

Determinación lipídica de mutantes de la vía del péptido análogo a insulina en *Drosophila melanogaster*

Zepeda Gurrola Reyna Cristina¹ y Juan Rafael Riesgo-Escovar²

¹Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, diemachtinmir@yahoo.com.

²Instituto de Neurobiología, Campus UNAM, Juriquilla Querétaro. Laboratorio de "Genética de Transducción de señales". Tel/Fax: (442) 2-38-1063. riesgo@inb.unam.mx

RESUMEN

Actualmente se conoce la mayor parte de la vía del péptido análogo a insulina en *Drosophila melanogaster*, pero aún se desconoce a partir del paso en el que se parte hacia el metabolismo de lípidos. Por tal motivo, en este trabajo, se realizaron determinaciones lipídicas en moscas silvestres así como en mutantes homocigotas y heterocigotas, para CHICO, dRheb, dInR, Dp110, dPKB y dS6K. Se obtuvo que los organismos homocigotos presentaron una mayor cantidad de lípidos en comparación con los heterocigotos y silvestres, con excepción de los organismos mutantes homocigotos para dS6K, donde la cantidad de lípidos totales fue menor que la de sus heterocigotos correspondientes. Así mismo, se observó que, a excepción de las mutantes homocigotas para dRheb, el incremento en la cantidad de lípidos totales en moscas homocigotas mutantes, fue mayor entre más cercana al inicio de la vía del péptido análogo a insulina, actúe la proteína cuyo gen está mutado.

Palabras clave: *Drosophila melanogaster*; mutantes, péptido análogo a insulina, CHICO, dS6K.

ABSTRAC

At present, the peptide analog of insulin pathway in *Drosophila melanogaster* is understanding in the main, but the step to lipid metabolism in this pathway is unknown. For this reason, in this article, the lipid determination was carried out in wild flies and CHICO, dRheb, dInR, Dp110, dPKB and dS6K homozygous and heterozygous mutant flies. The results shown that homozygous flies had more lipids than heterozygous and wild flies; except dS6K homozygous mutant flies, whom lipids were fewer than dS6K heterozygous flies. Furthermore, the lipids increase was more in homozygous flies who was a mutation in a gene whom protein participates at the beginning of the peptide analog of insulin pathway; this result did not occur in dRheb heterozygous flies.

Key words: *Drosophila melanogaster*; mutants, peptide analog of insulin, CHICO, dS6K.

INTRODUCCIÓN

Drosophila melanogaster es un buen modelo para estudiar la vía de la insulina debido a su alta homología con el ser humano, además de poseer un ciclo de vida corto y un alto índice reproductivo. En dicho díptero se ha caracterizado a la proteína CHICO (Bohni *et al.*, 1999), que inter-

viene en la vía del péptido análogo a insulina, y es homóloga a la proteína llamada sustrato de receptor de insulina de vertebrados; la función de CHICO es el control de la talla celular y corporal y el número celular; de modo que, al mutar el gen que codifica para esta proteína resulta en una reducción del 40% del tamaño corporal de la mosca con respecto a las moscas silvestres, así

TABLA 1. Genes codificantes para proteínas homólogas de la vía de la insulina, en vertebrados y en *Drosophila melanogaster*.

Genes codificantes para proteínas de la vía de la insulina en vertebrados	Genes codificantes para proteínas de la vía del péptido análogo a insulina en <i>Drosophila melanogaster</i>
InR	dInR
IRS	CHICO
PI3K	Dp110
S6K	dS6K
PKB	dPKB
Rheb	dRheb

como en una duplicación en la cantidad de lípidos de la misma.

La vía de la insulina está en función de una cascada fosforilativa. En vertebrados por ejemplo, la insulina se une a su receptor (InR) en la membrana celular, cambiando la conformación del mismo y permitiendo su autofosforilación en los residuos de tirosina, y por tanto la unión de la proteína llamada sustrato del receptor de insulina (IRS), a la que se une la cinasa lipídica 3 (PI3K) mediante su subunidad regulatoria p85; dicha cinasa lipídica fosforila al fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato a fosfatidil inositol 3,4,5-trifosfato; este último se une a la cinasa de fosfoinosítidos 1 (PDK1), la cual a su vez, fosforila a la cinasa ribosomal 6 ó S6K (que interviene en la traducción del ARN mensajero; se cree que esta proteína es activada también mediante la proteína G tipo ras, así como por aminoácidos hidroxilados, según Montagne *et al*, 1999) y a la cinasa B (PKB); esta última fosforila e inactiva a la cinasa 3-glicógeno sintasa (GSK3). La inactivación de GSK3, permite la síntesis de proteínas, ya que al estar inactiva no puede fosforilar e inactivar al factor traduccional rico en guaninas eIF2. La autofosforilación del receptor de insulina, permite la fosforilación de un complejo de proteínas adaptadoras llamado Cap, que intervienen en la activación del transportador de glucosa Glut4, indispensable para proporcionar glucosa al proceso de síntesis de glucógeno. Este proceso de la vía de insulina en vertebrados es similar al que ocurre en *Drosophila melanogaster*,

salvo que en este díptero no existe insulina como tal, sino 7 péptidos análogos a la hormona, que activan a su receptor, desencadenando la cascada fosforilativa por proteínas homólogas a las de los vertebrados. Los genes codificantes para estas proteínas homólogas a las de vertebrados, en el insecto, se muestran en la TABLA 1, (donde la “d” añadida refiere a la especie *Drosophila melanogaster*).

Respecto al tamaño corporal en *D. melanogaster*, la regulación del mismo depende de la activación de las proteínas CHICO (Bohni *et al*, 1999), Dp110 (Leevers, 1996), dS6K (Montagne, 1999) y dRheb (Saucedo, 2003). Mientras que dPKB está involucrada en la regulación de la síntesis proteica (Miron, 1999).

Sin embargo, en la vía de la insulina y en la del péptido análogo a esta hormona, se desconoce a partir del paso en el que se parte hacia metabolismo de lípidos.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Obtención de mutantes.

Las cepas mutantes fueron donadas por la Universidad de Zurich, Suiza, y se obtuvieron mediante inserciones o deleciones de elementos P en el genoma (estos elementos, son transposones que cambian de posición secuencias de ácido desoxirribonucleico). Los genes mutados se muestran en la TABLA 2.

Para obtener mutantes viables, se cruzaron cepas balanceadas en alelos de cada gen en estu-

TABLA 2. Genes codificantes para proteínas participantes en la vía del péptido análogo a insulina de *Drosophila melanogaster*, mutados mediante elementos P.

GEN	ALELO	MUTACIÓN	PROTEÍNA	INFORMACIÓN
dInR	E19	En región no codificante del gen	Receptor de insulina	Disminución de la transcripción
dInR	5545	Inserción P en el primer exón	Receptor de insulina	Hipomorfo
Dp110	A	Inserción P	Cinasa de fosfoinosítidos	Disminución de la transcripción
Dp110	2H1	Inserción P	Cinasa de fosfoinosítidos	Hipomorfo
dS6K	P1713	Inserción P en región no codificante	Cinasa p70S6	Disminución de la transcripción
dS6K	L-1	Delección imprecisa en el primer exón	Cinasa p70S6	Pérdida de función
dPKB	1	En dominio con actividad cinasa	Cinasa B	Pérdida de función
dPKB	3	En dominio de unión	Cinasa B	Hipomorfo
dRheb	7 ^a 1	En región no codificante del gen	Proteína G tipo Ras	Hipomorfo
dRheb.	44.1	En región no codificante del gen	Proteína G tipo Ras	Pérdida de función
CHICO	ME31B	En región codificante del gen	CHICO	Pérdida de función
CHICO	bsk	En región codificante del gen	CHICO	Pérdida de función

dio (cepas donde ambos progenitores poseen sólo una mutación en el gen codificante para una de las proteínas de la vía del péptido análogo a insulina, en uno de los dos cromosomas homólogos), obteniendo moscas homocigotas mutantes (heteroalélicas) y heterocigotas. La excepción a la obtención de mutantes descrita anteriormente fueron las cepas mutantes para CHICO, ya que los homocigotos de un único alelo son viables. Las cruzas realizadas fueron: dInR(E19) x dInR(5545); Dp110(2H1) x Dp110(A); dS6K(P1713) x dS6K(L-1); dPKB(1) x dPKB(3) y dRheb(7A1) x dRheb(44.1). Realizando estas cruzas se seleccionaron moscas hipomorfas heteroalélicas viables.

Determinación lipídica.

Se realizaron determinaciones lipídicas a 30 moscas mutantes homocigotas y 30 heterocigotas (5 moscas por cepa mutante; donde cada una de estas cepas, era mutante para uno de los 6 genes implicados en la vía del péptido análogo a insulina), con un total de tres repeticiones. Así mismo se determinaron los lípidos totales de 15

moscas silvestres como control positivo. Como control negativo se utilizaron las homocigotas mutantes para CHICO, pues se ha descrito (Bohni *et al.*, 1999) que dichas mutantes incrementan al doble sus niveles lipídicos en comparación con las moscas silvestres. La determinación de lípidos totales se llevó a cabo según el método de Van Andel (1985), bajo el siguiente procedimiento: Moscas de 6 días de nacidas se congelaron a -72 grados centígrados por 24 horas, a fin de detener su metabolismo y de preservar en buen estado los tejidos. Posteriormente se obtuvo el peso de los dípteros y se procedió al secado de los mismos en el horno, a 100 grados centígrados, durante una hora para evitar que el agua corporal interfiriera en el análisis lipídico. Se realizó un homogenizado con las moscas en viales, agregando 500 microlitros de una mezcla de metanol:cloroformo (1:1), para disolver los lípidos del insecto. El homogenizado se decantó dentro de tubos de ensayo. Se evaporó el solvente en el termoblock a 100 grados centígrados y los tubos se dejaron enfriar aproximadamente por 10 minutos. Se agregaron a cada tubo 2.3 ml

de reactivo de vainillina como indicador (dicho reactivo contiene 600 mg de vainillina en 400 ml de ácido fosfórico al 85%). Los tubos se agitaron para que se mezclara el reactivo de vainillina, hasta observar un color rosado y se dejaron reposar durante 5 minutos. Posteriormente se determinó la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 525 nanómetros. El aparato se calibró previamente con agua destilada a 0% de absorbancia. Después se realizó un análisis de regresión lineal a partir de la curva patrón (explicada más adelante), para obtener los microgramos de lípidos mediante extrapolación de datos; para tal fin, se colocó la absorbancia registrada en el eje de las ordenadas y los microgramos de lípidos en el eje de las abscisas. Una vez obtenidos los microgramos de lípidos, se dividieron entre el peso fresco obtenido anteriormente, resultando así microgramos de lípidos por miligramos de peso fresco de la mosca (lípidos totales).

Elaboración de la curva patrón.

Para la elaboración de una curva patrón se colocaron en 4 tubos de ensayo 50, 100, 200 y 400 microlitros, respectivamente, de una mezcla de lípidos de soya con cloroformo (a razón de 1 mg de lípidos por ml de cloroformo). Posteriormente, se siguió el mismo procedimiento de determinación lipídica, excepto al agregar 4.8 ml de vainillina por tubo y no 2.3 ml como se describió anteriormente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Microgramos de lípidos obtenidos en base a la curva patrón.

Los resultados del promedio de las tres repeticiones, de la obtención de microgramos de lípidos para cada cepa mutante, mostraron una tendencia general al incremento de absorbancia registrada si se incrementaban también los lípi-

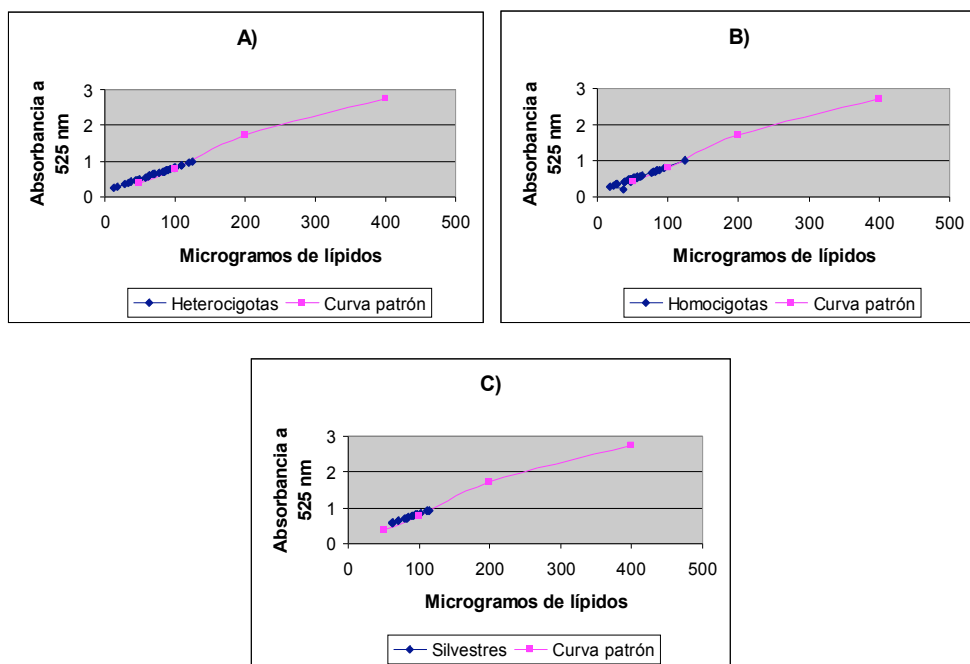


FIGURA 1. Relación Microgramos de lípidos y Absorbancia (a 525 nm) de moscas A) heterocigotas, B) homocigotas y C) Silvestres; en función de la curva patrón.

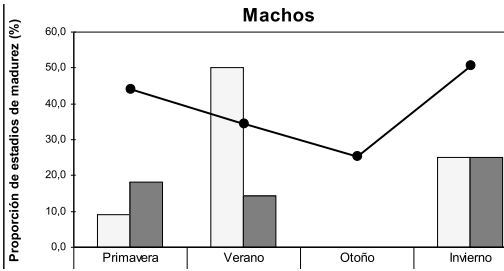


FIGURA 2. Promedios de los lípidos totales (µg de lípidos/mg de peso fresco) en cada cepa mutante, tanto en moscas heterocigotas como en homocigotas. Se muestra también el promedio de lípidos totales en las moscas silvestres.

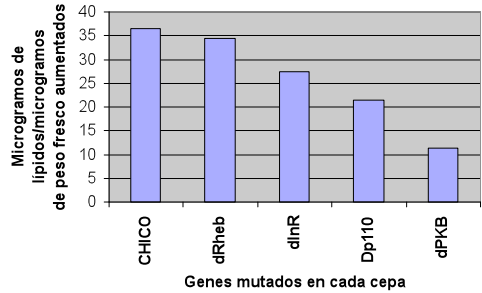


FIGURA 3. Incremento en la cantidad de lípidos totales en moscas homocigotas mutantes para CHICO, dRheb, dInR, Dp110 y dPKB.

dos; esto se refleja en el coeficiente de correlación lineal calculado a partir de la curva patrón ($r = 0.9893$), que muestra una correlación alta entre estas dos variables; estos resultados ocurrieron tanto en moscas heterocigotas, homocigotas y silvestres (FIGURA 1). Cabe mencionar que, la ecuación de regresión lineal obtenida a partir de la curva patrón para la obtención de los microgramos de lípidos fue: $0.16447 + (0.00665 * \text{absorbancia})$.

Disminución de lípidos totales en cepas homocigotas mutantes para dS6K.

Se observó una tendencia al incremento de lípidos totales (microgramos de lípidos/mg de peso fresco) en las moscas homocigotas, en comparación tanto con sus heterocigotas como con las moscas silvestres (cuyo promedio de lípidos totales fue de $69.9793 \mu\text{g}$ de lípidos/mg de peso fresco, con una desviación estándar de $+10.7498$). Sin embargo, esta tendencia no se mantuvo en las moscas homocigotas mutantes para dS6K (cuyo promedio de lípidos totales fue de $52.77 \mu\text{g}$ de lípidos/mg de peso fresco), ya que al contrario de las demás mutantes y en comparación con las silvestres y sus correspondientes heterocigotas (cuyo promedio de lípidos totales fue de $68.7173 \mu\text{g}$ de lípidos/mg de peso fresco), los lípidos totales tendieron a disminuir ($15.9430 \mu\text{g}$ de lípidos/mg de peso fresco menos que las heterocigotas). FIGURA 2. Cabe mencionar que la desviación estándar de los microgramos de lípidos totales de moscas homocigotas

fue de $+35.9041$; mientras que para moscas heterocigotas fue de $+24.6861$.

Incremento de lípidos totales en moscas homocigotas mutantes.

Como ya se mencionó anteriormente, las cepas de moscas homocigotas presentaron un promedio de lípidos totales más altos que sus correspondientes heterocigotas. En base a los anteriores resultados, se obtuvo que en orden descendente, el incremento en la cantidad de lípidos totales fue mayor en moscas homocigotas mutantes para CHICO, seguidas de homocigotas mutantes para dRheb, dInR, Dp110 y finalmente dPKB (FIGURA 3).

El hecho de que el control negativo (mutante homocigota para CHICO) presentara un mayor incremento en la cantidad de lípidos totales, se aproxima a lo obtenido por Bohni *et al*, 1999, pues el promedio de lípidos totales para moscas silvestres fue de 69.9793 y el de homocigotas mutantes para CHICO de 113.7965 (cantidad cercana al doble de lípidos en moscas silvestres).

En comparación con CHICO, dRheb, dInR y Dp110, dPKB no está involucrado directamente con el tamaño corporal, sino indirectamente mediante la regulación de la síntesis proteica (Miron, 1999). Al haber presentado las moscas homocigotas mutantes para dPKB la menor cantidad de lípidos totales incrementados, se sugiere la caracterización detallada de este gen y de la proteína para la cuál codifica, a fin de descifrar si existe o no relación entre su baja participación

en el control del tamaño corporal y la menor cantidad de lípidos totales incrementados en su correspondiente cepa homocigota mutante.

Así mismo puede notarse que, a excepción de las mutantes homocigotas para dRheb, el incremento de lípidos totales en moscas mutantes homocigotas, tiende a ser mayor entre más cercana al inicio de la vía del péptido análogo a insulina, actúe la proteína cuyo gen está mutado.

CONCLUSIONES

Las cepas de moscas homocigotas mutantes para CHICO, dRheb, Dp110, dInR y dPKB, mostraron un incremento en la cantidad de lípidos totales (μg de lípidos/mg de peso fresco) en comparación con sus correspondientes heterocigotas y silvestres. La excepción a esta tendencia la constituyeron las cepas de moscas mutantes para dS6K, cuyas cantidades totales de lípidos resultaron menores en moscas mutantes homocigotas.

Así mismo, se observó que, a excepción de las mutantes homocigotas para dRheb, el incremento de lípidos totales en moscas homocigotas mutantes, tiende a ser mayor entre más cercana al inicio de la vía del péptido análogo a insulina, actúe la proteína cuyo gen está mutado.

AGRADECIMIENTOS

Al programa Delfín por permitir estancias de verano para la formación científica de los universitarios.

REFERENCIAS

- Bohni R., Riesgo-Escovar J. R., Oldham S., Brogiolo W., Stocker H., Andruss B. F., Beckingham K. y Hafen E. 1999. Autonomous control of cell and organ size by CHICO, a *Drosophila* homolog of vertebrate IRS1-4. *Cell* 97(7): 865-875.
- Leevers S. J., Weinkove D., Mac Dougall L. K., Hafen E. y Waterfield M. D. 1996. The *Drosophila* phosphoinositide 3-kinase Dp110 promotes cell growth. *EMBO journal* 15(23): 6584-6594.
- Lizcano J. M., Alrubaie S., Kieloch A., Deak M., Leevers S. J. y Alessi D.R. 2003. Insulin-induced *Drosophila* S6 kinase activation requires phosphoinositide 3-kinase and protein kinase B. *The biochemical journal* 374(Pt 2): 297-306.
- Miron M., Lasko P. y Sonenberg N. 2003. Signaling from Akt to FRAP/TOR targets both 4E-BP and S6K in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and cellular biology* 23(24): 9117-9126.
- Montagne J., Stewart M. J., Stocker H., Hafen E., Kozma S. C. y Thomas G. 1999. *Drosophila* S6 kinase: a regulator of cell size. *Science* 285(5436): 2126-2129.
- Saucedo L. J., Gao X., Chiarelli D. A., Li L., Pan D. y Edgar B. A. 2003. Rheb promotes cell growth as a component of the insulin/TOR signalling network. *Nature cell biology* 5(6): 566-571.
- Stocker H. y Hafen E. 2000. Genetic control of cell size. *Current opinion in genetics and development* 10(5): 529-535.
- Weinkove D. y Leevers S. 2000. The genetic control of organ growth: insights from *Drosophila*. *Current opinion in genetics development* 10(1): 75-80.