalian hexokinases *Arch. Biochem. Biophys.* 298 : 271-278.
- Baumann, J. L. y Bischoff, W. L. (1976) Developmental studies on the hexokinases of *D. melanogaster*. *Genetics* 83 : S4
- Beckenbach, A. T. y Prakash, S. (1977) Examination of allelic variation at the hexokinase loci of *Drosophila pseudoobscura* and *Drosophila persimilis* by different methods. *Genetics* 87 : 743-761.
- Birnboim, H. y Doly, J. (1979) A rapid alkaline procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic. Acids. Res.* 3 : 2303-2308.
- Bork, P. Sander, C. y Valencia A. (1993) Convergent evolution of similar enzymatic function on different protein folds: The hexokinase, ribokinase, and galactokinase families of sugar kinases. *Protein Science* 2 :31-40.

- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248-254.
- Breathnach, R y Chambon, P. (1981) Organization and expression of eukaryotic split genes coding for protein. *Annu. Rev. Biochem* 50 : 349-383.
- Brewer, G. J. y Sing, C. F. (1979) "An introduction to isozyme techniques". Cap. 1, pags : 1-15 ; Cap. 6, pags : 138-153. Academic Press. N. Y. and London.
- Brcic, D. (1957) Las especies chilenas de *Drosophilidae*. Colección de monografías Biológicas. Universidad de Chile. Santiago.
- Broach, J., Pringle, J. y Jones, E. (1991) Part C. Table II : List of mapped genes. En : The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*. Vol 1. Eds C. S. H. L. Press.
- Cai, H., Kiefel, P., Yee, J. y Duncan, I. W. (1994) A yeast artificial chromosome clone map of the *Drosophila* genome. *Genetics* 136 : 1385-1401.
- Chou, A. C. y Wilson, J. E. (1972) Purification and properties of rat brain hexokinase. *Arch. Biochem. Biophys.* 151 : 48-55.
- Clarke, L. y Carbon, J. (1976) A colony bank containing synthetic ColE1 hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell* 9 : 91-99.
- Colowick, S. P. (1973) The hexokinases. In : Boyer P. D. (ed) *The enzymes*, vol 9. Academic, New York, pags : 1-48.
- Devereux, J., Haerberli, P. y Smithies, O. (1992) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acid Res.* 12 : 387-395.
- Drosophila* Information Service (DIS) . (1985). 62: 157-158
- Doane, W. W., Gemmill, R. M., Schwartz, P. E., Hawley, S. A. y Norman, R. A. (1987) Structural organization of the alpha.amylase gene locus in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila miranda*. En : *Curr. Top. Biol. Med. Res.* Vol 14, págs 229-266.
- Feinberg, A. P. y Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132 : 6-13.
- Fothergill-Gilmore, L. A. y Michels, P. A. M. (1993) Evolution of glycolysis. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 59: 105- 235.

- Fröhlich, K-V., Entian, K-D. y Mecke D. (1985) The primary structure of the yeast hexokinase PII gene (HXK2) which is responsible for glucose repression. *Gene* **36** :105-111.
- Gemmill, R. M., Levy, J. N. y Doane, W. W. (1985) Molecular cloning of α -amylase genes from *Drosophila melanogaster*. I. Clone isolation by use of a mouse probe. *Genetics* **110** : 299-312.
- González- Duarte, R., Juan, E., Vilageliu, L. y Atrian, S. (1986) El sistema alcohol deshidrogenasa. *Investigación y Ciencia* **118** : 56-69.
- Griffin, L. D., Gelb, B. D., Wheeler, D. A., Davison, D., Adams, V. y McCabe, E. R. B. (1991) Mammalian hexokinase 1 : evolutionary conservation and structure to function analysis. *Genomics* **11** :1014-1024.
- Grossmann, S. H. y Potter, V. R. (1974) Identification of rat hepatic glucokinase after polyacrylamide disc electrophoresis. *Anal. Biochem.* **59** : 54-62.
- Haini, C., Kiefel, P., Yee, J. y Duncan, I. (1994) A yeast Artificial chromosome clone map of the *Drosophila* genome. *Genetics* **136** : 1385-1401.
- Harlow, E. y Lane, D. (1988) "Antibodies". A laboratory manual. Cap. 11, págs : 474-506. C. S. H. L. Press.
- Hartl, D. L., Ajioka, J. W., Cai, H., Lohe, A. R., Lozovskaya, E. R., Smoller, D. A. y Duncan I. W. (1992) Towards a *Drosophila* genome map. *TIG* **8** : 70-75.
- Hayzer, D. J. e Iynedjian, P. B. (1990) Alternative splicing of glucokinase mRNA in rat liver. *Biochem. J.* **270** : 261- 263.
- Herrero, P. Fernández, R y Moreno F. (1989) The hexokinase isoenzyme PII of *Saccharomyces cerevisiae* is a protein kinase. *J. Gen. Microbiol.* **135** : 1209-1216.
- Hoelzel, A. R. y Green, A. (1992) Analysis of population-level variation by sequencing PCR amplified DNA. En : *Molecular genetics analysis of populations. A practical approach.* Cap. 6, págs 159-186. Eds. D. Rickwood y B. D. Hames. IRL Press
- Holroyde, M. J. y Trayer, I. P. (1976 a) Purification and properties of rat skeletal muscle hexokinase. *FEBS Letter* **62** : 215-219.
- Holroyde, M. J., Allen, M. B., Storer, A. C., Warsy, A. S., Chesher, J. M. E., Trayer, I. P., Cornish-Bowden, A. y Walker, D. G. (1976 b) The purification in high yields and characterization of rat hepatic glucokinase. *Biochem. J.* **153** : 363-373.

Hurley, J. H. (1996) The sugar kinase/heat shock protein 70/actin superfamily: implications of conserved structure for mechanism. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 25 : 137-162.

Iynedjian, P. B., Ucla, C y Mach, B. (1987) Molecular cloning of glucokinase cDNA. *J. Biol. Chem* 262 : 6032-6038.

Jeffs, P. S., Holmes, E. C. y Ashburner, M. (1994) The molecular evolution of the alcohol dehydrogenase and alcohol dehydrogenase-related genes in the *Drosophila melanogaster* species subgroup. *Mol. Biol. Evol.* 11 : 287-304.

Jelnes, J. E. (1971) Identification of hexokinases and localization of a fructokinase and tetrazolium oxidase locus in *Drosophila melanogaster*. *Hereditas* 67 : 291-293.

Kafatos, F. C., Louis, C., Savakis, Ch., Glover, D. M., Ashburner, M., Link, A. J., Sidén-Kiamos, I. y Saunders R. D. C. (1991) Integrated maps of the *Drosophila* genome : progress and prospects. *TIG* 7 : 155-160.

Katzen, H. M., Soderman, D. D. y Nitowsky, H. M. (1965) Kinetic and electrophoretic evidence for multiple forms of glucose-ATP phosphotransferase activity from human cell cultures and rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 19 : 377-382.

Knutsen, C., Sing, C. y Brewer, G. J. (1969) Hexokinase isozyme variability in *Drosophila robusta*. *Biochemical Genetics* 3 : 475-483.

Kogure, K., Shinohara, Y. y Terada, H. (1993) Evolution of the type II hexokinase gene duplication and fusion of the glucokinase gene with conservation of its organization. *J. Biol. Chem.* 268 : 8422-8424.

Kriegel, T. M., Rush, J., Vojtek, A. N., Clifton, D. y Fraenkel, D. G. (1994) In vivo phosphorylation site of hexokinase 2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 33 : 148-152.

Kusakabe, S., Baba, H., Koga, A., Bewley, G. C. y Mukai, T. (1990) Gene duplication and concerted evolution of the GPDH locus in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 242 : 157-162.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680-685.

Latner, A. L. y Skiller, A. W. (1968) "Isozymes in Biology and Medicine". Cap. 1 pags 1-3. Academic Press N. Y. and London.

Lawrence, G. M., Walker, D. G. y Trayer, I. P. (1983) Antigenic cross-reactivities between mammalian hexokinases. *Biochim. Biophys. Acta.* 743 : 219-225.

Lawrence, G. M. y Trayer, I. P. (1984) Hexokinase isozymes : antigenic cross-reactivities and amino acid compositional relatedness. *Comp. Biochem. Physiol.* 79B : 233-238.

Lee, C. Y. (1982) Hexokinases from *Drosophila melanogaster*. En: *Methods in Enzymology* Vol. 90 Parte E, págs 16-21.

Lehto, M., Huang, X., Davis, E. M., et al. (1995) Human hexokinase II gene: exon-intron organization, mutation screening in NIDDM, and its relationship to muscle hexokinase activity. *Diabetología* 38:1466-1474.

Levy, J. N., Gemmill, R. M. y Doane, W. W. (1985) Molecular cloning of α -amylase genes from *Drosophila melanogaster*. II. Clone organization and verification. *Genetics* 110 : 313-324.

Lewin, B. (1997) *Genes* VI Ed. Oxford University Press. Cap 22. Págs 663-686.

Li, J., Chen, Z., Ling, L., Byrnes, M. y Chang, S. (1990) Sequence diversity in the 5' untranslated region of rabbit muscle phosphofructokinase mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 170 : 1056-1060.

Madhavan, K., Fox, D. J. y Ursprung, H. (1972) Developmental genetics of hexokinase isozymes in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect. Physiol.* 18 : 1523-1530.

Magnuson, M. A., Andreone, T. L., Printz, R. L., Koch, S. y Granner, D. K. (1989) Rat glucokinase gene : structure and regulation by insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 : 4838-4842.

Malkki, M., Laakso, M. y Deeb S. (1994) Structure of the human hexokinase II gene. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 205 :490-496.

Markert, C.L. y Moller, F. (1959) Multiple forms of enzymes : tissue, ontogenetic and species specific patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 45 : 753-763.

Master, C. J. y Holmes R. S. (1975) "Haemoglobin, isozymes and tissue differentiation". Cap. 3, págs : 61-66. Eds. NHC.

Meglason, M. D., Burch, P. T., Berner, D. K., Najafi, H., Vogin, A. P. y Matchinsky, F. M. (1983) Chromatographic resolution and kinetic characterization of glucokinase from islets of Langerhans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 : 85-89.

- Merriam, J., Ashburner, M., Hartl, D. L. y Kafatos, F. C. (1991) Toward cloning and mapping the genome of *Drosophila*. *Science* 254 : 221-225.
- Moser, D., Johnson, L. y Lee, Ch. (1980) Multiple forms of *Drosophila* hexokinase. Purification, biochemical and immunological characterization. *J. Biol. Chem.* 255 : 4673-4679.
- Mukai, T. y Voelker R. A. (1977) The genetic structure of natural populations of *D. melanogaster* XIII. Further studies on linkage disequilibrium. *Genetics* 86 : 157-158.
- Murray, R. F. y Ball, J. A. (1967) Testis specific and sex-associated hexokinases in *Drosophila melanogaster*. *Science* 156 : 81-82.
- Okazaki, H., Takebayashi, Y., Ando, M., Date, S., Tokuda, H. y Ishibashi, S. (1992) Cleavage of hexokinase II to two domains by trypsin without significant change in catalytic activity. *Mol. Cell Biochem.* 117 : 87-92.
- Payant, V., Abukasshawa, S., Sasseville, M., Benkel, B. F., Hickey, D. A. y David, J. (1988) Evolutionary conservation of the chromosomal configuration and regulation of amylase genes among eight species of the *Drosophila melanogaster* species subgroup. *Mol. Biol. Evol.* 5 : 560-567.
- Philippsen, P., Stotz, A. y Scherf, C. (1991) DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. En : *Methods in enzymology*, Vol. 194, Cap 11, págs 169-182.
- Polakis, P. G. y Wilson, J. E. (1984) Proteolytic dissection of rat brain hexokinase. Determination of the cleavage pattern during limited digestion with trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 234 : 341-352.
- Prakash, S. (1977 a) Further studies on gene polymorphism in the mainbody and geographically isolated population of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 85 : 713-719.
- Prakash, S. (1977 b) Genetic divergence in closely related sibling species *Drosophila pseudoobscura*, *Drosophila persimilis* and *Drosophila miranda*. *Evolution* 31 : 14-23.
- Preller, A. (1988) Función de las isoenzimas de hexoquinasas en la utilización de glucosa en oocitos de anfibio. Tesis de Doctorado en Ciencias. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.
- Printz, R. L., Koch, S., Potter, L. R., O'Doherty, R. M., Tiesinga, J. J., Moritz, S. y Granner D. K. (1993) Hexokinase II mRNA and gene structure, regulation by insulin, and evolution. *J. Biol. Chem.* 268 : 5209-5219.

Printz, R. L., Ardehali, H., Koch, S. y Granner, D. K. (1995) Human hexokinase II mRNA and gene structure. *Diabetes* 14 : 290-294.

Qadri, S. S. y Easterby, J. S. (1980) Purification of skeletal muscle hexokinase by affinity elution chromatography. *Anal. Biochem.* 105 : 299-303.

Radojković, J., Slebe, J. C. y Ureta, T. (1978) A radioassay for the hexokinase reaction. *Arch. Biol. Med. Exp.* 11 : 73-76.

Rattazzi, M. C. , Scandalios, J. G. y White, G. S. (1983) "Isozymes". *Curr. Top. Biol. Med. Res.* Vol 7, págs : 1-17, 175-219. Eds, A. R. Liss Inc. N. Y.

Reed, D. S. y Gibson, J. B. (1993) Defective P element insertions affect the expression of sn-glycero-3-phosphate dehydrogenase alleles in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 251 : 39-45.

Richardson, B. J., Baverstock, P. R. y Adams, M. (1986) "Allozyme Electrophoresis". Cap. 2 págs : 15-30. Academic Press, Inc, N. Y.

Rigby, P. W., Dieckmann, M., Rhodes, C. y Berg, P. (1977) Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 113 : 237-251.

Rychlik, W., Spencer, W. J. y Rhoads, R. E. (1990) Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*. *Nucleic Acids Res.* 18 : 6409-6412.

Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 : 5463-5468.

Sambrook, J., Fritsch, E. y Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning : A laboratory manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory.

Schaffer, H. y Sederoff, R. (1981) "Least squares fit of DNA fragment length to gel mobility." *Anal. Biochem.* 115 : 113-122.

Schägger, H. y Jagow, G. V. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of protein in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166 : 368-379.

Schwab, D. A. y Wilson, J. E. (1988) The complete amino acid sequence of the catalytic domain of rat brain hexokinase, deduced from the cloned cDNA. *J. Biol. Chem.* 263 : 3220-3224.

Schwab, D. A. y Wilson, J. E. (1989) Complete amino acid sequence of rat brain hexokinase, deduced from the cloned cDNA, and proposed structure of a mammalian hexokinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86 : 2563-2567.

Schwab, D. A. y Wilson, J. E. (1991) Complete amino acid sequence of the type III isozyme of rat hexokinase deduced from the cloned cDNA. *Arch. Biochem. Biophys.* 285 : 365-370.

Schwartz, D. C. y Cantor, C. R. (1984) Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37 : 67-75.

Slein, M. W., Cori, G. T. y Cori, C. F. (1950) A comparative study of hexokinase from yeast and animal tissues. *J. Biol. Chem* 186 : 763-780.

Southern, E. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98 : 503-517.

Sullivan, D. T., Carroll, W. T., Kanik-Ennulat, C. L., Hitti, Y. S., Lovett, J. A. y Von Kalm, L. (1985) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Drosophila*. *J. Biol. Chem.* 260 : 4345-4350.

Sullivan, D. T., Starmer, W. T., Curtiss, S. W., Menotti-Raymond, M. y Yum, J. (1994) Unusual molecular evolution of an *Adh* pseudogene in *Drosophila*. *Mol. Biol. Evol.* 11 : 443-458.

Tabachnick, W. J. y Howard, D. J. (1982) Genetic control of hexokinase variation in insects. *Biochem. Genet.* 20 : 47-57.

Takano, T. S., Kusakabe, S. y Mukai, T. (1993) DNA polymorphisms and the origin of protein polymorphism at the *Gpdh* locus of *Drosophila melanogaster*. En : *Mechanisms of the molecular evolution*. Págs 179-190. Japan Scientific societies Press. Sinauer associates, INC.

Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 : 4350-4354.

Ultermohlen, J. (1994) RbCl transformation procedure for improved efficiency. *The NEB Transcript.* 6 : 7.

Ureta, T. (1975) Phylogeny, ontogeny and properties of the hexokinases from vertebrates. *Isozymes III. Developmental Biology*. Págs : 575-601. Academic Press, Inc, N. Y.

Ureta, T. (1976) The allosteric regulation of hexokinase C from amphibian liver. *J. Biol. Chem.* 251 : 5035-5042.

Ureta, T. (1978) The role of isozymes in metabolism : A model of metabolic pathways as the basis for the biological role of isozymes. *Curr. Top. Cell Reg.* 13 : 233-258.

Ureta, T., Radojković, J., Lagos, R., Guixé, V. y Núñez L. (1979 a) Estudios filogenéticos y ontogenéticos de las isoenzimas fosforilantes de glucosa en vertebrados. *Arch. Biol. Med. Exp.* 12 : 587-604.

Ureta, T., Radojković, J., Preller, A. y Guixé, V. (1979 b) Glucose utilization in vertebrates as a molecular probe for the study of evolution. *Arch. Biol. Med. Exp.* 12 : 49-58.

Ureta, T. (1982) The comparative isozymology of vertebrate hexokinases. *Com. Biochem. Physiol.* 71B : 549-555.

Ureta, T. (1985) Organización del metabolismo : La localización subcelular de enzimas glicolíticas. *Arch. Biol. Med. Exp.* 18 : 9-32.

Ureta, T., Smith, A. D. y Wilson J. E. (1986) Hexokinase A from mammalian brain : comparative peptide mapping and immunological studies with monoclonal antibodies. *Arch. Biochem. Biophys.* 246 : 419-427.

Ureta, T. y Radojković, J. (1987 a) Organization of glucose metabolism : A model of compartments by poly-isozymic complexes. En : *The organization of cell metabolism*. Págs : 131-142. Eds. G. Rickey Welch and James S. Cleggs. Plenum Publishing Corporation.

Ureta, T., Medina, C., y Preller, A. (1987 b) The evolution of hexokinases. *Arch. Biol. Med. Exp.* 20 : 343-357.

van Zeeland, A. A., Vrieling, H., Simons, J. W. I. M. y Lohman, P. H. M. (1989) Sequence determination of point mutations at the *HPRT* locus in mammalian cells following *in vitro* amplification of *HPRT* cDNA prepared from total cellular RNA. En : *Polymerase chain reaction*. *Curr. Commun. Mol. Biol.* C. S. H. L. Press.

Voelker, R. A., Langley, C. H., Leigh-Brown, A. J. y Ohnishi, S. (1978) New data on allozyme loci in *D. melanogaster*. *DIS* 53 : 200.

White, T. K. y Wilson, J. E. (1987) Rat brain hexokinase : localization of the allosteric regulatory site in a structural domain at the N-terminal of the enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* 259 : 402-411.

White, T. K. Y Wilson, J. E. (1989) Isolation and characterization of the discrete N-and C-terminal halves of rat brain hexokinase. Retention of full catalytic activity in the isolated C-terminal half. *Arch. Biochem. Biophys.* 274 : 375-393.

Wilson, J. E. (1985) Regulation of mammalian hexokinase activity. En : *Regulation of carbohydrate metabolism*. Vol I. Cap. 3 págs : 45-85. CRC Press Inc.

Wilson, J. E. y Smith, A. D. (1985) Monoclonal antibodies against rat brain hexokinase. Utilization in epitope mapping studies and establishment of structure-function relationships. *J. Biol. Chem.* 260 : 12838-12843.

Wilson, J. E. (1995) Hexokinases. En : *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 126 : 65-198.