

Biología

381

T.D



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA REGIÓN 54A DE
DROSOPHILA MELANOGASTER**

**MEMORIA PRESENTADA POR RUBÉN D. ARTERO ALLEPUZ
PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
POR LA UNIVERSITAT DE VALENCIA**

VALENCIA, OCTUBRE DE 1995



UMI Number: U607689

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607689

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
BIBLIOTECA CIÈNCIES

s. Biológicas

Nº Registre 8278

DATA 16.XI.95

SIGNATURA

381.T.D

Nº LIBRE 20386229

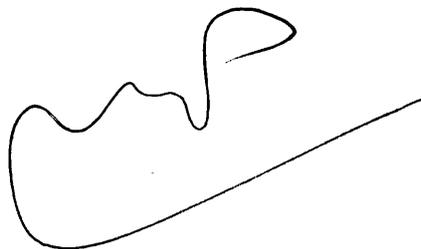
30 ans.

D. Manuel Pérez Alonso, Profesor Titular del Departament de Genètica de la Facultat de Ciències Biològiques de la Universitat de València,

CERTIFICA: Que Rubén D. Artero, Licenciado en Ciencias Biológicas en esta Universidad, ha realizado el trabajo titulado "Caracterización genética y molecular de la región 54A de *Drosophila melanogaster*" bajo su dirección, para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas y,

AUTORIZA: Su presentación en el Departament de Genètica de la Facultat de Ciències Biològiques para tal fin.

Para que conste, y en cumplimiento de la legislación vigente, firma el presente certificado en Valencia a 20 de julio de 1995



Fdo. Manuel Pérez Alonso



AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que, desde el inicio de este proyecto, han contribuido de alguna forma a su desarrollo, nunca mejor dicho. Quiero expresar aquí mi agradecimiento más sincero a todas ellas y en especial a las siguientes personas e instituciones.

A Manuel Pérez Alonso por todo lo que he aprendido bajo su atenta dirección.

A la Conselleria de Educació i Ciència de la Generalitat Valenciana por concederme una beca de formación de personal investigador con la cual he podido continuar mi formación.

A Nuria Paricio por su colaboración en algunos aspectos del proyecto, pero sobre todo, por conjugar en una sola persona una buena amiga y una excelente investigadora.

A Ibo Galindo y David Blesa por su amistad.

A Javier Terol por su colaboración en el inicio del proyecto y varios años de convivencia en el mismo banco de trabajo.

A Adela Torres y Mónica BARGUES por su participación en algunos aspectos de este trabajo.

A todos los miembros del laboratorio presentes y pasados así como a los Doctorandos y Tesinandos del Departamento.

Al profesorado del Departamento y a sus Directores anterior, José Luis Ménsua, y presente, Andrés Moya. Asimismo, a los miembros del PAS por su apoyo en algunas tareas.

A Valery Semeshin por su ayuda en la interpretación de los resultados citogenéticos.

A Alfonso Martínez Arias y los miembros del departamento de Zoología de la Universidad de Cambridge por acogerme durante tres meses. En especial a Mar Ruiz Gómez por su ayuda con los aspectos "genéticos" de este trabajo.

A Gerrit Begemann y Marek Mlodzik por la colaboración que hemos mantenido durante la realización de este trabajo.

A mis padres por su apoyo incondicional

**A IRINKA,
POR LA NUEVA VIDA
QUE HE DESCUBIERTO
A SU LADO**

***“...uno tampoco podía preveer
que la incompetencia y la soberbia
de la especie humana
se consolidara como está
consolidada hoy en día...”***

Joan Manuel Serrat

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1. Metodologías para identificar genes en <i>Drosophila</i>	10
1.1. Técnicas para el estudio de los derivados mesodérmicos	
2. El desarrollo embrionario temprano en <i>Drosophila</i>	13
2.1. Cuatro sistemas independientes controlan el plan básico del embrión	
2.1.1. Eje antero-posterior	
2.1.1.1. El centro organizador anterior	
2.1.1.2. El centro organizador posterior	
2.1.1.3. El sistema terminal	
2.1.2. El eje dorso-ventral	
2.2. Tres clases de genes de segmentación subdividen el embrión y los genes homeóticos determinan la identidad de los segmentos	
3. Formación y organización espacial del mesodermo	20
4. Especificación de los destinos celulares en el mesodermo	24
4.1. Diferenciación del mesodermo visceral	
4.2. Formación del patrón muscular en el mesodermo somático	
4.2.1. El ectodermo como fuente de información posicional en el mesodermo	
4.2.2. Especificación autónoma del patrón muscular	
4.2.3. Papel de la inervación motora	
5. Musculatura somática larvaria	31
5.1. Nomenclatura de los músculos	
5.2. Morfogénesis de los músculos larvarios	
5.3. Especificación genética de los músculos larvarios	
5.3.1. El gen <i>S59</i>	
5.3.2. El gen <i>nautilus</i>	
5.3.3. El gen <i>apterous</i>	
5.3.4. Otros genes presuntamente implicados en la especificación del patrón muscular	
5.4. Papel de los genes neurogénicos en la especificación de las células fundadoras	
6. Diferenciación terminal: reguladores de la miogénesis	43
7. Especificación genética de los destinos celulares en el ojo	46
7.1. Sinopsis de la estructura del ojo y su desarrollo	
7.2. Especificación de las células fotorreceptoras	
7.2.1. Especificación de R8	
7.2.2. Especificación de los fotorreceptores R1-R6	
7.2.3. Especificación de R7	

OBJETIVOS



MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material biológico	61
1.1. <i>Drosophila melanogaster</i>	
1.1.1. Inserciones en la región 54A: cepas originales	
1.1.2. Otras inserciones en la región 54A	
1.1.3. Revertientes espontáneos a partir de inserciones PZ	
1.1.4. Cepas empleadas en la movilización de inserciones PZ	
1.2. <i>Escherichia coli</i>	
1.2.1. K802	
1.2.2. C600H β ⁻	
1.2.3. DH5 α	
2. Vectores de clonación	64
2.1. Vectores basados en el fago lambda: λ EMBL3, λ gt10	
2.2. Vectores plasmídicos: pUC18, pUC19 y pNB40	
2.3. Lawrist4	
3. Extracción de ácidos nucleicos	65
3.1. DNA genómico total de <i>Drosophila</i>	
3.2. DNA plasmídico y cósmidos	
3.3. DNA del bacteriófago lambda	
3.4. Extracción de mRNA poli(A) ⁺	
4. Marcaje y detección de DNA	67
5. Hibridación de ácidos nucleicos	68
5.1. Hibridación en filtro	
5.1.1. Southern Blot	
5.1.2. Northern Blot	
5.2. Hibridación <i>in situ</i> en embriones de <i>Drosophila</i>	
5.3. Hibridación <i>in situ</i> en cromosomas politénicos de <i>Drosophila</i>	
6. Detección <i>in situ</i> de β-galactosidasa	73
7. Clonación de DNA en <i>E. coli</i>	74
7.1. Subclonaciones	
7.2. Rescate plasmídico	
8. Preparación de una genoteca de cDNA embrionario de 4 a 17 horas	76
9. Técnicas electroforéticas	76
9.1. Electroforesis de DNA	
9.2. Electroforesis de RNA	
9.3. Purificación de fragmentos de DNA	
10. Rastros de genotecas de DNA genómico	78
10.1. Rastros de genotecas en fago lambda	
10.2. Rastreo de genotecas en cósmido	
11. Rastreo de genotecas de cDNA	79
11.1. Genoteca embrionaria preparada en λ gt10 (4-17h)	

11.2. Genoteca embrionaria preparada en plásmido (12-24h)	
12. Mapas de restricción	80
13. Secuenciación de DNA	81
13.1. Obtención de secuencias	
13.2. Obtención de deleciones direccionales	
14. Análisis de secuencias	82
15. Análisis genético	82
15.1. Estudio de las fases de letalidad	
15.2. Obtención de revertientes	

RESULTADOS

1. Descripción del patrón de expresión de la inserción PP2	89
1.1. Detección de la actividad enzimática β -galactosidasa	
1.2. Detección inmunohistoquímica de β -galactosidasa	
2. Posición citogenética de la inserción PP2	94
3. Clonación del DNA genómico adyacente a la inserción	96
3.1. Determinación de un fragmento híbrido inserción-DNA genómico	
3.2. Rescate del plásmido Bluescript de P-lArB	
4. Extensión de la región genómica clonada	99
4.1. Aislamiento de los primeros clones genómicos: λ Dm.TE1 y λ Dm.TB1	
4.2. Aislamiento de clones genómicos a partir de un cDNA	
4.3. Rastreo de genoteca en cósmidos	
4.4. Paseo cromosómico en dirección 3' de la unidad de transcripción	
4.5. Mapas de restricción	
4.6. Identificación de regiones que contienen DNA repetitivo	
4.7. Orientación de la región clonada en el cromosoma politénico	
5. Identificación de fragmentos de restricción genómicos que pueden contener exones	109
5.1. Localización de regiones exónicas mediante hibridación <i>in situ</i> en embriones	
5.2. Determinación del tamaño de transcritos mediante Northern blot	
6. Rastreo de genotecas de cDNA	115
6.1. Clones procedentes de genoteca embrionaria de 4-17h en λ gt10	
6.1.1. Clon λ cDm.B	
6.1.2. Clon λ cDm.D	
6.2. Clones procedentes de una genoteca embrionaria de 12-24h en pNB40	
6.2.1. Clon pcDm.A2	
6.2.2. Clon pcDm.B5	
6.3. Otros clones de cDNA: dc12	

7. Patrón de expresión embrionario del gen detectado en la cepa PP2	122
8. Secuenciación de cDNAs y estructura de exones	124
8.1. Análisis de secuencias	
8.1.1. Alineamiento de las secuencias de λ cDm.D y dc12	
8.1.2. Localización del punto de inicio de la transcripción	
8.1.3. Identificación y análisis de pautas abiertas de lectura	
8.2. Secuenciación parcial de fragmentos genómicos	
9. Estudio de inserciones letales de la región 54A	136
9.1. Localización de las inserciones en la región clonada	
9.2. Patrones de expresión de las inserciones	
10. Análisis genético	139
10.1. Test de letalidad de las inserciones de la región 54A	
10.2. Test de complementación de la letalidad entre las distintas inserciones	
10.3. Estudio de revertientes	
10.3.1. Test de complementación entre revertientes espontáneos	
10.3.2. Test de complementación entre revertientes de P976 y P-lacW(55/7)	

DISCUSIÓN

1. El gen PP2 abarca, probablemente, una región genómica mayor que la clonada	147
2. Mapa citogenético en las inmediaciones de la región 54A	148
3. El gen PP2 puede tener varias funciones durante el desarrollo de <i>Drosophila</i>	150
3.1. El gen PP2 se expresa reiteradamente durante el desarrollo de <i>Drosophila</i>	
3.2. Posible implicación del gen detectado en la cepa PP2 en la miogénesis embrionaria	
3.3. Función de PP2 en el desarrollo del ojo	
3.4. El patrón de expresión embrionario de PP2 presenta elementos en común con el patrón de otros genes: el gen <i>Drac1</i>	
4. Significado biológico del gran tamaño del gen PP2	156
5. Significado biológico de la presencia de transcritos no codificantes	159
5.1. Existen ejemplos de genes complejos que transcriben RNAs no codificantes	
5.2. Posible regulación de la maduración por corte y empalme alternativo de λ cDm.D y dc12	

CONCLUSIONES

REFERENCIAS

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 2-1. Mapa de destinos celulares en el eje dorso-ventral de un blastodermo _____	16
Figura 2-2. Resumen de la relaciones de regulación entre los genes de segmentación, los maternos y los homeóticos _____	19
Figura 4-1. Mapa esquemático de los destinos celulares en el mesodermo de un embrión en estadio 12 _____	25
Figura 5-1. Esquema del patrón de musculatura larvaria para los segmentos A2-A7 _____	33
Figura 5-2. Representación esquemática de la hipótesis de la célula fundadora _____	35
Figura 6-1. Jerarquía de regulaciones de genes que afectan a la miogénesis de <i>Drosophila</i> _____	46
Figura 7-1. Representación esquemática de distintos estadios en el proceso de determinación de los componentes de un omatidio _____	48

MATERIAL Y MÉTODOS

Figura 2-1. Esquema con información útil para poder localizar los sitios de restricción <i>Eco</i> RI, <i>Hind</i> III y <i>Bam</i> HI, en los insertos clonados en el vector Lawrist4 _____	65
Figura 7-1. Representación esquemática de la estructura del elemento P-lArB _____	75
Figura 7-2. Representación esquemática de la estructura del elemento PZ _____	75

RESULTADOS

Figura 1-1. Patrón de expresión embrionario y larvario de la inserción PP2 _____	90
Figura 1-2. Patrón de expresión embrionario de la cepa PP2 detectado mediante un anticuerpo anti- β -galactosidasa _____	94
Figura 3-1. Fragmentos genómicos de la cepa PP2 portadores del plásmido Bluescript _____	97
Figura 3-2. Esquema general de la estrategia para el rescate del plásmido del elemento P-lArB _____	98
Figura 3-3. Resultado de un Southern Blot genómico de las cepas Oregon-R y PP2 utilizando como sonda el inserto del plásmido pDmPP2.K1 _____	99
Figura 4-1. Representación esquemática de los distintos pasos que hemos seguido para la clonación de la región 54A. _____	101
Figura 4-2.: Southern Blot frente a distintas digestiones de DNA genómico total de la cepa Oregon-R con objeto de comprobar si dos sondas del paseo cromosómico son de copia única. _____	102
Figura 4-3. Digestiones parciales <i>Hind</i> III del clon λ Dm.TE1 (A) y Southern Blot (B) con una sonda de 3 kb del extremo del mismo (<i>Hind</i> III/ <i>Sal</i> I). _____	106
Figura 4-4. Señales de hibridación en cromosomas politénicos obtenidas con dos sondas separadas por 46 kb y su interpretación _____	107
Figura 5-1. Mapa de restricción de los clones genómicos λ Dm.TE1 y λ Dm.TB1, punto de entrada de la inserción PP2 y su orientación respecto a los clones genómicos: resultado de la hibridación <i>in situ</i> con las sondas 5, K1 y 4 _____	110
Figura 5-2. Mapa de restricción de los clones genómicos λ Dm.TE1 y λ Dm.TB1, punto de entrada de la inserción PP2 y su orientación respecto a los clones genómicos: resultado de la hibridación <i>in situ</i> con las sondas 9, 7 y 6 _____	113
Figura 5-3. Tamaños de los mRNAs detectados con la sonda <i>Hind</i> III de 2 kb común a los clones genómicos λ Dm.TE1 y λ Dm.TB1 _____	115
Figura 6-1. Mapa de restricción del clon λ CdM.D para los enzimas <i>Eco</i> RI, <i>Hind</i> III, <i>Sal</i> I, <i>Bam</i> HI y <i>Sac</i> I _____	117
Figura 6-2. Estructura de la unidad de transcripción del gen PP2 _____	120



Figura 7-1. Patrón de expresión del gen PP2, en embriones Oregon-R, detectado con la sonda <i>Hind</i> III de 2 kb del clon λ Dm.TE1 _____	124
Figura 8-1. Alineamiento generado por el programa BESTFIT entre las secuencias de los cDNAs dc12 y λ cDm.D _____	126
Figura 8-2. Representación esquemática de la localización de varios cDNAs sobre el DNA genómico _____	127
Figura 8-3. Alineamiento de los extremos 5' de las secuencias de los cDNA pcDm.A2, pcDm.B5 y dc12 _____	129
Figura 8-4. Todas las pautas de lectura posibles para el clon λ cDm.D, y las predicciones de regiones codificantes de los programas TESTCODE y CODONPREFERENCE _____	130
Figura 8-5. Todas las pautas de lectura posibles para λ cDm.B, y las predicciones de los programas TESTCODE y CODONPREFERENCE _____	132
Figura 8-6. Alineamiento entre las secuencias del cDNA dc12 y el fragmento genómico <i>Hind</i> III de 1,4 kb del clon λ Dm.TE1 _____	135
Figura 8-7. Alineamiento de las secuencias λ cDm.D y el fragmento genómico <i>Hind</i> III de 0,5 kb del clon λ Dm.TE1 con el programa GAP _____	135
Figura 8-8. Alineamiento de las secuencias de λ cDm.D y del fragmento genómico <i>Sal</i> I / <i>Sac</i> I del extremo del clon λ Dm.H con el programa GAP _____	135
Figura 9-1. Southern Blot del DNA adyacente a la inserción P976, frente a las digestiones de los clones genómicos indicadas en la figura _____	137

DISCUSIÓN

Figura 2-1. Recopilación de genes caracterizados molecularmente, y mutaciones localizadas en la región 54A o adyacentes _____	148
Figura 5-1. Representación, aproximadamente a escala, de los cuatro exones identificados en la región clonada, y su relación con dos de los cDNA caracterizados _____	161

INTRODUCCIÓN

Casi todos los organismos multicelulares son clones de células descendientes de una sola, el huevo fertilizado o cigoto. Las células del cuerpo son, pues, genéticamente idénticas pero manifiestan fenotipos muy diferentes: unas se especializan como músculos, otras como neuronas, otras como células sanguíneas, etc. (Alberts y col. 1994). El repertorio de posibles tipos celulares es, sin embargo, bastante reducido. Las 10^5 células de una larva de *Drosophila* pueden clasificarse en unos pocos cientos de tipos celulares diferentes de acuerdo con su contenido en proteínas mayoritarias (Gurdon 1992) y las 10^{15} células humanas en unos 210 tipos celulares distintos (Alberts y col. 1994). Una sola célula muscular embrionaria contiene 10^5 moléculas de actina, producto de un gen de copia única, mientras que otros tipos celulares pueden contener cantidades no detectables de ella, es decir, menos de 10 moléculas por célula. De hecho, la mayoría de las células, una vez diferenciadas completamente, tan sólo expresan en niveles altos alrededor de 50 genes (Gurdon 1992).

El programa de desarrollo que sigue una célula desde el cigoto hasta alcanzar su estado definitivo en el organismo adulto consiste, básicamente, en dos clases de fenómenos relacionados: la diferenciación celular y la formación de patrones espaciales o disposición ordenada de estructuras. Desde el punto de vista genético, se requiere una explicación de cómo la información genética bidimensional, codificada por el DNA, se traduce en un organismo tridimensional (Raff y Kaufman, 1983).

Se han utilizado muchos sistemas modelo para estudiar los mecanismos genéticos que controlan la formación de patrones espaciales, tales como las extremidades de los vertebrados, la segmentación en los insectos, la formación de músculos en *Drosophila* o el desarrollo del ojo compuesto de este díptero. Todos estos sistemas formadores de patrón son notablemente resistentes a perturbaciones ambientales y manipulaciones experimentales. Pueden tolerar grandes variaciones en el tamaño global del organismo, el número de células o las condiciones de crecimiento. Esta capacidad refleja, probablemente, la existencia de mecanismos para acomodar las variaciones que ocurren durante el desarrollo normal en el número de células y en su disposición (Hooper y Scott, 1992), así como la existencia de mecanismos genéticos redundantes en cada etapa del desarrollo, los cuales permiten compensar los posibles fallos en cualquiera de los sistemas formadores de patrón (Gurdon 1992).

En este trabajo vamos a describir la caracterización preliminar que hemos realizado de un gen con expresión en el mesodermo, y que hemos identificado mediante la técnica de trampa de los enhancer. Llamamos, provisionalmente, a este gen PP2: el nombre de la cepa en la que fue puesto de manifiesto. Previamente, vamos a comentar distintos aspectos del desarrollo de *Drosophila* para colocar, en un contexto adecuado, los resultados que presentaremos. Estos distintos apartados son, básicamente, los siguientes: en primer lugar, un comentario sobre

algunas estrategias, empleadas en *Drosophila*, para identificar nuevos genes implicados en algún aspecto de su desarrollo (y, en especial, para superar los inconvenientes que suponen la existencia de mecanismos redundantes o el estudio de estructuras donde sería difícil la búsqueda de mutaciones mediante métodos clásicos como por ejemplo, las estructuras internas). En segundo lugar, veremos, resumidamente, las etapas principales del desarrollo embrionario de *Drosophila*. En tercer lugar, nos centraremos en la determinación genética y diferenciación de los destinos celulares en el mesodermo, pues, por su patrón de expresión, el gen PP2 podría estar implicado en estos procesos. Finalmente, ya que existen evidencias genéticas independientes (Marek Mlodzik, EMBL, Heidelberg) de que el gen PP2 está implicado en el desarrollo del ojo, se hará una breve introducción a la genética del desarrollo del mismo.

1. METODOLOGÍAS PARA IDENTIFICAR GENES EN *DROSOPHILA*

La más clásica de todas las aproximaciones para identificar nuevos genes, implicados en un proceso de desarrollo determinado, es la **búsqueda de mutaciones recesivas** que afecten a dicho proceso. Esta aproximación, sin embargo, presenta dos inconvenientes principales. Por una parte, suele exigir una observación cuidadosa de la morfología de los individuos, lo cual hace que las búsquedas de defectos concretos o de estructuras internas puedan suponer una tarea impracticable. Por otro lado, en el estudio de procesos de desarrollo tardíos (como por ejemplo, la formación del ojo), esta aproximación se desvía hacia genes con papeles limitados en el desarrollo, pues si un gen esencial resulta afectado, normalmente el individuo muere como embrión o larva, y no podremos conocer su posible participación en un proceso posterior. Sin embargo, esta estrategia ha resultado notablemente fructífera para la dilucidación de la embriogénesis temprana de *Drosophila* (Nüsslein Volhard y Wieschaus, 1980).

Otra aproximación para identificar genes vitales implicados en un proceso consiste en la búsqueda de mutaciones recesivas por pérdida de función que actúan como **supresoras o incrementadoras dominantes del fenotipo** provocado por una determinada constitución genética "sensible". Por ejemplo, la combinación de alelos de *wingless* (*wg*) wg^{cs}/wg^{L114} es letal en fase de pupa a 25 °C. En estas condiciones, es posible diseñar un esquema de cruzamientos que permita la búsqueda a gran escala de mutaciones recesivas que supriman este fenotipo, es decir, que nazcan moscas adultas (A. Martínez Arias, comunicación personal). Las mutaciones puestas de manifiesto de este modo afectarán, probablemente, a genes que estén implicados en el mismo proceso biológico que estamos estudiando. Nótese que se trata de una aproximación

que se automantiene, pues cada gen nuevo identificado puede servir de punto de partida para la siguiente búsqueda.

Por otra parte, la posibilidad técnica de generar clones marcados mediante la recombinasa de levadura específica de lugar FRT (Harrison y Perrimon, 1993; Xu y Rubin, 1993), con frecuencias de recombinación próximas al 100%, permite la búsqueda de fenotipos en procesos tardíos del desarrollo en clones de genes letales. Es decir, se puede estudiar el efecto de estos genes en procesos de desarrollo tardíos, aun siendo alelos nulos que provocarían la muerte del animal, por la posibilidad de generar con gran facilidad clones homocigóticos para la mutación en cuestión. Mediante las técnicas clásicas de recombinación mitótica con rayos X esta aproximación es inabordable a gran escala.

Por último, la técnica de la "trampa de los enhancer" consiste, esencialmente, en situar un gen informador bajo el control de un promotor constitutivo débil e integrar esta construcción mediante transformación en embriones de *Drosophila*, o bien movilizar este transposón artificial mediante cruces genéticos, una vez integrado por primera vez (O'Kane y Gehring, 1987; Wilson y col. 1989; Bellen y col. 1989). Como gen informador se utiliza el gen *lacZ* de *E. coli* cuyo producto, la β -galactosidasa, puede ser detectado con facilidad mediante el sustrato artificial X-gal. Si esta construcción se integra cerca de un enhancer del genoma, podremos observar un patrón de expresión de β -galactosidasa que reproduce la expresión que este enhancer confiere a un gen cercano.

En la actualidad, la técnica está siendo empleada, esencialmente, de dos modos: (1) como marcador morfológico, para seguir el curso de la morfogénesis de determinadas estructuras (Bellen y col. 1989; Hartenstein y Jan 1992), y (2) para poner de manifiesto el patrón de expresión aproximado de genes no descritos, lo cual permite su posterior caracterización molecular y funcional (Wilson y col. 1989; Mlodzik y col. 1990; Fasano y col. 1991). En este último caso, se puede llegar a la clonación de genes para los que sería difícil identificar fenotipos mutantes. Un ejemplo de este tipo son los genes que determinan estructuras internas difíciles de observar (como el mesodermo), o aquellos genes implicados en mecanismos genéticos redundantes, los cuales no darían ningún fenotipo tras ser mutagenizados. Además, ya que las inserciones del elemento P no son, en general, mutagénicas y, dado que el patrón de expresión del gen informador se puede observar en heterocigosis, esta aproximación no está sujeta a ninguna desviación hacia genes no vitales. Por último, la técnica de la trampa de los enhancer permite obtener mutantes del gen en cuestión simplemente movilizándolo el transposón artificial con una fuente externa de transposasa, en los casos en los que la excisión

del mismo no sea precisa, o bien buscar individuos que hayan perdido un marcador de la construcción tras una experiencia de mutagénesis (normalmente rayos X).

Sin embargo, este método también presenta varios inconvenientes, siendo el más importante de ellos el hecho de que el proceso de inserción del elemento P no es completamente al azar. Además, se ha estimado que sólo el 50% de todos los genes pueden ser puestos de manifiesto mediante la inserción cercana de una construcción de este tipo (Kidwell, 1986). De hecho, no todos los patrones de expresión del gen informador tienen que parecer necesariamente "interesantes", aun estando controlados por enhancer de genes que sí lo son.

1.1. Técnicas para el estudio de los derivados mesodérmicos

El mesodermo, como capa embrionaria intermedia entre el ectodermo y el endodermo, no presenta especiales ventajas experimentales en *Drosophila*. Sin embargo, es muy buen modelo para el estudio de los mecanismos generadores de patrón, pues las células mesodérmicas no parecen estar determinadas por linaje y, por tanto, deben existir mecanismos que proporcionen información posicional durante la diferenciación de las células mesodérmicas. Además, también se ha empleado como modelo para estudiar la diferenciación celular en los músculos, como por ejemplo en el esclarecimiento de la función de las proteínas MEF2 en vertebrados, mediante el análisis del homólogo en *Drosophila*. (Lilly y col. 1995).

Se han empleado distintas técnicas para estudiar los derivados mesodérmicos. Entre ellas, han resultado especialmente adecuadas la búsqueda de mutantes (Drysdale y col. 1993), la ablación de células precursoras (Broadie y col. 1991), la microcirugía (Bock 1939; Bock 1941; Haget 1953, citados en Bate 1993a) y el estudio de mosaicos generados de modos diversos: mediante recombinación mitótica (Lawrence y col. 1986), por trasplante de núcleos (Lawrence y Johnston, 1986; Lawrence y col. 1994) y marcaje de células por inyección de colorantes.

A todas estas metodologías, hay que sumar la clonación de genes homólogos en distintas especies, en virtud de la capacidad de las sondas para hibridar débilmente con DNAs heterólogos. Otras técnicas desarrolladas más recientemente han sido la "trampa de los enhancer" (enhancer-trap), la generación de clones marcados mediante la recombinasa de levadura específica de lugar, FRT (ambas tratadas anteriormente). Y por último, otro método es la activación vía GAL 4 de secuencias clonadas (Brand y Perrimon, 1993), que ha sido empleada para demostrar que los genes homeóticos especifican autónomamente la adquisición de un determinado patrón de músculos en el mesodermo (Greig y Akam, 1993; Michelson, 1994; ver el apartado 4.2.2), así como para demostrar que la proteína Decapentaplegic induce la expresión

de genes mesodérmicos (Staehling-Hampton y col. 1994) y que es la señal para la activación del gen *tinman* (Frasch, 1995).

2. EL DESARROLLO EMBRIONARIO TEMPRANO EN *DROSOPHILA*

Tras la fertilización, el núcleo del cigoto inicia una serie de 9 divisiones nucleares muy rápidas y sincrónicas, que no van acompañadas de división celular, creándose un sincitio. Después de la novena división nuclear, la mayoría de los núcleos inician una migración hacia la periferia del huevo, donde sufren otras 4 divisiones. Es el estadio de blastodermo sincitial.

Tras la decimotercera división, la membrana citoplasmática inicia su invaginación entre los núcleos, que permanecen ordenados en la superficie del huevo, hasta independizar cada célula embrionaria en una capa superficial de unas 5000 células. Es el estadio de blastodermo celular, en el cual se ha producido ya la separación entre la línea germinal (células polares) y la somática. La rapidez de estas divisiones nucleares prácticamente impide cualquier transcripción del genoma zigótico, y el desarrollo depende, casi exclusivamente, de los productos acumulados por las células foliculares en el huevo durante su formación.

El huevo de *Drosophila* es, pues, durante las primeras dos horas aproximadamente, un sincitio donde los núcleos se dividen y migran en un citoplasma común. Esta peculiaridad es característica de los insectos, frente a otros embriones donde, desde el inicio, el huevo se divide en células independientes. Aunque no resulta claro si esta diferencia es superficial o fundamental, lo cierto es que *Drosophila* utiliza la difusión libre de proteínas en el huevo para generar gradientes morfogenéticos maternos, que definirán sus ejes dorso-ventral y antero-posterior (revisado en Lawrence, 1992).

2.1. Cuatro sistemas independientes controlan el plan básico del embrión

2.1.1 Eje antero-posterior:

El aspecto más evidente del eje antero-posterior de *Drosophila* es la existencia de unidades repetidas. Del extremo anterior al posterior se observan seis segmentos cefálicos, tres torácicos y ocho abdominales, cada uno de ellos con una morfología característica. En los extremos, el animal termina con el acron en la parte anterior y el telson en la posterior (Anderson, 1989).

Existen tres sistemas genéticos independientes, en este eje, para proporcionar a las células del blastodermo la información posicional necesaria.

2.1.1.1. El centro organizador anterior:

De los cuatro genes de efecto materno cuyas mutaciones afectan al desarrollo de la porción anterior del embrión, *bicoid* (*bcd*), *exuperantia* (*exu*), *swallow* (*swa*) y *staußen* (*stau*) (revisado en Driever, 1993), los experimentos de dosis génica y de rescate por trasplante de citoplasma demuestran que el producto del gen *bicoid* es el que actúa como morfógeno, y proporciona información posicional desde el extremo anterior del embrión hasta, aproximadamente, el extremo anterior del abdomen.

Los transcritos de *bcd* se concentran en el extremo anterior del embrión, y su traducción se inicia tras la puesta por parte de la hembra (no tras ser fertilizados). Así pues, en el blastodermo sincitial se genera un gradiente estable de proteína Bicoid en la parte anterior (Driever y Nüsslein-Volhard 1988a) de tal modo que los genes zigóticos pueden leer su posición en el eje antero-posterior en términos de concentración de esta proteína (Driever y Nüsslein-Volhard 1988b; revisado en Driever 1993).

La localización estrictamente anterior de los transcritos de *bcd* depende de los otros tres genes de efecto materno, *exu*, *swa* y *stau*, y, probablemente, depende de la unión de la proteína Stau al extremo 3' no traducido de *bcd*.

2.1.1.2. El centro organizador posterior:

Se han detectado nueve mutaciones de efecto materno en las que la parte posterior del embrión está afectada. Se trata de los genes, *cappuccino*, *spire*, *mago nashi*, *staußen*, *oskar*, *vasa*, *valois*, *tudor*, *nanos* y *pumilio* (revisado en Johnston 1993). Mediante experimentos de rescate por trasplante de citoplasma, semejantes al caso de *bcd*, se ha llegado a la conclusión de que el producto del gen *nanos* es el responsable primario del centro organizador posterior.

Los transcritos de *nanos* también están estrictamente localizados en el extremo posterior del embrión, pero el funcionamiento de este centro organizador no es el equivalente a *bcd*. El papel de *nanos* parece ser impedir que los transcritos maternos del gen *hunchback* (distribuido uniformemente en el embrión) sean traducidos. Sin embargo, se ha comprobado que la contribución materna de *hunchback* es completamente superflua, y los embriones formados en líneas germinales *hb⁻* y fertilizados por espermatozoides *hb⁺* son perfectamente viables. Según el modelo actual de funcionamiento de este centro, el desarrollo normal de estructuras posteriores exige que la proteína *hb* forme un gradiente de concentración elevada en la parte anterior y baja en la posterior. Esto se consigue traduciendo los transcritos *hb* maternos sólo en

la parte anterior del embrión (pues *nanos* controla esta traducción), y transcribiendo *hb* zigótico sólo en el extremo anterior, bajo el control del gradiente de *bcd* (Lawrence, 1992).

Aunque el mRNA del gen *nanos* está localizado en el extremo posterior, se requiere su actividad en una región entre el 20-50% de la longitud del embrión. Esto implica que debe existir otra proteína cuya función sea el transporte hacia delante de Nanos. Se ha identificado a la proteína Pumilio como la candidata más probable para esta función.

Respecto a los demás genes de este centro organizador, además de participar en la determinación de la parte posterior del embrión, también participan en la formación del plasma polar.

2.1.1.3. El sistema terminal:

Los genes que constituyen este grupo presentan un fenotipo mutante que consiste en la ausencia de los extremos anterior (acron) y posterior (telson) del embrión. Se han descrito dos grupos de genes, unos requeridos por la madre y otros requeridos por el cigoto (revisado en Sprenger y Nüsslein-Volhard 1993). Entre los primeros se encuentran *corkscrew*, *female sterile (1)* of *Nasrat*, *female sterile (1) polehole*, *lethal (1) polehole* (sinónimo *raf* o *D-raf*), *torso*, *torsolike*, *trunk* y entre los segundos, *tailless* y *huckebein*.

Un modelo, sobre el funcionamiento de este sistema (revisado en Lawrence 1992), consiste en que el gen *torsolike* produce un ligando para la proteína Torso, un receptor del tipo tirosina quinasa, que se encuentra distribuida uniformemente en la membrana plasmática del huevo. Este ligando se produce exclusivamente en las células foliculares del extremo anterior y posterior del folículo. De este modo, la expresión localizada de *torsolike*, en las células foliculares, conduce a la activación localizada del receptor Torso, contrariamente a los dos sistemas anteriores, donde la información posicional dependía de la localización del mRNA en ambos extremos.

2.1.2. El eje dorso-ventral:

La región segmentada del blastodermo se puede dividir, al menos, en cinco regiones distintas en su eje dorso-ventral (ver la figura 2-1). De la región ventral a la dorsal tenemos los precursores celulares de las siguientes estructuras: el mesodermo, el mesectodermo, el ectodermo ventral o neurogénico, el ectodermo dorsal y la amnioserosa. Es importante destacar que, aunque los destinos finales de las células se pueden predecir con fiabilidad a partir de su posición en el eje dorso-ventral del blastodermo, esto no significa que las células estén

completamente determinadas en este estadio embrionario. De hecho, los experimentos de trasplante de células (Technau y Campos-Ortega 1986) demuestran que las células que por su posición darían lugar a epidermis dorsal, incluso varias horas después de la gastrulación, pueden formar parte del SNC si se transplantan a posiciones más ventrales.

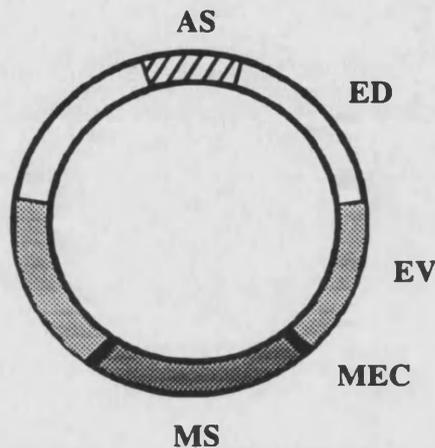


FIGURA 2-1. Mapa de destinos celulares en el eje dorso-ventral de un blastodermo. Se han empleado las siguientes abreviaturas: MS mesodermo; MEC mesectodermo; EV epidermis ventral; ED epidermis dorsal; AS amnioserosa.

Aparentemente, la asimetría dorso-ventral se genera mediante dos procesos consecutivos de transducción de señales. En primer lugar, una señal va desde el oocito en maduración hasta las células foliculares que rodean al mismo y, en segundo lugar, se devuelve otra señal desde las células foliculares hacia el embrión, donde provoca un gradiente del morfógeno Dl en los núcleos celulares. El análisis genético ha identificado 18 genes de efecto materno, necesarios para definir esta polaridad y el patrón embrionario completo en el eje dorso-ventral (revisado en Chasan y Anderson 1993; Lawrence, 1992).

Algunos de estos genes, como *cornichon*, *gurken* y *fs(1)K10* son, probablemente, necesarios en el huevo para producir una señal hacia las células foliculares, que presentan el receptor de membrana Torpedo. No se conoce si el oocito produce este ligando de forma local o no, pero sí sabemos que es necesario para el desarrollo correcto de las células foliculares circundantes. Una vez transducida la señal al interior de las células foliculares, estas producen una señal localizada que vuelve al oocito. Las células foliculares requieren de la actividad de los genes *nudel*, *pipe* y *windbeutel* para producir esta señal. Una hipótesis es que el producto del gen *spätzle* es el sustrato de la proteína Easter (una proteasa de serina) y que, una vez cortada la proteína Spätzle, actúa como señal en el embrión a través del receptor Toll, que está distribuido uniformemente en la membrana plasmática. De este modo, Toll se ve activado de forma local

por la producción restringida de su ligando (revisado en Chasan y Anderson 1993; Lawrence, 1992).

La transducción de esta señal hasta el núcleo requiere los productos de los genes *spätzle*, *tube*, *pelle* y *cactus* y conduce, finalmente, a un gradiente de concentración en los núcleos del blastodermo sincitial de la proteína Dorsal, máximo en la parte ventral, que determina el patrón de diferenciación en cada punto del eje dorso-ventral.

En concreto, este gradiente nuclear conduce a una transcripción específica de algunos genes zigóticos en distintas regiones del embrión. Así, los genes *decapentaplegic*, *tolloid* y *zerknüllt* se transcriben en los núcleos de la parte más dorsal del embrión (en el 40% más dorsal), en los cuales no se detecta la proteína Dorsal. En cambio, *twist* y *snail* se expresan en los núcleos del 25% más ventral del embrión, donde se detecta la mayor concentración de proteína Dorsal (Chasan y Anderson 1993; ver también el apartado 3).

2.2. Tres clases de genes de segmentación subdividen el embrión y los genes homeóticos determinan la identidad de los segmentos

Las claves posicionales establecidas en el huevo por la madre, mediante la expresión de los genes de efecto materno, guían la creación de un sistema discreto de segmentos. Este proceso depende de una colección de unos 37 genes de segmentación, cuya expresión es principalmente zigótica (revisado en Hooper y Scott, 1992; Pankratz y Jäckle 1993; Martínez-Arias 1993), y de una serie de genes homeóticos que actúan posteriormente, y que diversifican el patrón de segmentación de modo que cada segmento adquiere una morfología única.

Los genes de segmentación se han clasificado, a su vez, en tres grandes grupos de acuerdo con su efecto fenotípico sobre el patrón de estructuras cuticulares larvarias (Nüsslein-Volhard y Wieschaus, 1980):

Los **genes de tipo gap** ("gap genes") dividen el embrión en regiones relativamente amplias, que comprenden varios primordios de segmentos. Los mutantes de esta clase presentan, pues, un patrón cuticular con bloques de segmentos contiguos ausentes. Por ejemplo, los embriones mutantes para el gen *knirps* tienen delecionados los segmentos abdominales del uno al siete, mientras que los demás segmentos son normales. Se han identificado un total de nueve genes de este tipo, aunque fue en base al fenotipo de *hunchback*, *Krüppel* y *knirps* cuando se definió este sistema génico (Pankratz y Jäckle 1993; Levine y Harding, 1989).

Los **genes de la regla par** ("pair rule genes") subdividen los dominios amplios generados por los genes de tipo gap en segmentos individuales. Sus mutaciones provocan, normalmente,

la deleción de segmentos enteros, pero de una manera alternada. Por ejemplo, los mutantes de *fushi-tarazu* sólo presentan los parasegmentos pares. Otros componentes de este sistema genético son *runt*, *hairy*, *even-skipped*, *odd-paired*, *odd-skipped*, *sloppy-paired* y *paired* (Pankratz y Jäckle 1993; Levine y Harding, 1989).

Finalmente, los genes de polaridad de los segmentos ("segment polarity genes") son necesarios para la morfogénesis de estructuras repetidas en cada segmento (por ejemplo, el patrón de estructuras quitinosas dentro de cada segmento). Las mutaciones en estos genes provocan que una parte de cada segmento se pierda, y en su lugar aparezca la imagen especular de todo, o parte, del segmento que ha quedado. Se han clasificado un total de 20 genes en esta categoría y entre los mejor estudiados figuran *armadillo*, *wingless*, *engrailed*, *shaggy* y *patched*. Por ejemplo, *engrailed* y *wingless* participan en el establecimiento y mantenimiento de los límites de los segmentos, siendo *wingless* una proteína secretada al exterior celular y que regula la actividad del gen *engrailed*, y la de otros genes de polaridad de los segmentos, en las células vecinas (Levine y Harding, 1989; Martínez Arias, 1993; Perrimon, 1994).

Así pues, los fenotipos de los mutantes de segmentación sugieren que estos forman un sistema coordinado que subdivide el embrión en dominios progresivamente más pequeños, que pueden ser distinguidos por sus distintos patrones de expresión génica.

En contraste, las mutaciones en los genes homeóticos no impiden la segmentación *per se* sino que provocan transformaciones en la identidad de los segmentos, es decir, todo o parte de un segmento adquiere las características propias de otro segmento. A nivel molecular sus productos proteicos se caracterizan por la presencia de un dominio de unión al DNA específico, el homeodominio (McGinnis y col. 1984), aunque esta no es una característica definitoria, pues algunos genes de segmentación también lo poseen, como *engrailed* (Poole y col. 1985) y *fushi tarazu* (Kuroiwa y col. 1985).

Los genes homeóticos se agrupan en dos complejos génicos en el brazo derecho del cromosoma 3. Uno es el complejo Antennapedia, con los genes *labial*, *proboscipedia*, *Deformed*, *Sex combs reduced* y *Antennapedia*, y otro el complejo bithorax, con los genes *Ultrabithorax*, *abdominalA* y *AbdominalB*. La disposición de los genes dentro de cada complejo es interesante pues aparecen en el mismo orden en el que se requiere su función en el eje antero-posterior del animal.

La expresión precisa de cada gen de segmentación y homeótico depende de una compleja jerarquía, cuyas relaciones se han obtenido, principalmente, examinando la distribución de RNAs y proteínas codificadas por un gen dado, en embriones mutantes para otros genes. Un resumen de estas relaciones (tomado de Levine y Harding, 1989) se muestra en la figura 2-2.

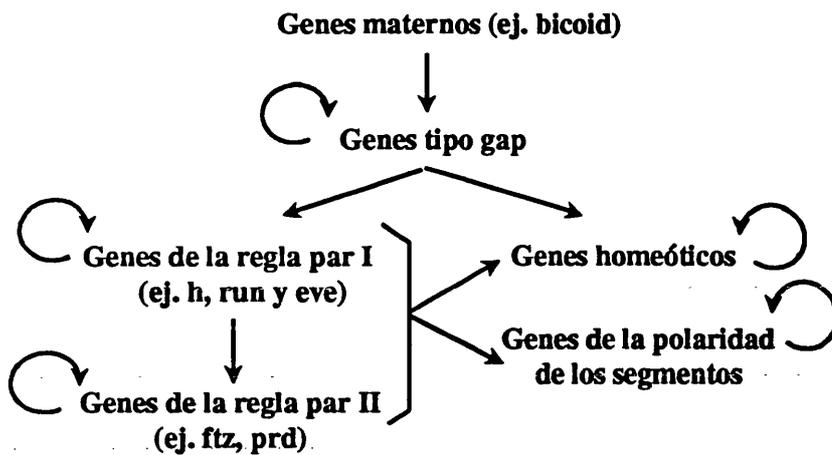


FIGURA 2-2. Resumen de las relaciones de regulación existentes entre los genes de segmentación, los maternos y los homeóticos. Las flechas curvadas indican regulación entre genes de la misma clase, lo cual es, a menudo, necesario para el refinamiento o mantenimiento de los patrones de expresión de estos genes.

El primer paso en el proceso de segmentación parece ser la expresión localizada de los genes de tipo gap en dominios discretos a lo largo del eje antero-posterior. Los factores depositados por la madre durante la oogénesis juegan un papel esencial en el establecimiento de estos dominios. Por ejemplo, el gen *hunchback* requiere concentraciones relativamente elevadas de la proteína Bicoid, con lo cual inicia su expresión en la parte anterior del embrión, donde la concentración de la misma es mayor, y se extiende a su vez posteriormente formando un gradiente de proteína Hunchback. Este gradiente de Hunchback actúa como un morfógeno y localiza los dominios de expresión de *Krüppel*, *knirps* y *giant* (otro gen del tipo gap) (Lawrence 1992).

Además de la jerarquía de genes de efecto materno/tipo gap/regla par/homeóticos/polaridad de los segmentos mostrada en la figura, existen interacciones reguladoras dentro de cada clase de genes. Por ejemplo, las interacciones reguladoras son importantes para delimitar de forma precisa los límites de expresión de los genes de tipo gap, y algunos de la regla par son determinantes para definir la expresión periódica de otros genes de su misma clase.

Finalmente, los patrones generados por los genes de tipo gap y de la regla par son básicamente distintos a los generados por los genes de la polaridad de los segmentos. Los primeros establecen un patrón de información posicional indispensable pero transitorio (desaparece tras la gastrulación), en cambio, los segundos permanecen para establecer las subdivisiones básicas del patrón de estructuras epidérmicas de cada parasegmento.

3. FORMACIÓN Y ORGANIZACIÓN ESPACIAL DEL MESODERMO

El mesodermo aparece, aproximadamente, a las tres horas del inicio de la embriogénesis, tras la serie de movimientos morfogénéticos que constituyen la gastrulación (estadio 6 de Campos Ortega y Hartenstein, 1985), y que mueven las células del surco ventral hacia el interior del embrión, generando un embrión con dos capas embrionarias. El conjunto de todas estas células internalizadas constituye el mesodermo, una capa embrionaria que, además de corresponder a una región embrionaria bien definida, coincide con el dominio de expresión del gen *snail* (Leptin 1991) y con un conjunto restringido de destinos celulares: los derivados mesodérmicos.

La formación del mesodermo en *Drosophila*, en contraste con el caso de *Xenopus* (revisado en Jessell y Melton, 1992; Klein y Melton 1994), depende principalmente de decisiones celulares autónomas. Esto significa que no ocurren fenómenos de inducción por parte del ectodermo suprayacente, aunque en la subdivisión posterior del mesodermo se han demostrado, en efecto, fenómenos de inducción desde el ectodermo, en especial del gen *decapentaplegic* (Frasch, 1995; Staehling-Hampton y col. 1994).

La actividad de los genes que definen el eje dorso-ventral, en particular el gradiente nuclear del morfógeno Dorsal (ver el apartado 2.1.2), conduce a la activación de los genes *twist* (*twi*) y *snail* (*sna*) en la parte ventral del embrión, varios diámetros celulares a cada lado de la línea media del embrión (el 25% de la región más ventral del embrión) y hasta cada uno de los extremos del mismo. La evidencia de que *twist* y *snail* están bajo el control de *dorsal* procede de que en embriones de madres mutantes para *dorsal*, no se produce transcripción ni de *twist* ni de *snail* (Thisse y col. 1987). Además, la proteína Dorsal se une a sitios específicos en el promotor de *twist*, y puede activar su transcripción en experimentos de cotransfección (Thisse y col. 1991)

Los dominios de expresión de *twist* y *snail* empiezan antes de la celularización completa del embrión, y se solapan en gran medida, aunque son cualitativamente muy diferentes entre sí. En concreto, el dominio de expresión de *twi* es mayor que el de *sna* y, además, termina de una manera gradual. En cambio, *sna* se expresa en una región ventral más restringida y los límites de su dominio de expresión son muy bruscos. La expresión de *sna* presenta una frontera clara a cada lado del embrión (dentro de los límites de transcripción de *twi*), con dos líneas de células que expresan el gen *single-minded* (*sim*). Estas dos filas de células marcan la extensión máxima que alcanza la invaginación de células durante la gastrulación y, por lo tanto, los límites laterales del mesodermo. Tras la gastrulación, estas dos líneas de células con expresión del gen *sim*, quedan juntas a cada lado del surco ventral para constituir el mesectodermo.

Posteriormente, tras la fase de extensión de la banda germinal, *sna* deja de transcribirse en el mesodermo (revisado en Bate, 1993a).

Tanto *twi* como *sna* son necesarios para la formación del mesodermo. Los embriones mutantes para cualquiera de los dos genes no gastrulan de forma normal y, consecuentemente, no se diferencia ningún derivado mesodérmico. Los dobles mutantes *twi/sna* presentan un fenotipo aún más severo. Ambos genes codifican para factores de transcripción, y la hipótesis más sencilla de cómo operan estos factores en el mesodermo es la siguiente: *twi* se ve activado por niveles intranucleares elevados de Dl (con expresión gradual en los límites debido a que el gradiente de Dl disminuye lateralmente) y se requiere para la expresión de los genes mesodérmicos (incluido *sna* y *twi* mismo, pues se autoactiva para mantener su expresión), mientras *sna* también es activado por Dl, y actúa reprimiendo la expresión de genes mesectodérmicos y neuroectodérmicos en la región ventral del embrión (Leptin, 1991). Así pues, *sna* requiere tanto *twi* como *dl* para generar su patrón de expresión completo y, de hecho, su región promotora contiene sitios de unión tanto para Twi como para Dl (revisado en Bate, 1993a).

Por tanto, la actividad de *twi* y *sna* define las células precursoras del mesodermo, pero esta no es su única función. Recientemente se ha demostrado que tanto *sna* como *twi* también participan en la iniciación del surco ventral, y que este proceso es relativamente independiente de la diferenciación misma del mesodermo (Ip y col. 1994). Una vez iniciada la formación del surco ventral, existen mecanismos genéticos especialmente dedicados a que la internalización de la capa de células que formarán el mesodermo ocurra de modo ordenado y coordinado (revisado en Costa y col. 1993). Hasta el momento, se han identificado dos genes pertenecientes a esta última categoría, son el gen de efecto materno *concertina* y el gen de expresión zigótica *folded gastrulation (fog)* (Costa y col. 1994).

En el embrión, la mayoría de las células mesodérmicas dejan de expresar *twist* alrededor del estadio 12, cuando los tipos celulares específicos de mesodermo inician su diferenciación. Sin embargo, las células precursoras de la musculatura adulta continúan expresando *twist* a lo largo de toda la embriogénesis y la vida larvaria (Bate y col. 1991). Estas células, al igual que las células epidérmicas de los discos imaginales, proliferan durante el desarrollo larvario y se diferencian en el patrón específico de músculos adultos durante la metamorfosis.

El número y las posiciones de estas células progenitoras adultas difiere entre segmentos, especialmente entre los segmentos torácicos y abdominales. Los segmentos abdominales del A1 al A7 presentan sólo seis precursores musculares adultos por hemisegmento, dispuestos según un patrón característico, que consiste en una célula situada ventralmente, dos células laterales

en el límite segmentario, y tres células dorsales, cuyas posiciones son algo variables. Estos precursores corresponden, respectivamente, a los músculos abdominales adultos ventrales, laterales y dorsales. Los segmentos torácicos cuentan con mayor número de precursores, de 15 a 20, la mayoría de ellos agrupados alrededor de los discos imaginales. Ellos darán lugar a la compleja musculatura torácica, incluyendo la musculatura de la pata y del vuelo (Bate y col. 1991).

Una aplicación práctica del estudio del patrón de expresión de *snr* es que, junto con la observación directa, permite estimar el número de células que componen el mesodermo de cada segmento embrionario en el estadio de blastodermo. Estas observaciones dan números entre 50 y 70 como el número de células que dan lugar a todos los derivados mesodérmicos de la larva y mosca adulta (Bate, 1993a). Se obtienen estimas semejantes a partir del recuento de los miómeros establecidos transitoriamente en el estadio 9. Estos recuentos dan, aproximadamente, 180 células por segmento y, dado que estas células han sufrido dos mitosis desde el blastodermo, procederían de 45 células blastodérmicas (Campos-Ortega y Hartenstein, 1985).

Un problema distinto al que hemos estado viendo hasta ahora es el de conocer cuál es la fuente de información posicional metamérica que organiza el mesodermo. Es decir, igual como la expresión de los genes de segmentación establece un marco de referencia metamérico en el ectodermo, ¿existe un marco de referencia equivalente en el mesodermo?

Por el momento, no se ha podido contestar satisfactoriamente a esta pregunta y se han propuesto varias posibilidades. La capa de células invaginadas para formar el mesodermo podría ser simplemente una hoja uniforme de células o, por otro lado, podría ser que realmente contuviera un marco de referencia metamérico. En este último caso, la información posicional repetida del mesodermo podría proceder, como en el ectodermo, de la expresión de los genes de la regla par *fushi tarazu (ftz)* y *even-skipped (eve)*, o depender de puntos de referencia suministrados por inducción desde el ectodermo (Bate, 1993a).

Esta última posibilidad se ve reforzada por dos observaciones recientes. Por un lado, que el gen *decapentaplegic* (un miembro de la familia de los factores de crecimiento con capacidad de transformación tipo β (TGF β) implicado en la formación del patrón dorso-ventral y de expresión ectodérmica), participa directamente en la inducción de mesodermo visceral y cardíaco a través de la activación de *tinman* (Frasch, 1995). Por otro lado, que el gen de polaridad de los segmentos *wingless* participa en fenómenos de inducción, en ambos sentidos, a través de las capas embrionarias mesodermo y ectodermo. En concreto, Lawrence y col. (1994) han demostrado mediante experiencias de trasplante de núcleos, que la expresión de *wingless* en el mesodermo puede activar la transcripción de *engrailed* en fragmentos de epidermis donde

las células son *wg*. Estos embriones mosaico demuestran, pues, dos hechos. En primer lugar, que realmente existe expresión de *wg* en el mesodermo y, en segundo lugar, que este gen puede inducir la transcripción de *engrailed* en otra capa embrionaria. Por último, existen observaciones que apuntan a que la expresión de *wingless* en el ectodermo también puede influir en la expresión de genes mesodérmicos (Mary K. Baylies, com. pers.).

Por otra parte, la expresión de *ftz* y *eve* probablemente determina los límites de los parasegmentos en el mesodermo, como sugiere el hecho de que los patrones de expresión de ambos genes están en registro entre el ectodermo y mesodermo durante la gastrulación, y que algunos genes homeóticos terminan o empiezan en estos límites de parasegmentos (al igual que en el ectodermo). Sin embargo, a diferencia del ectodermo, aparentemente los parasegmentos mesodérmicos no se subdividen en compartimentos anterior y posterior. Existen tres argumentos en este sentido, dos de ellos basados en que se espera que el gen de polaridad de los segmentos *engrailed* funcione del mismo modo en ambas capas embrionarias (Lawrence, 1992). En primer lugar, mediante análisis de linaje celular, se ha podido demostrar que, al menos en los músculos torácicos adultos, no existe ninguna subdivisión dentro de un segmento, es decir, una vez una célula mesodérmica inicia su proliferación, sólo coloniza su parasegmento (Lawrence, 1982). En segundo lugar, aunque el gen *engrailed* se expresa en el mesodermo en el borde de los parasegmentos, su expresión disminuye rápidamente hacia el estadio 9-10. Por último, mediante experimentos de trasplante de núcleos, se ha demostrado que *engrailed* no se requiere para el desarrollo normal de estructuras mesodérmicas adultas (Lawrence 1982; Lawrence y Johnston 1984). Se ha observado que los núcleos *engrailed*-trasplantados participan en el desarrollo de derivados mesodérmicos de forma normal.

Así pues, dado el papel fundamental de *engrailed* en el ectodermo, no parece probable que la maquinaria que organiza el eje antero-posterior en el ectodermo sea empleada del mismo modo en el mesodermo. Otra evidencia en este mismo sentido es el patrón de expresión en el mesodermo del gen de polaridad de los segmentos *patched* (*ptc*). Durante el estadio de banda germinal extendida *ptc* se detecta en 15 bandas de expresión, tanto en el ectodermo como en el mesodermo (PS 0 a 14). Sin embargo, las bandas están fuera de registro en ambas capas embrionarias, y esto no se debe a ningún corrimiento del mesodermo respecto al ectodermo, ya que las bandas de expresión de *en* (Hooper y Scott 1989) y de *ftz* (Bienz y col. 1988) permanecen en registro en ambas capas embrionarias.

Por tanto, aunque el mesodermo hereda los dominios de expresión de *ftz* y *eve* del blastodermo, y aparentemente define parasegmentos, estos no se subdividen en grupos de células que expresan *en* y que no lo expresan (compartimentos), como ocurre en el ectodermo, y

quedan, pues, tres alternativas: (1) el mesodermo utiliza un mecanismo todavía no identificado para generar una organización espacial independientemente del ectodermo, (2) el mesodermo depende del ectodermo en su organización espacial o (3) los puntos de referencia primarios establecidos por los genes de la regla par cooperan con el ectodermo para suministrar la información espacial en el eje antero-posterior del mesodermo (Bate, 1993a).

4. ESPECIFICACIÓN DE LOS DESTINOS CELULARES EN EL MESODERMO

El mesodermo da lugar a muchos derivados embrionarios, entre ellos la musculatura somática y la visceral, el cuerpo graso, el vaso dorsal, la sangre (hemocitos), parte de las gónadas, las células perineuriales y grupos de células que rodean la parte media del intestino embrionario (Hartenstein y Jan 1992; ver la figura 4-1).

Las primeras señales de diferenciación para la mayor parte de los derivados del mesodermo aparecen durante la retracción de la banda germinal, entre 7 y 8 horas tras la puesta del huevo (estadio 12 de Campos Ortega y Hartenstein, 1985). Esto significa que los sucesos decisivos para la creación de un patrón espacial de información deben tener lugar en el periodo entre la gastrulación y la retracción de la banda germinal (Bate, 1993a).

Una gran variedad de técnicas para la localización de los primordios de las estructuras mesodérmicas de larvas y adultos colocan estos primordios en la región ventral-media del blastodermo (Hartenstein y col. 1985; ver la figura 2-1). Sin embargo, aunque todas las células que participan en la gastrulación parecen estar determinadas a formar estructuras mesodérmicas, probablemente en este estadio todavía no han sido asignadas a formar derivados mesodérmicos concretos, tales como el vaso dorsal, la musculatura somática, el cuerpo graso, etc (Beer y col. 1987; citado en Bate 1993a; Technau y Campos-Ortega 1986).

Así pues, aunque la activación local de los genes zigóticos en el blastodermo define el primordio mesodérmico y sus límites, debe existir información adicional que lance a las células mesodérmicas por distintos programas de diferenciación celular. Este problema parece haber sido solventado de modos distintos en vertebrados e insectos. En *Xenopus* se ha descrito una proteína, codificada por el gen *gooseoid*, capaz de actuar como morfógeno y especificar al menos 4 tipos celulares mesodérmicos diferentes (notocorda, músculo, hígado y sangre) dependiendo de su concentración en el mesodermo (Niehrs y col. 1994).

En *Drosophila*, en cambio, en ningún momento parece existir un gradiente de morfógeno en el mesodermo equivalente al descrito en *Xenopus*. Sin embargo, como se indica en el apartado anterior, se han descrito fenómenos de inducción tanto desde el ectodermo al

mesodermo (Frasch, 1995; Mary Baylies, com. pers.) como del mesodermo al ectodermo (Lawrence y col. 1994). En este y en el siguiente apartado vamos a tratar los mecanismos genéticos que se han propuesto para explicar la formación del patrón mesodérmico, es decir, básicamente la diferenciación del mesodermo visceral y la formación del patrón muscular en el mesodermo somático.

4.1 Diferenciación del mesodermo visceral

Una de las decisiones más tempranas e importantes en la diferenciación del mesodermo es la subdivisión de éste en mesodermo somático (musculatura del cuerpo del animal) y mesodermo visceral (musculatura del intestino). Morfológicamente, estos dos primordios se pueden distinguir a partir de las tres horas del inicio de la gastrulación. En ese momento, el mesodermo visceral forma una capa separada, localizada dorsal e interiormente, mientras que la capa de mesodermo somático está en contacto con el SNC y el ectodermo (ver la figura 4-1). Un poco más tarde, empiezan a especificarse las células fundadoras de los músculos individuales de la musculatura del cuerpo (ver el apartado 5.2). El cuerpo graso se forma a partir de células del mesodermo ventral, localizadas internamente con respecto a los precursores de la musculatura somática (para una descripción detallada del origen de este derivado mesodérmico ver Hoshizaki y col, 1994), y las células del extremo dorsal del mesodermo se desarrollarán en el vaso dorsal (Hartenstein y Jan, 1992).

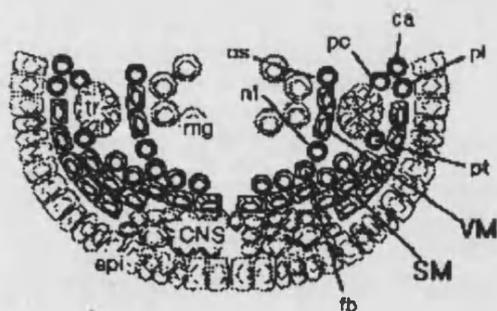


FIGURA 4-1. Mapa esquemático de los destinos celulares en el mesodermo de un embrión en estadio 12. Se muestra tan sólo la mitad ventral del embrión. Las distintas subdivisiones del mesodermo se representan en diferentes tonos de negrita. La figura se ha tomado de Hartenstein y Jan (1992). Abreviaturas empleadas: SM precursores de los músculos somáticos; VM precursores de los músculos viscerales; *ca* precursores del vaso dorsal; *epl* epidermis; *fb* precursores del cuerpo graso; *mg* precursores del intestino medio; *nl* células perineuriales; *os* células protectoras exteriores; *pc* células precursoras pericardiales; *pl* precursores de las células del periligamento; *pt* precursores de las células peritraqueales; *tr* tráquea.

Se han descrito dos genes con homeobox, *tinman (tin)* y *bagpipe (bag)* (Azpiazu y Frasch, 1993), los cuales participan en la subdivisión espacial del mesodermo en sus componentes somático y visceral. El análisis genético de estos genes ha demostrado que *tin* controla la formación de la musculatura visceral y el corazón a partir de porciones del mesodermo dorsal (ver la figura 4-1). Se supone que, en su primera fase de expresión, *tin* es activado por *twist* y, hasta después de la gastrulación, sus mensajeros están presentes en todas las células mesodérmicas de la porción central del embrión. Algo después, este patrón de transcripción cambia en una manera que sugiere una dependencia con el gen *decapentaplegic (dpp)*. Este cambio consiste en que las células mesodérmicas con mayores niveles de *tin* se localizan directamente debajo de las células ectodérmicas dorsales que están expresando *dpp*.

De hecho, recientemente se ha podido demostrar mediante la expresión ectópica del gen *dpp* con el sistema GAL4 (Brand y Perrimon, 1993), que esta proteína actúa como molécula señal en un proceso de inducción desde el ectodermo suprayacente hacia el mesodermo dorsal, activando el gen *tin* (Frasch, 1995). Congruente con esta observación está el hecho de que el gen *thickveins*, cuya proteína es necesaria junto a la del gen *punt* para la transmisión de la señal Dpp (Ruberte y col. 1995), se expresa en el mesodermo cuando su molécula ligando lo está haciendo en el ectodermo. Además, se ha sido descrito un proceso de inducción semejante entre *dpp* y *labial* más adelante en el desarrollo. Esta inducción consiste en una activación de la expresión del gen *labial* en el endodermo del intestino medio del embrión debido a la expresión de *dpp* en una capa suprayacente, esta vez el mesodermo. Estas observaciones demuestran, pues, que la expresión de *dpp* en el ectodermo puede determinar qué células del mesodermo serán competentes para diferenciarse en mesodermo visceral y corazón.

Por su parte, el comportamiento genético del gen *bag* sugiere que depende de la actividad de *tin* (Azpiazu y Frasch, 1993), aunque existen evidencias que apuntan a que también depende directamente del propio gen *dpp*, en un proceso de inducción semejante al de *tin* (Staebling-Hampton y col, 1994).

Además de ser requerido para la formación del mesodermo visceral y para la especificación de las células precursoras del corazón, *tin* se requiere también para la especificación de las células fundadoras de determinados músculos (ver el apartado 5.3.4; Azpiazu y Frasch, 1993; Bodmer, 1993).

4.2 Formación del patrón muscular en el mesodermo somático

Se han propuesto tres hipótesis de cual puede ser la fuente de información posicional que especifica el patrón exacto de los músculos de cada segmento. Se trata de las siguientes, no necesariamente excluyentes (Bate, 1990):

1. El ectodermo actúa como fuente de información posicional para la formación del patrón muscular.
2. El mesodermo especifica autónomamente el patrón de músculos.
3. La inervación recibida participa en la formación del patrón.

Pasamos a continuación a desarrollar con cierto detalle cada una de estas hipótesis.

4.2.1 El ectodermo como fuente de información posicional en el mesodermo

Una posibilidad es que el ectodermo, mediante un mecanismo de inducción semejante al que ocurre en vertebrados, o semejante al descrito para la determinación de mesodermo visceral, sea responsable de la formación del patrón de músculos. De hecho, los experimentos de transplante de células, de ablación y de microcirugía han llevado a la generalización de que el mesodermo no especifica su patrón espacial de músculos en los insectos, y que este patrón viene determinado por el ectodermo (Haget 1953; Bock 1939; Bock 1941; citados en Bate, 1993a; Greig y Akam 1993). En este sentido, son especialmente ilustrativos los experimentos de microcirugía realizados en embriones de *Chrysopa perla* (Bock 1939; Bock 1941) y en el coleóptero *Leptinotarsa* (Haget 1953).

Las evidencias experimentales, en ambos casos, son básicamente la misma: la eliminación parcial del ectodermo embrionario, bien sectores dorsales o laterales del embrión, conducen a una diferenciación de las células mesodérmicas que está dictada por el ectodermo con el que entran en contacto. Las células mesodérmicas cercanas a un fragmento de epidermis dorsal se diferencian en musculatura visceral y corazón, mientras aquellas en contacto con epidermis lateral se desarrollan en músculos somáticos y cuerpo graso.

Así pues, se concluye que las células mesodérmicas entran en programas de desarrollo diferentes por contacto con distintas regiones del ectodermo y, con el experimento complementario de eliminar mesodermo para estudiar el comportamiento del ectodermo, que el ectodermo se desarrolla de modo relativamente normal en ausencia del correspondiente mesodermo (de hecho, muchas estructuras ectodérmicas se desarrollan de forma normal en mutantes con carencia absoluta de mesodermo, como *twist* y *snail*)

Debe tenerse en cuenta, además, que la epidermis es un elemento esencial en la diferenciación tardía de los músculos (una vez ya han sido especificados) pues éstos deben

unirse a lugares determinados de la epidermis y forman parte, por tanto, del patrón de estructuras epidérmicas que deben especificarse (Lawrence y Johnston, 1986).

Recientemente, se ha demostrado que la formación del patrón muscular embrionario correcto depende de la migración de los músculos en desarrollo sobre el ectodermo y del lugar específico de anclaje en éste (Volk y Vijayraghavan 1994). Los músculos en desarrollo utilizan las células ectodérmicas a lo largo del límite segmentario para alcanzar sus lugares específicos de anclaje a la epidermis. En los mutantes *wingless* y *naked*, donde estas células del límite segmentario están ausentes, los músculos aparecen muy desorganizados.

Los mutantes *patched*, y distintas cepas con presencia ectópica de células del límite segmentario, proporcionan evidencia experimental adicional. En el primer caso, el patrón de segmentación está afectado, pero las células del borde segmentario existen y aparecen cerca de su posición correcta. En ellos, la organización muscular es relativamente normal. En el segundo caso, las cepas mutantes donde aparecen células del límite segmentario en lugares ectópicos, muestran una desorganización muscular congruente con la aparición de lugares de anclaje nuevos en lugares ectópicos. Por tanto, las células del límite segmentario parecen tener un papel clave guiando las fibras musculares en desarrollo hasta sus lugares de anclaje definitivos, y resulta claro que el ectodermo toma parte activa en la formación del patrón muscular correcto, al menos en lo que respecta a la determinación de los lugares de anclaje (Volk y Vijayraghavan 1994).

4.2.2 Especificación autónoma del patrón muscular

Una segunda posibilidad es que el mecanismo que genera patrón muscular sea independiente de la epidermis. Esta posibilidad se ve apoyada por los experimentos de Hooper (1986), Greig y Akam (1993) y, recientemente, por los de Michelson (1994).

En el primero de ellos se demuestra la existencia de defectos reproducibles en el patrón de músculos larvarios en determinadas combinaciones de alelos de *Ubx*, en segmentos donde la epidermis no se ve afectada de modo aparente (Hooper, 1986). Una explicación razonable para esta separación de efectos en la epidermis y en los músculos es que *Ubx* tenga una función autónoma en el mesodermo durante la especificación de los músculos y, por lo tanto, que existan mecanismos, específicos del mesodermo, que generen patrón en este estadio (Bate 1990).

En el segundo experimento, los autores examinan directamente el problema de la especificación de músculos, expresando el gen homeótico *abdominalA* ectópicamente en el mesodermo, sin alterar su expresión en el ectodermo. La experiencia consiste en colocar *abdA*

bajo el control de Gal4 y dirigir la transcripción de Gal4 con un promotor específico de mesodermo, en este caso *twist (twi)*. De este modo se encuentra que el patrón de precursores de la musculatura adulta en el tórax (monitorizado con la expresión de *twi* en embriones tardíos), se transforma a uno típico de los segmentos abdominales. En estos mismos embriones no hay cambio en los patrones específicos de tórax generados por la epidermis. Se concluye, por tanto, que los genes homeóticos especifican de forma autónoma al menos algunos aspectos del patrón muscular (Greig y Akam 1993).

Por último, se ha empleado también el sistema de la expresión ectópica controlada por el factor de transcripción GAL4 para demostrar que no sólo los precursores de la musculatura adulta (Greig y Akam, 1993), sino también la musculatura somática de la larva, está determinada autónomamente por los genes homeóticos (Michelson 1994). En concreto, se observa que la expresión ectópica de los genes homeóticos *Ubx* o *abdominalA* en el mesodermo, lleva a la transformación del patrón de precursores musculares del tórax (monitorizado con la expresión del gen *nautilus*, ver más adelante) en uno típico de los segmentos abdominales, sin provocar alteraciones en el patrón de la cutícula o en el SNC. La única interpretación de estos datos es que estos genes homeóticos están controlando autónomamente la adquisición de un patrón muscular específico de segmento (Michelson 1994).

4.2.3 El papel de la inervación motora

Por último, una fuente de información posicional puede ser la inervación nerviosa que el músculo recibe. Existe buena evidencia experimental de que esto es así en el caso del músculo específico de macho del segmento abdominal 5 en adultos (Lawrence y Johnston, 1986; Bate, 1993a). Para su desarrollo, este músculo depende totalmente de la inervación recibida. Existen dos tipos de evidencias que lo prueban.

En primer lugar, el estudio de mosaicos por trasplante de núcleos (Lawrence y Johnston, 1986) muestra que el desarrollo de este músculo específico de macho no depende del sexo o identidad de los mioblastos o de la epidermis a la que se une. Depende del sexo y segmento de origen de los nervios que recibe. Así pues, tanto mioblastos XX como mioblastos del segmento A4, formarán un músculo específico de macho si reciben inervación de tipo A5.

En segundo lugar, la eliminación experimental de la inervación en los segmentos abdominales al final de la vida larvaria (Bate, 1993a), confirma que la formación del músculo específico de macho depende de esta inervación, aunque el resto del patrón de músculos abdominales se forma de modo normal.

Sin embargo, toda la evidencia apunta a que este no es el caso para la musculatura embrionaria. En este sentido se pueden apuntar de nuevo dos evidencias.

En primer lugar, la diferenciación muscular está relativamente adelantada cuando se establece el primer contacto entre nervios motores y sus músculos diana respectivos. Por lo tanto, los nervios motores no parecen estar implicados en la determinación del patrón muscular larvario.

En segundo lugar, se han utilizado embriones mutantes *prospero*, en los cuales la inervación de la musculatura por parte de los nervios motores periféricos se ve retrasada en gran medida, aunque no eliminada, para concluir que la inervación del músculo no participa en la formación del patrón muscular (Broadie y Bate 1993). El patrón de músculos de estos embriones se forma y mantiene de forma normal, así como el de los precursores de la musculatura adulta. Además, en estos embriones, la morfogénesis no se ve afectada (los mioblastos se fusionan de manera normal y forman sincitios y uniones con la epidermis indistinguibles de los salvajes), ni tampoco el mantenimiento o desarrollo de la fisiología de la musculatura somática embrionaria.

Así pues, no se han podido detectar diferencias significativas entre músculos desarrollados en presencia o ausencia de inervación motora, concluyéndose, por tanto, que la miogénesis ocurre independientemente de la inervación recibida en todas las etapas de su desarrollo embrionario en *Drosophila*. Otros estudios han aclarado el patrón de precursores de la musculatura adulta en embriones mutantes *daughterless (da)*, donde prácticamente todo el sistema nervioso periférico se ve eliminado (Bate y col. 1991). En embriones *da*, el patrón de mioblastos con expresión *twi* (precursores adultos) es prácticamente normal. Por lo tanto, no se requieren los nervios sensoriales, ni los motores, para la correcta disposición de los mioblastos con expresión *twi*.

Al igual que en el embrión, el desarrollo de los precursores musculares adultos es independiente de la inervación motora, tanto en *Drosophila* como en otras muchas especies de insectos. Sin embargo, contrariamente a la miogénesis embrionaria, el desarrollo y mantenimiento de estos músculos adultos depende totalmente de la inervación recibida. Una vez diferenciado el músculo, éste se mantiene sólo si es inervado. Los músculos sin inervación reducen su tamaño en distinto grado y, finalmente, degeneran por completo (Nüesch, 1985; citado en Broadie y Bate, 1993). Por lo tanto, parece que al menos algunos de los mecanismos del desarrollo muscular, y su mantenimiento en un estado diferenciado, pueden ser fundamentalmente diferentes en el desarrollo embrionario y pupal de insectos (Broadie y Bate 1993).

Como en todo proceso biológico complejo, debe considerarse la posibilidad de que estos tres mecanismos funcionen en cierta medida o en ciertos casos y, por supuesto, que exista algún nuevo mecanismo no descrito. En todo caso, la formación del patrón muscular final no es un suceso único. Depende de una serie de procesos "formadores de patrón" que tienen lugar en distintos momentos del desarrollo. Estos procesos deben integrar señales específicas de segmento suministradas por los genes homeóticos, y señales comunes a todos los segmentos (suministradas directa o indirectamente por los genes de segmentación y dorso-ventrales) (Greig y Akam 1993).

5. MUSCULATURA SOMÁTICA LARVARIA

Los músculos somáticos de la larva consisten en sincitios y la musculatura es estriada. Forman uniones con la pared del cuerpo de la futura larva en posiciones específicas y, a pesar de formar un patrón complejo, cada músculo es una unidad altamente individual que puede distinguirse de los demás por su tamaño, su forma, los lugares de unión con la epidermis y por la inervación recibida. Cada uno de los hemisegmentos abdominales A2-A7 presenta un conjunto estándar de 30 músculos (Bate 1990) mientras que el hemisegmento A1 es ligeramente distinto, y presenta un músculo específico y dos ausencias respecto del estándar. Los patrones musculares del segmento A8, telson, tórax y de los segmentos anteriores son notablemente distintos.

El conjunto de los 30 músculos por hemisegmento A1-A7 está inervado por dos nervios periféricos: el nervio intersegmentario anterior, que inerva los músculos dorsales, y el nervio segmentario posterior que inerva los músculos ventrales (Johansen 1989).

Durante la vida larvaria los músculos somáticos se hacen más grandes y aumentan su ploidía (Bate y col, 1991). Al inicio de la metamorfosis, la mayoría de los músculos larvarios se histolizan antes de la diferenciación de los músculos adultos pero algunos permanecen, bien como molde para la construcción de la musculatura definitiva, o bien para tomar parte en los movimientos de eversión de la cabeza o eclosión (Crossley 1978; citado en Bate 1993a).

5.1 Nomenclatura de los músculos

Se han realizado distintos intentos para desarrollar un sistema de nomenclatura lógico, organizado y manejable. Entre los primeros autores que realizaron trabajos en este sentido figura Crossley (1978) el cual dividía los músculos en dorsales, pleurales y ventrales. Campos Ortega y Hartenstein (1985) modificaron posteriormente este sistema de nomenclatura y lo

ampliaron a la musculatura del tórax y de los segmentos terminales. Sin embargo, en este trabajo vamos a seguir la última propuesta de nomenclatura realizada por Bate (1993a) por considerarla la más simple, lógica y objetiva.

En esta nomenclatura se tiene en cuenta la posición y la orientación de los músculos en el embrión tardío. Estos se subdividen en tres categorías principales: dorsales, laterales y ventrales. Dentro de cada una de las tres categorías los músculos pueden ser longitudinales, transversales, oblicuos o agudos, con algunas excepciones para músculos muy concretos. Los oblicuos van de la parte antero-dorsal a la postero-ventral, mientras que los agudos son los que van en el sentido contrario, es decir, de la parte posterior dorsal a la anterior ventral. Cada subcategoría (por ejemplo lateral transversal) se numera en el sentido dorsal-ventral o anterior-posterior según corresponda (Bate, 1993a).

5.2. Morfogénesis de los músculos larvarios

El patrón de músculos larvarios se completa 13 horas después de la puesta del huevo (inicio del estadio 16 de Campos Ortega y Hartenstein, 1985). El proceso, sin embargo, se inicia unas 5 horas y media antes, durante el inicio de la retracción de la banda germinal (estadio 12)(Bate, 1990).

Las señales morfológicas más tempranas que se han podido asignar a precursores musculares consisten en pequeños sincitios de dos o tres células fusionadas, en la parte más ventral del mesodermo, inmediatamente en contacto con la cara interna del SNC en desarrollo. Algo más tarde, ocurren otras fusiones celulares que, aparentemente, forman todos los precursores musculares del embrión. Estas fusiones tempranas parecen seguir un cierto orden temporal, apareciendo primero los precursores de los músculos ventrales, después los dorsales y, finalmente, los mediolaterales. De este modo, al final de la retracción de la banda germinal, cada uno de los 30 músculos larvarios está representado por un precursor sincitial en un lugar específico del mesodermo somático (Bate, 1990).

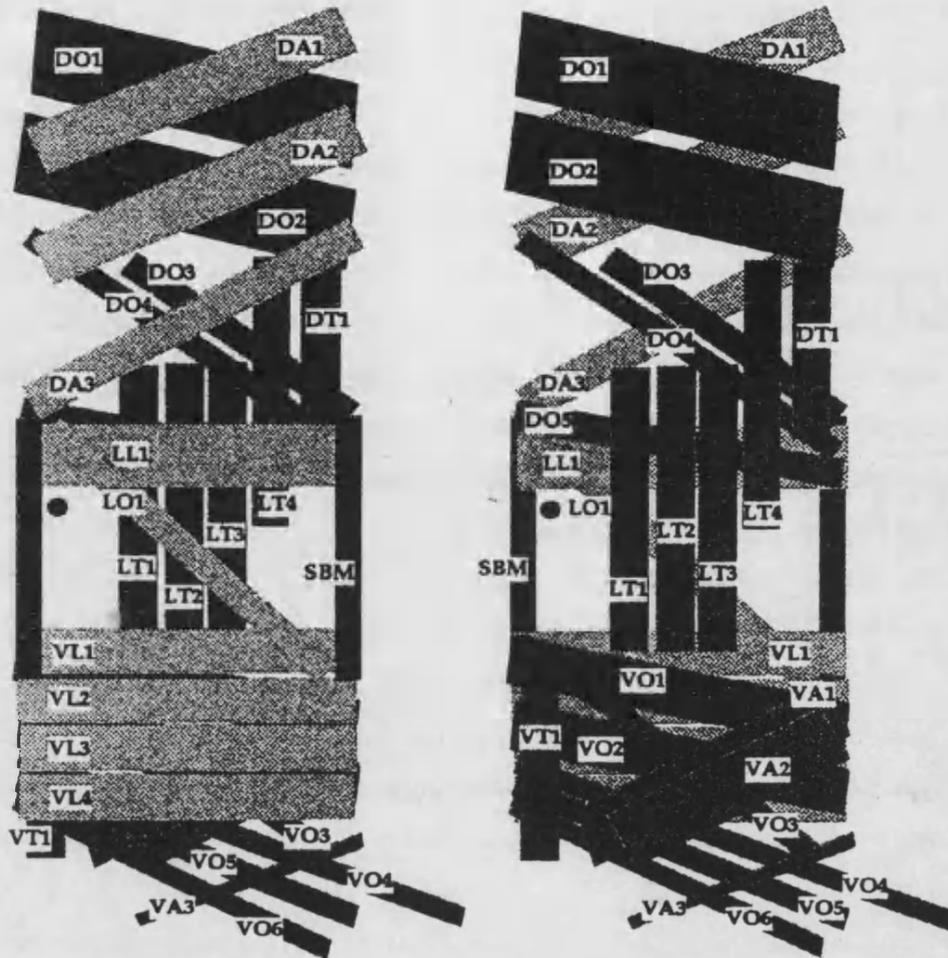


FIGURA 5-1. Esquema del patrón de musculatura larvaria para los segmentos A2-A7. Se muestra un solo hemisegmento visto desde el interior (lado izquierdo de la figura) o desde el exterior (lado derecho). Figura tomada de Bate (1993a). Se utiliza la siguiente nomenclatura:

DA1	Dorsal agudo 1	VO4	Ventral oblicuo 4
DA2	Dorsal agudo 2	VO5	Ventral oblicuo 5
DA3	Dorsal agudo 3	VO6	Ventral oblicuo 6
LL1	Lateral longitudinal 1	DT1	Dorsal transversal 1
LO1	Lateral oblicuo 1	DO4	Dorsal oblicuo 4
VL1	Ventral longitudinal 1	DO5	Dorsal oblicuo 5
VL2	Ventral longitudinal 2	LT1	Lateral transversal 1
VL3	Ventral longitudinal 3	LT2	Lateral transversal 2
VL4	Ventral longitudinal 4	LT3	Lateral transversal 3
SBM	Músculo del límite del segmento	LT4	Lateral transversal 4
DO1	Dorsal oblicuo 1	VT1	Ventral transversal 1
DO2	Dorsal oblicuo 2	VA1	Ventral agudo 1
DO3	Dorsal oblicuo 3	VA2	Ventral agudo 2
VO1	Ventral oblicuo 1	VA3	Ventral agudo 3
VO2	Ventral oblicuo 2	VO2	Ventral oblicuo 2
VO3	Ventral oblicuo 3		

Cada uno de estos sincitios aumenta de tamaño por fusión con mioblastos cercanos "competentes" para la fusión, y no se produce división nuclear o replicación del DNA en ellos. Se ha podido demostrar que el tamaño del músculo está directamente correlacionado con el número de núcleos presentes en él. Los mayores presentan de 20 a 25 núcleos, mientras que los más pequeños pueden contener tan sólo 3-4. Como el tamaño del músculo lo determina el número de mioblastos con los que se fusiona su precursor, los músculos más grandes son también los últimos en completarse, pero el número de núcleos fusionados en un mismo músculo varía, y debe haber algún mecanismo que controle el tamaño final de éstos que no sea el asignar grupos cerrados de mioblastos a cada precursor (Bate, 1990).

A partir, básicamente, de observaciones morfológicas del tipo anterior, se ha propuesto una hipótesis de cuál puede ser el curso de los acontecimientos en la morfogénesis muscular (Bate, 1990). Esta hipótesis se basa en el concepto de las células musculares fundadoras, o pioneras, descritas en el saltamontes (revisado en Jellies, 1990). En este insecto se pueden identificar células mesodérmicas individuales ancladas a los lugares del ectodermo donde se insertarán posteriormente los fascículos musculares. Estas células pioneras sirven como centros organizadores para otras células mesodérmicas, de menor tamaño, que se agrupan alrededor y, posteriormente, se fusionan con la pionera para formar un músculo en particular. Los músculos no pueden formarse solamente a partir de células mesodérmicas cuando la célula pionera ha sido eliminada.

Igualmente, en el desarrollo embrionario de los músculos larvarios en *Drosophila*, puede haber células fundadoras para músculos individuales equivalentes a las células pioneras del saltamontes. La evidencia morfológica citada anteriormente demuestra que cada uno de los futuros músculos larvarios está predibujado por un precursor sincitial en el patrón muscular en el embrión en retracción de banda germinal (Bate, 1990). Estos precursores parecen originarse a partir de dos o tres células mesodérmicas fusionadas, las cuales, a su vez, se cree que proceden de una sola, la célula fundadora. Aunque estas células no pueden distinguirse morfológicamente de las demás en *Drosophila*, el patrón de expresión de algunos genes (como *nautilus*, ver apartado 5.3.2) sugiere fuertemente su existencia (ver la figura 5-2)

Así pues, la disposición altamente organizada de los músculos se debe, probablemente, a la determinación de una o unas pocas células "fundadoras", según un patrón espacial (concreto para cada segmento del cuerpo del animal al que, posteriormente, irán fusionándose mioblastos que han adquirido capacidad para formar músculos (Bate, 1990). La alternativa a esta hipótesis, el que toda la información posicional necesaria para la correcta disposición de todos los

músculos en cada segmento sea suministrada a grupos de células que posteriormente formarán el músculo completo, no cuenta con evidencia experimental.

Resulta interesante destacar que, contrariamente a lo descrito para otros insectos (como el embrión de saltamontes), no existe evidencia de que la muerte celular programada esté implicada en la formación del patrón muscular en *Drosophila* (Bate, 1990).

Por último, la morfogénesis muscular larvaria termina con el establecimiento y mantenimiento de los anclajes entre los músculos y la epidermis, así como el establecimiento de las uniones neuromusculares. No vamos a entrar en detalle en estos dos procesos. Sólo destacar que en el primero de ellos, entre otras, participan proteínas de la matriz extracelular. Una de las identificadas más recientemente es *masquerade* (Murugasu-Oei y col. 1995). En cuanto al segundo proceso, recientemente se han identificado varios genes que controlan el establecimiento de estas uniones neuromusculares. En resumen, el proceso está controlado genéticamente y parece tener lugar en varios pasos: en primer lugar las motoneuronas son guiadas hacia el lugar correcto del mesodermo, posteriormente entran en un dominio en particular de músculos y, finalmente, reconocen su músculo diana de entre los de su dominio (Van Vactor y col. 1993).

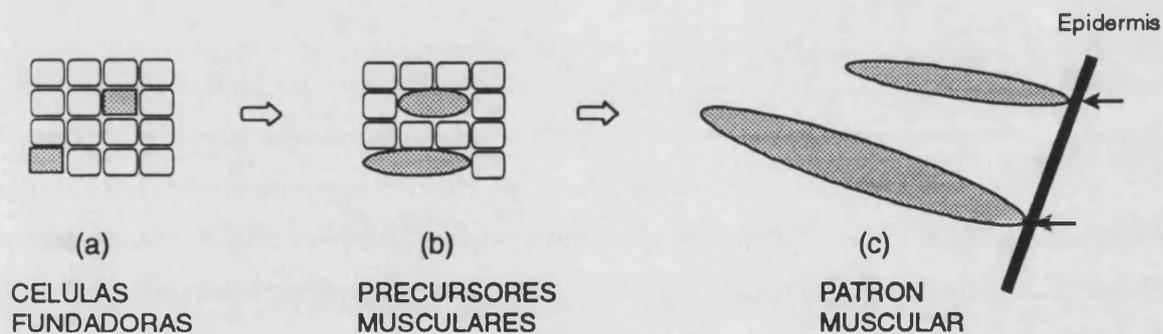


FIGURA 5-2. Representación esquemática de la hipótesis de la célula fundadora. Esta hipótesis propone que en el mesodermo se especifica una célula fundadora para cada músculo en particular (a). Esta célula, y las que se fusionan con ella para dar los precursores musculares (los sincitios representados en b), inician un programa de diferenciación muscular característico. Finalmente, la fusión con más mioblastos y la diferenciación terminal de estos precursores determina el patrón muscular larvario definitivo, representado en (c). Nótese que otro de los aspectos que debe especificarse en el patrón muscular son los puntos de anclaje sobre la epidermis (señalados con flechas en c).

5.3 Especificación genética de los músculos larvarios

La musculatura somática larvaria es muy uniforme en cuanto a sus características fisiológicas y estructurales. Sin embargo, a pesar de estas semejanzas, cada músculo larvario es distinto de los demás por su tamaño y forma característicos, su inervación y su lugar de anclaje

sobre la epidermis. Por lo tanto, aunque los genes específicos de músculo para los distintos elementos del aparato contráctil común se van a expresar en todos los músculos, deben existir otros genes que se activen en subconjuntos de los músculos en formación, y que regulen las características diferenciales de cada músculo tal como este se diferencia. Se espera, pues, un control local sobre el número de mioblastos que se van a fusionar a un determinado precursor muscular (control del tamaño y forma del músculo), un mecanismo regulador que permita a cada músculo identificar los lugares de inserción epidérmicos apropiados (control de los lugares de anclaje; ver el apartado 4.2.1) y una diversificación de las moléculas de superficie que permita a las neuronas motoras en crecimiento seleccionar entre distintos músculos diana (control de la innervación recibida).

Se espera de tales genes que codifiquen para factores de transcripción que actúen, en coordinación con los genes homeóticos, en la formación de los patrones musculares específicos de cada segmento. Hasta el momento, se han descrito tres genes, *S59* (Dohrmann y col. 1990), *nautilus* (*nau* o *Dmyd*) (Michelson y col. 1990; Paterson y col. 1991) y *apterous* (*ap*) (Bourgouin y col. 1992; citado en Bate, 1993a; Cohen y col. 1992) que codifican para factores de transcripción, y que se expresan en un subconjunto de los músculos en formación. De hecho, estos genes parecen ser los mediadores de la identidad de segmento que confieren los genes homeóticos sobre el patrón muscular (Michelson 1994).

Además de los genes mencionados anteriormente, existen otros de los que sólo se conoce bien su expresión en músculo (o sus precursores) o bien un cierto fenotipo muscular. Se trata de *eve* (Frasch y col. 1987), *gooseberry neuro* (Gutjahr y col. 1993), *Krüppel* (Gaul y col. 1987), *runt* (Kania y col. 1990), *vestigial* (Williams y col. 1991), *tinman* (Bodmer 1993; Azpiazu y Frasch 1993), *zfh-1* (Lai y col. 1993). Los trataremos colectivamente al final de este apartado.

5.3.1 El gen *S59*

Este gen codifica para un factor de transcripción con homeodominio. Su patrón de expresión definitivo afecta a sólo tres músculos de entre los 30 que forman cada hemisegmento abdominal, el ventral agudo 2 (VA2), el ventral transversal 1 (VT1) y el dorsal transversal 1 (DT1). Inicialmente (estadio 11), *S59* empieza a transcribirse en una sola célula mesodérmica situada posteriormente a la banda ectodérmica de expresión de *en*. Por división celular (estadio 11 tardío), esta célula da lugar a dos, una de las cuales migra al segmento anterior, donde contribuye al músculo LO1 (y rápidamente deja de transcribir *S59*), mientras que la otra se fusiona con células vecinas para dar lugar al precursor del músculo VT1. Durante la división de

la célula inicial, aparece otro grupo de 4 células por segmento, ventrales y anteriores a la banda de expresión de *en*. Por fusión con células vecinas formarán el precursor del músculo VA2. Por último, durante la retracción de la banda germinal (estadio 12) aparecen otras dos células en el mesodermo con expresión *S59*, en posición anterior y dorso-lateral a la banda de expresión de *en*. Se trata de las precursoras del músculo DT1. En todos los casos, los núcleos de los mioblastos que van fusionándose a los precursores que expresan *S59* empiezan, también, a transcribir *S59* (Dohrmann y col. 1990; revisado en Bate, 1993a).

El comportamiento de las células con expresión del gen *S59* depende del segmento en el que se encuentren. Por ejemplo, la primera señal de *S59* es la misma para todos los segmentos abdominales, sin embargo, aunque se forma un precursor de músculo VT1 en el segmento A1, este músculo no llega a formarse en este segmento abdominal (Bate, 1993a).

5.3.2. El gen *nautilus*

nautilus es el homólogo en *Drosophila* de los genes de vertebrados de la familia de *MyoD* (Paterson y col. 1991; Michelson y col. 1990; para una revisión de la regulación y funcionamiento de estos factores de transcripción ver Latchman, 1991). Los miembros de esta familia de proteínas presentan la propiedad de transformar un gran número de tipos celulares diferentes en músculo cuando se expresan mediante un promotor constitutivo (Weintraub, 1993). Todas ellas se caracterizan por poseer un dominio altamente básico inmediatamente adyacente a una región que se ha postulado que forma una estructura en hélice-lazo-hélice (Latchman, 1991).

nau codifica para una proteína de 322 aminoácidos, con un 82% de identidad respecto a *MyoD* en los 41 aminoácidos del dominio hélice-lazo-hélice, y un 100% de identidad en los 13 aminoácidos del dominio básico (Paterson 1991). Precisamente en este dominio básico se ha propuesto que se localiza el código de reconocimiento para la activación de genes específicos de músculo (Latchman, 1991).

Su patrón de expresión es complejo y dinámico (Michelson y col. 1990; Michelson, 1994). En embriones en estadio 11 tardío, *nau* se expresa en una sola célula mesodérmica, ventral, a cada lado de la línea media embrionaria. Durante la retracción de la banda germinal, nuevas células empiezan a expresar *nau* dorsal, ventral y lateralmente, pero siguiendo un patrón específico de segmento: los precursores de los músculos ventrales y dorso-laterales transcriben *nau* en los segmentos abdominales, mientras que en la musculatura torácica la expresión es

principalmente dorsal-lateral. Simultáneamente, la expresión inicial en las células cercanas a la línea media desaparece.

Lo interesante de este patrón de expresión es que, con la posible excepción de las primeras células que expresan *nau*, todas las demás corresponden exclusivamente a precursores de músculos. No hay expresión en otras hojas embrionarias ni en el mesodermo visceral (Michelson y col. 1990).

El patrón de expresión de *nau* (el inicio de su expresión precede y coincide con la aparición de los sincitios precursores de cada músculo), así como su homología con *MyoD*, sugieren que tiene un papel decisivo en la miogénesis de las células en las que es activado (Bate, 1993a). Además, los transcritos de *nau* están presentes a lo largo de toda la diferenciación muscular embrionaria en niveles altos, se reducen mucho durante la vida larvaria, pero vuelven a niveles altos en la pupa, donde se expresan siguiendo un patrón temporal y espacial que coincide con la miogénesis adulta (Michelson y col. 1990; Bate, 1993a).

La especificidad de segmento del patrón de expresión de *nau* sugiere que está regulado, directa o indirectamente, por los genes homeóticos. Por ejemplo, de modo reproducible, la expresión de *nau* en los precursores del músculo VA1 es menor en el segmento A1 que en los segmentos posteriores (Michelson y col. 1990) y el patrón de expresión es claramente distinto en el tórax y en el abdomen. Esta posibilidad se ha aclarado estudiando el efecto sobre el patrón de expresión de *nau*, tanto de las mutaciones por ausencia de función como por ganancia, de *Ubx* y *abdA* (Michelson, 1994).

En embriones deficientes para todo el complejo Bithorax, el patrón de expresión *nau* en el abdomen se transforma en uno torácico. En mutantes *Ubx*^{9.22}, la expresión ventral de *nau* se pierde en los segmentos A1-A3 (transformación a patrón de tipo torácico) y exactamente la misma transformación se observa en mutantes *abdA* (Michelson, 1994). En cambio, la activación por choque térmico de *Ubx* transforma el patrón torácico de expresión *nau* en el abdominal (Bate, 1993a). La expresión ectópica, controlada con el factor de transcripción GAL4, de *Ubx* o *abdA* en el mesodermo provoca el mismo fenotipo, transformación del patrón torácico en uno abdominal (Michelson, 1994). Estas observaciones demuestran una regulación de la transcripción de *nau* por parte de los genes homeóticos *Ubx* y *abdA*, y concuerdan, perfectamente, con la idea de que las transformaciones homeóticas están fuera de registro en el ectodermo y en el mesodermo (Hooper, 1986).

Así pues, los patrones de expresión específicos de segmento de genes como *nau*, parecen indicar una regulación por los niveles de expresión de los genes homeóticos en las células mesodérmicas y, por lo tanto, una especificación autónoma en la diferenciación de los distintos

tipos celulares mesodérmicos. A este respecto, una posibilidad es que *nau* sea un gen diana directo de los genes homeóticos, que serían los que realmente controlarían la especificación de las diferencias de patrón muscular entre segmentos (Michelson, 1994).

5.3.3 El gen *apterous*:

apterous (*ap*) codifica para una proteína con un dominio LIM, es decir, una homeobox y un dominio rico en cisteína/histidina (Cohen y col. 1992). Su expresión se inicia en embriones en extensión de la banda germinal y sus transcritos siguen, inicialmente, un patrón de expresión metamérico, consistente en grupos de 16-18 células situadas dorsolateral y ventrolateralmente (Bourgouin y col. 1992; citado en Bate 1993a; Cohen y col. 1992). Durante la retracción de la banda germinal, estos grupos de células son reemplazados por otros grupos más pequeños que, aparentemente, representan los precursores de músculos individuales. Su expresión desaparece hacia las 11 horas de desarrollo (estadio 14), pero se ha podido averiguar, mediante una cepa de trampa de los enhancer que presenta el mismo patrón de expresión que *ap*, que los músculos LT1-4 y VA2-3 corresponden a los precursores arriba mencionados (Bourgouin y col. 1992; citado en Bate, 1993a).

El papel de este gen en la determinación genética de estos músculos lo demuestra el fenotipo de sus mutantes de pérdida de función y la expresión ectópica. Los embriones mutantes para *ap* muestran una pérdida variable de uno o más músculos laterales transversales en algunos segmentos, así como la pérdida ocasional de VA3. La expresión ectópica de *ap*, mediante su expresión controlada por un promotor de choque térmico, provoca la formación de músculos adicionales en la región normalmente ocupada por los músculos laterales transversales (Bourgouin y col. 1992; citado en Bate, 1993a).

Sin embargo, la especificación de músculo no es la única función de *ap*. Los mutantes nulos para este gen muestran que también se requiere para el desarrollo normal de los discos imaginales de ala y halterio. Además, su patrón de expresión embrionario incluye porciones del SNP y del SNC (Cohen y col. 1992; Blair y col. 1994).

5.3.4. Otros genes presuntamente implicados en la especificación del patrón muscular

Se ha observado, en embriones mutantes para el gen *tin*, que todos los músculos dorsales aparecen aumentados y desorganizados, así como la existencia de algunos defectos en las regiones más ventrales. En particular, los músculos LL1, LO1, VL3, VL4 y VT1 están ausentes y

muchos otros están dispuestos de manera anormal, o su forma no es la salvaje. Se ha podido aclarar si *tin* afecta a la especificación de las células fundadoras de los músculos afectados en sus mutantes, o bien si participa posteriormente en la miogénesis, estudiando la expresión del gen *S59* (ver el apartado 5.3.1.). En el estadio 11 tardío, *S59* marca la célula fundadora común de los músculos LO1 y VT1 y las del VA2. En mutantes *tin*, en el estadio 11 sólo pueden detectarse las células fundadoras del músculo VA2, y no las comunes para los músculos LO1 y VT1. Los mismos resultados se obtienen con anticuerpos anti *S59* en embriones ligeramente más tardíos (estadio 12). Estos resultados sugieren fuertemente que *tin* está implicado en la especificación de células fundadoras musculares concretas y no en la miogénesis posterior (Azpiazu y Frasch, 1993).

Los resultados son menos claros en el caso del gen *zfh-1*. Este gen codifica para una proteína con nueve motivos de "dedos de zinc" y un homeodominio (Fortini y col. 1991), y su patrón de expresión, además de depender de *twi* y *sna*, sugiere que puede tener alguna función en el desarrollo del mesodermo. Centrándonos en la musculatura somática, los mutantes obtenidos en este locus (Lai y col. 1993) muestran una amplia variedad de errores en el patrón muscular, especialmente en los músculos dorsales y ventrales-oblicuos. Estos últimos se ven, normalmente, reducidos a un único músculo, mientras los ventrales longitudinales y laterales están presentes en el patrón, aunque su aspecto no es normal. Otros errores detectados consisten en músculos situados en lugares equivocados del patrón muscular y una disposición desorganizada de los núcleos celulares dentro del músculo.

Para determinar si se trata de un error en la especificación de los precursores musculares, o un error en el transcurso posterior de la miogénesis, se ha estudiado la expresión del gen *S59* en mutantes *zfh-1* de modo semejante al caso del gen *tin*. Los embriones mutantes para *zfh-1* muestran, de nuevo, gran variedad de errores en la especificación de precursores musculares (bien no aparece el precursor, o lo hace en un lugar equivocado, o con demasiadas/pocas células). El mismo resultado se obtiene viendo el patrón de precursores de la musculatura adulta: pérdida de precursores, ganancia o posicionamiento erróneo. Así pues, *zfh-1* no parece ser requerido para la diferenciación de la musculatura somática (pues de hecho aparecen músculos) sino más bien para determinar los destinos celulares dentro del mesodermo (como sugieren los errores en la aparición de los precursores detectados con *S59*) y el posicionamiento de estos precursores.

gooseberry está, en principio, implicado en la especificación de la polaridad de los segmentos, pero también es necesario para la especificación correcta de destino neural en el SNC y, a juzgar por su patrón de expresión, probablemente en el mesodermo (Gutjahr y col.

1993). Este locus codifica para dos transcritos, *gooseberry (gsb)* y *gooseberry neuro (gsbn)*, con una elevada homología de secuencia tanto entre sí como con el gen de la regla par *patched*. Durante la expresión inicial de la proteína *gsb* (estadio 5), presenta un patrón típico de los genes de polaridad de los segmentos en la epidermis, y no se detecta en el mesodermo. La primera señal en esta capa embrionaria se observa a partir de la mitad del estadio de extensión de banda germinal, y permanece hasta el final de la retracción de la misma. En este estadio presenta su máxima expresión en el mesodermo, que consiste en tres grupos de células en los segmentos torácicos. Posteriormente, estos grupos parecen fusionarse en uno sólo, hasta que, finalmente, desaparecen durante la involución de la cabeza. Respecto a *gsbn*, después de la retracción de la banda germinal se inicia su expresión en unas pocas células laterales por hemisegmento, que no han sido asignadas con certeza. Podría tratarse de células fundadoras de músculo o células del SNP. Por último, también se ha detectado *gsbn* en una banda mesodérmica aislada en el segmento T2, y en los núcleos de uno de los músculos ventrales oblicuos. Así pues, no está aclarado el papel del locus *gsb* en la determinación de los músculos larvarios, pero su patrón de expresión sugiere que puede realizar alguna función en la especificación de músculo (Gutjahr y col. 1993).

También *Krüppel* parece ser necesario para otros procesos en el desarrollo, además de su conocida función en la segmentación del embrión. En concreto, se ha detectado proteína Kr durante la retracción de la banda germinal y, posteriormente, en el sistema nervioso en desarrollo, en la amnioserosa y en algunas células precursoras de músculos laterales (Gaul y col. 1987). Sin embargo, de nuevo, es necesario aclarar el significado de estos patrones de expresión mediante el estudio de mutantes, pues es perfectamente posible que los mecanismos que se han desarrollado para asegurar la expresión génica correcta en una parte en particular del embrión, resulten en una expresión completamente irrelevante en otro tejido embrionario (Gurdon, 1992).

Por último, el gen *vestigial (vg)* codifica para una proteína nuclear (Williams y col. 1991) que, como el gen *S59*, se expresa en un subconjunto de los músculos larvarios, así como en el SNC en desarrollo. *vg* también se expresa, previamente a la retracción de la banda germinal, en pequeños grupos de células mesodérmicas, que parecen actuar como células fundadoras. De hecho, en el estadio 11 tardío puede observarse una disposición regular de pequeños grupos de células con expresión *vg* en la cara interna del SNC, los cuales se desarrollarán, posteriormente, en los músculos ventrales longitudinales, que también expresan el gen *vg* (Bate, 1993b).

5.4. Papel de los genes neurogénicos en la especificación de las células fundadoras.

Varios autores, entre ellos Bate (1990) y Weintraub (1993), han señalado la existencia de una clara analogía, al menos formal, entre la especificación de los precursores musculares, es decir, de las células fundadoras de cada músculo, y la especificación de los neuroblastos en el epitelio neurogénico, aunque en el primer caso las células se fusionan en vez de dividirse.

De hecho, todos los genes neurogénicos se expresan en el mesodermo durante la embriogénesis (Bate, 1993b), y el fenotipo mutante característico por pérdida de función de cualquier gen neurogénico es un embrión al que le falta toda o parte de la epidermis ventral, la cual está reemplazada por un SNC mayor de lo normal (hipertrofia neural). El SNP también incrementa de tamaño y hay un fenotipo mesodérmico drástico (por ejemplo en *Notch*), que consiste en una desorganización generalizada de los músculos, el corazón, el cuerpo graso y las gónadas. Al parecer, la fusión de los mioblastos falla, y al final de la embriogénesis, los músculos consisten en células ahusadas por debajo de la epidermis dorsal y ventral. Este fenotipo mesodérmico, o una variante de él, es común a todos los mutantes neurogénicos e implica la existencia de serios problemas en los sucesos más tempranos de la formación de los músculos.

El papel de los genes neurogénicos en la determinación de los destinos celulares en el mesodermo también se ha puesto de manifiesto estudiando el patrón de expresión de varios genes específicos de músculo en mutantes neurogénicos. Por ejemplo, el número de células embrionarias que expresan el gen *nau* es mucho mayor en cada uno de los siguientes mutantes neurogénicos: *Notch*, *Delta*, *Enhancer of split*, *big brain*, *mastermind*, *neuralized* y *almondex*. Esto ocurre, al parecer, a expensas de células mesodérmicas vecinas, que normalmente no expresan *nau* (Corbin y col. 1991).

Estos defectos en el mesodermo no parecen ser sólo un reflejo de la hipertrofia neural de estos mutantes, pues en varias combinaciones de mutantes proneurales con *Notch* (en los que la hipertrofia neural se suprime parcialmente) la superproducción de células que expresan *nau* es idéntica a la producida en mutantes *Notch*. Estos resultados sugieren que la excesiva producción de células con expresión *nau* en mutantes neurogénicos, es independiente del nivel de neurogénesis. Además, todos los mutantes neurogénicos anteriores (*Notch*, *Delta*, *Enhancer of split*, *big brain*, *mastermind*, *neuralized* y *almondex*) se expresan en el mesodermo antes de las primeras señales de diferenciación celular y, para algunos de ellos, se ha descrito que funcionan autónomamente durante el control de la diferenciación del ectodermo, pudiendo actuar igualmente de modo autónomo en el mesodermo (Corbin y col. 1991). Finalmente, se han

detectado defectos en la fusión de mioblastos en cultivos celulares derivados de embriones *Notch* (Cross y Sang, 1978; citado en Corbin y col. 1991).

Los grupos de células que expresan *nau* se encuentran, normalmente, sólo en la capa más externa de células mesodérmicas. Sin embargo, en muchos de los mutantes neurogénicos arriba mencionados, los grupos de células con expresión *nau* alcanzan capas más profundas de mesodermo que tienen, por tanto, capacidad para expresar *nau*. Este resultado sugiere que los genes neurogénicos pueden, realmente, impedir que ciertos grupos de células segreguen como células con expresión *nau*, igual como son necesarios para impedir que ciertos grupos de células ectodérmicas se diferencien como neuroblastos. De hecho, la organización del mesodermo visceral es defectuosa en mutantes neurogénicos severos y estos genes parecen ser esenciales tanto en la organización del mesodermo somático como del visceral (Corbin y col. 1991).

En un estudio semejante, Bate y col. (1993b) han demostrado que las mutaciones en los genes neurogénicos *Notch*, *Delta*, *Enhancer of split*, *big brain*, *mastermind* y *neuralized* conducen a una expansión de los dominios de expresión de los genes *S59* y *vg* en el mesodermo y producen fuertes anomalías en el patrón normal de músculos, así como en su diferenciación. Estos fenotipos mutantes parecen, pues, reflejar dos requerimientos distintos de los genes neurogénicos durante la miogénesis: el primero para la segregación correcta de las células fundadoras y el segundo para la diferenciación correcta de las fibras musculares, es decir la formación de los sincitios (Bate y col. 1993b).

A pesar de esta evidencia experimental, todavía no se conoce cual es el mecanismo por el cual los genes neurogénicos actúan en el mesodermo en desarrollo.

6. DIFERENCIACIÓN TERMINAL: REGULADORES DE LA MIOGÉNESIS

Recientemente se han descrito varios genes en *Drosophila* cuya función es la regulación de la miogénesis más que la especificación del patrón espacial de la musculatura. Es decir, están implicados en la activación del conjunto específico de genes necesarios para la diferenciación muscular terminal, una vez las células ya han sido determinadas a un destino miogénico.

Uno de estos genes es el homólogo en *Drosophila* de una proteína muscular con un dominio de dedo de zinc tipo LIM, previamente identificada en ratas. Esta proteína, *D-MLP*, de 92 aminoácidos de longitud, se caracteriza por poseer dos dominios de este tipo especial de dedo de zinc (los dominios tipo LIM ricos en Gly). Su patrón de expresión embrionario se restringe al mesodermo visceral y somático desde el inicio del estadio 13 hasta el final de la embriogénesis, cuando se acumula fuertemente en toda la musculatura somática. No se detecta en el ectodermo, endodermo ni en el SNC (Arber y col. 1994).

Existen varios hechos que sugieren fuertemente que la proteína D-MLP puede ser un regulador de la miogénesis, es decir, que active la transcripción de los genes específicos de este programa de desarrollo. En primer lugar está el hecho de que esta proteína se acumula en los músculos somáticos en el momento en el que éstos inician su diferenciación miogénica (estadio 13). En segundo lugar, en un sistema in vitro potencia la diferenciación miogénica de mioblastos de rata (Arber y col. 1994).

Estudiando el comportamiento de la proteína MLP de rata en un sistema in vitro de mioblastos C2 de esta especie, parece claro que esta proteína ejerce cierto efecto sobre el ciclo celular de los mioblastos. En concreto, en ausencia de proteína MLP los mioblastos no salen del ciclo celular y no se diferencian bien, mientras que una sobreexpresión de la proteína conduce a que los mioblastos sean menos sensibles al factor de crecimiento TGF β , y a que se potencie la diferenciación miogénica (Arber y col. 1994).

Este efecto sobre el ciclo celular es razonable, pues una etapa previa a la entrada en los programas de diferenciación terminales es, precisamente, la salida del ciclo celular, y este también es el caso para la miogénesis (Buckingham, 1994). Un ejemplo semejante es la proteína del gen *puckered*, para el cual se ha propuesto que su función es la de integrar señales posicionales externas, y regular la salida de ciclo celular y entrada en un programa de diferenciación concreto en la epidermis de la larva (Ring y Martínez Arias, 1993; Martínez Arias, com. pers.). Del mismo modo, las proteínas MLP podrían, pues, ejercer una función doble durante la diferenciación muscular. Por una parte integrar información posicional para lanzar un mioblasto hacia su diferenciación completa y, por otra, controlar la salida de ciclo celular, paso previo a esa diferenciación.

Otro gen implicado en la diferenciación muscular en *Drosophila* es *D-MEF2*, una proteína caracterizada por la presencia de un dominio MADS, y que ha sido identificada a partir de sus homólogos en vertebrados (Lilly y col. 1994; Lilly y col. 1995). Los miembros de esta familia de genes *MEF2* son factores de transcripción que se unen a secuencias de DNA ricas en adenina-timina, asociadas a genes específicos de músculo.

El patrón de expresión de *D-MEF2* durante la embriogénesis está fuertemente ligado a los tres tipos de mesodermo miogénico, es decir, el mesodermo somático, el visceral y el cardiaco (Lilly y col. 1995; Bour y col. 1995). La proteína ya es detectable durante el inicio de la gastrulación y, progresivamente, se va restringiendo a la musculatura somática, visceral y cardiaca. De hecho, en estadios tardíos de la embriogénesis todas las células de los tres tipos de linajes mesodérmicos expresan *D-MEF2*.

Además, en embriones homocigóticos para un alelo nulo de *D-MEF2*, las células musculares somáticas, viscerales y cardíacas no se diferencian correctamente y no expresan genes estructurales específicos de músculo, aunque los mioblastos fundadores de los mismos se especifican y posicionan correctamente en el patrón de músculos larvarios. Esta última afirmación se basa en que la expresión de determinados genes marcadores del patrón muscular (como *S59*, *nau* y *ap*) no cambia en un mutante nulo *D-MEF2* (ver figura 4 de Lilly y col. 1995; Bour y col. 1995).

Este resultado con un alelo nulo de *D-MEF2*, el hecho de que en las regiones que controlan muchos genes específicos de músculo existan sitios de unión para la proteína *D-MEF2*, y que su patrón de expresión embrionario esté restringido a los linajes musculares, demuestran que los tres tipos de células musculares (somáticas, viscerales y cardíacas) comparten al menos parte del programa de diferenciación miogénica. Además, estas observaciones permiten proponer que *D-MEF2* (y por extensión los homólogos de *D-MEF2* en otros organismos) está implicado en la activación directa de los genes específicos de músculo durante la diferenciación de estos distintos tipos de células musculares (Lilly y col. 1995; Bour y col. 1995).

Por último, se ha demostrado que también los genes neurogénicos participan en la regulación de la diferenciación miogénica tanto en *Drosophila* (Bate y col. 1993b; ver apartado anterior), como en vertebrados (Kopan y col. 1994). En este último caso, se ha observado que la porción intracelular del homólogo de ratón de la proteína Notch actúa como represor constitutivo de la miogénesis, probablemente mediante la interacción con un factor, no identificado, y que a su vez necesita la proteína MyoD para poder activar los genes específicos de la diferenciación miogénica (Kopan y col. 1994).

Aunque se conocen algunos genes implicados tanto en el control de la especificación de los músculos (apartado 5.3), como en su diferenciación terminal (este apartado), no se dispone de mucha información sobre las relaciones de regulación entre estos genes y cómo se integran en la jerarquía de genes que controlan el desarrollo. Se ha estudiado el efecto de las mutaciones en estos genes y se ha llegado al siguiente esquema, muy preliminar, de relaciones de regulación (Buckingham, 1994). En él se resalta, por ejemplo, que los mutantes nulos *D-MEF* no desarrollan mesodermo somático, ni visceral, ni cardíaco, y que *nau* y *D-MEF2* parecen estar activados independientemente, pues las mutaciones en uno de ellos no tienen efecto sobre el patrón de expresión del otro (Bour y col. 1995). Por otro lado, es muy probable que *nau* sea una diana directa de *Ubx* (Michelson, 1994), como ya hemos indicado anteriormente.

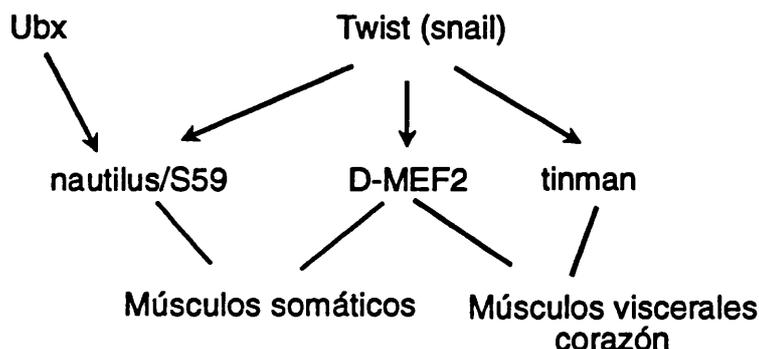


FIGURA 6-1. Jerarquía de regulaciones de genes que afectan a la miogénesis de *Drosophila*.

Por último, tal como ya hemos comentado previamente, debe destacarse que una etapa crítica en el proceso de la miogénesis es la salida de las células del ciclo celular como paso previo a su diferenciación terminal. No es sorprendente, por tanto, que exista cierta interrelación entre las rutas de transducción de señales que controlan el ciclo celular y los reguladores transcripcionales de la miogénesis. De hecho, existen al menos tres líneas de evidencia en este sentido (Buckingham, 1994). En primer lugar, la proteína retinoblastoma, implicada en la regulación del ciclo celular, interacciona, en sistemas vertebrados, con los factores de transcripción MyoD y MEF2. Por otra parte, se consigue la reentrada en ciclo celular, incluso en miotubos ya diferenciados, cuando determinadas proteínas víricas compiten con MyoD en la unión con la proteína retinoblastoma. En segundo lugar, las proteínas de la familia de MyoD, pueden ser fosforiladas por determinadas quinasas, y esto afecta a su actividad. Por último, la proteína Id, que actúa formando heterodímeros inactivos con MyoD, es capaz de responder a una ruta de quinasas recientemente identificada (Buckingham, 1994).

7. ESPECIFICACIÓN GENÉTICA DE LOS DESTINOS CELULARES EN EL OJO

Introducimos en este punto un apartado en el que se resumen los principales acontecimientos que tienen lugar durante la especificación de las células de los omatidios, pues existen evidencias genéticas y moleculares de que el gen PP2 tiene alguna función en el desarrollo del ojo (datos de Gerrit Begemann, EMBL, Heidelberg). De este modo, se pueden colocar en el contexto adecuado los aspectos que se tratarán sobre este tema en los apartados de Resultados y Discusión.

7.1. Sinopsis de la estructura del ojo y su desarrollo

El ojo compuesto de *Drosophila* está formado por 800 omatidios aproximadamente, cada uno de ellos compuesto por ocho células fotorreceptoras, que pueden ser bien internas (R7 y R8) o bien externas (R1-R6) y 12 células accesorias. A pesar de su semejanza, las células fotorreceptoras se han agrupado en tres clases funcionales en base a su morfología, patrón de proyecciones axonales y sensibilidad espectral. Estas tres clases son R1-R6, R7 y R8. Cada grupo de 8 células fotorreceptoras está rodeado por células pigmentadas que aíslan ópticamente a la unidad (Dickson y Hafen, 1993).

El ojo se desarrolla a partir de un epitelio indiferenciado en monocapa (el disco imaginal de ojo-antena) durante el tercer estadio larvario y primeros estadios de pupa. Este desarrollo se inicia cuando una invaginación del epitelio, llamada surco morfogenético, inicia su movimiento a través del disco imaginal desde el extremo posterior hacia el extremo anterior del mismo (Dickson y Hafen, 1993). Detrás de este surco se ensamblan los omatidios en un proceso secuencial basado en señales inductivas a partir de las células predecesoras, ya en vías de diferenciación, y no en base a relaciones de linaje celular (Wassarman y col. 1995; Dickson y Hafen, 1993). El proceso se inicia con la determinación de las células R8, una de cada 7 células aproximadamente, mientras que las siguientes células del omatidio se integran, posteriormente, en una secuencia fija basada en interacciones celulares (Dickson y Hafen, 1993).

Tras la determinación del fotorreceptor R8 las siguientes seis células fotorreceptoras se añaden en parejas. En primer lugar R2 y R5, después R3 y R4 y, finalmente, R1 y R6 (ver la figura 7-1). Las células accesorias se determinan después de la última célula precursora de un fotorreceptor: la neurona R7. El proceso completo dura aproximadamente 4 días y se ha comprobado que el reclutamiento de células es altamente reproducible, de modo que se pueden identificar tipos celulares individuales en base a su posición en el omatidio en crecimiento y a su morfología. Después de la determinación, las células fotorreceptoras en desarrollo emiten sus axones y expresan antígenos específicos de su tipo celular y de tipo neural. Finalmente, las células indiferenciadas sobrantes son eliminadas mediante muerte celular programada (Dickson y Hafen, 1993; Moses, 1991).

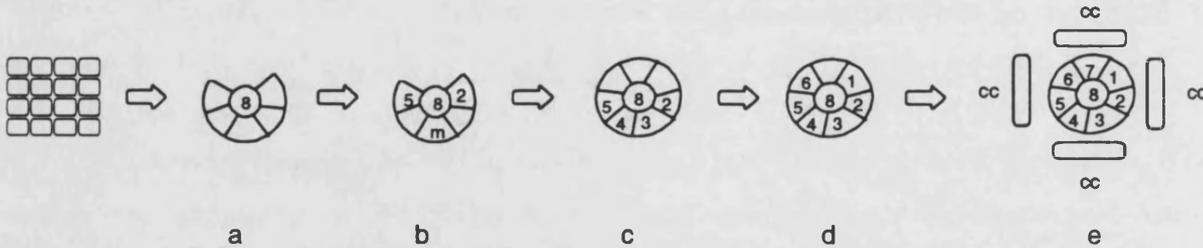


FIGURA 7-1. Representación esquemática de distintos estadios en el proceso de determinación de los componentes de un omatidio. Se muestran de izquierda a derecha estadios cada vez más avanzados. El primer fotoreceptor que se especifica, a partir del campo celular indiferenciado que es el disco imagonal de ojo, es R8, las células fundadoras de cada omatidio (a). Los demás componentes se añaden siguiendo una secuencia fija. En primer lugar se determinan los precursores de los fotoreceptores R2 y R5 (b). En esta etapa aparecen también una o dos células "misterio" (señaladas con una m) que aunque inicialmente se asocian al omatidio en crecimiento, finalmente no inician un desarrollo neural y pierden su asociación con el grupo de células. A este grupo inicial se incorporan secuencialmente, por grupos de dos, R4-R3 (c) y R1-R6 (d). Finalmente se determina el fotoreceptor R7 y las células cono (e).

7.2. Especificación de las células fotoreceptoras

El desarrollo del ojo es un proceso genéticamente muy complejo. Las estimas sobre el número aproximado de genes implicados indican que, para su desarrollo completo, se requiere alrededor del 60% de todos los genes vitales (Dickson y Hafén, 1993). Sin embargo, tan sólo se conoce una parte de ellos y hablaremos ahora sólo de los más importantes para la especificación de los fotoreceptores R1-R8.

7.2.1. Especificación de R8

El espaciado regular de los omatidios se genera al paso del surco morfogénico mediante la especificación, a intervalos regulares, de los precursores de los fotoreceptores R8, esto es, una de cada 7 células aproximadamente adquiere un destino neural. Este proceso es muy semejante, al menos en su planteamiento, al espaciado regular de quetas en el sistema nervioso periférico y al de neuroblastos en el epitelio neurogénico del sistema nervioso central y, por tanto, se han buscado los procesos equivalentes en la determinación de R8 (Dickson y Hafén, 1993).

Se ha encontrado que el proceso de inhibición lateral es central en la especificación de una sola célula a partir de un grupo de células con la misma potencialidad. Por ejemplo, en la especificación de órganos sensoriales en el disco imagonal de ala, los genes proneurales (como los del complejo *achaete-scute*) junto con sus antagonistas, definen grupos de células con la misma potencialidad neurogénica (grupo proneural). De entre estas células, una es seleccionada

por un proceso de inhibición lateral frente al resto, que ven impedida su entrada en la misma ruta de diferenciación. Con este mecanismo en dos etapas se especifica una sola célula dentro de un campo de células equivalentes, y ésta evita que otras entren en su mismo destino celular (revisado en Campuzano y Modolell, 1992).

El producto del gen *scabrous* (*sca*) es el mejor candidato como señal en un proceso de inhibición lateral en la especificación de los precursores de R8. Esta proteína de secreción, relacionada con el fibrinógeno, se expresa inicialmente en un grupo de células situadas en el margen anterior del surco morfogénico y, gradualmente, su expresión se ve limitada a la célula precursora de R8. En los mutantes amorfos *sca*, entran en desarrollo neurogénico más células de lo normal, aunque no todas se desarrollan como R8. Este hecho indica que *sca* puede tener una función parcialmente redundante en el espaciado de los omatidios (revisado en Dickson y Hafen, 1993)

La situación es menos clara respecto a la especificación de los grupos de equivalencia de entre cuyas células se va a seleccionar un precursor,. Se sabe que los genes del complejo *achaete-scute* no juegan ningún papel en este proceso, pero es probable que otros genes que codifican para proteínas con dominios "hélice-lazo-hélice" (HLH), tales como *hairy*, sí lo hagan. *hairy* se expresa fuertemente en la parte anterior al surco morfogénico, aunque la pérdida de esta proteína no tiene consecuencias en el desarrollo del ojo, lo que sugiere que puede tener una función redundante (Dickson y Hafen, 1993).

Además de *sca*, se han identificado tres mutaciones más que afectan al espaciado inicial de las células R8. Se trata de *Notch*, *Ellipse* y *retina-aberrant in pattern*. Puesto que *Notch* codifica para un receptor de membrana, se ha propuesto que podría mediar la respuesta a la señal *sca*. Los datos genéticos son congruentes con ello (revisado en Dickson y Hafen, 1993).

7.2.2. Especificación de los fotorreceptores R1-R6

En contraste con la especificación de R8, que probablemente depende de señales difusibles, la especificación de los demás tipos celulares se realiza de forma autónoma dentro de cada omatidio. La especificación mejor entendida es la del fotorreceptor R7, que utiliza la cascada de quinasas, iniciada en la proteína Ras, para transducir hasta el núcleo una señal que desencadena su destino celular (revisado en Wassarman y col, 1995; Dickson y Hafen, 1994; Zipursky y Rubin, 1994). Del mismo modo, el desarrollo de los demás fotorreceptores requiere también toda la cascada citoplasmática de transducción de la señal mediada por Ras (Simon y col. 1991, Dickson y Hafen, 1993). En concreto, se piensa que la proteína Ras se ve activada en

las células precursoras de R1-R6 por una interacción ligando-receptor entre el homólogo en *Drosophila* de los receptores EGF (la proteína Egfr, también conocida como Torpedo, Faint little ball o DER), y su supuesto ligando, codificado por el gen *spitz* (Xu y Rubin, 1993; Freeman, 1994).

Hasta el momento se han identificado dos genes implicados en la determinación de los destinos R1-R6. Se trata de *seven-up* (*svp*) y *rough* (*ro*). El gen *rough* se expresa en los fotoreceptores R2/R5 y R3/R4, pero sólo se requiere en R2/R5 para el desarrollo correcto del omatidio. Esto se demuestra, entre otras evidencias, por el hecho de que en los mutantes *ro* las células R2/R5 inician su desarrollo neural de forma normal, aunque con identidad distinta, y la especificación correcta de R3/R4 se ve también afectada. Dado que el par R3/R4 aparece posteriormente en la secuencia de reclutamiento de células precursoras, esto indica que la especificación de estas últimas células depende, al menos en parte, de señales suministradas por el par R2/R5. La caracterización molecular de *ro* indica que este gen codifica para una homeoproteína, y no una proteína de secreción o unida a membrana. Se ha propuesto, por tanto, que *ro* controla la producción de una señal en R2/R5 para la especificación del destino celular R3/R4 (Tomlinson y col. 1988; revisado en Dickson y Hafen, 1993)

En cuanto a *seven-up*, este gen fue identificado inicialmente como una inserción letal cuya actividad β -galactosidasa se restringía a los precursores de los fotoreceptores R1, R3, R4 y R6. Su caracterización molecular ha demostrado que codifica para una proteína de localización nuclear, con elevada homología con miembros de la superfamilia de los receptores para esteroides (Mlodzik y col. 1990). Estos receptores constan de varios dominios, entre ellos uno de unión al DNA y otro de unión a ligando. Se han identificado dos transcritos *svp* de distintos tamaños que son idénticos hasta un sitio de procesado alternativo. El dominio de unión al DNA se encuentra precisamente en esta región común, pero no el de unión a ligando. Así pues, este procesado alternativo genera dos tipos de proteínas Seven-up, un factor de transcripción con dominio de unión a ligando y otro sin este dominio. Se ha propuesto, por esta razón, que esta segunda proteína podría ejercer una acción antagonista a la primera, al poder ocupar sitios de unión a DNA sin estar activada por su correspondiente ligando (Mlodzik y col. 1990). Un mecanismo de actuación similar se ha demostrado para el receptor de la hormona tiroidea (revisado en Latchman, 1991).

Las mutaciones en el gen *svp* son letales en estadios embrionarios, provocando defectos en el sistema nervioso central, y en el cuerpo graso (Hoshizaki y col. 1994). De hecho, además de su expresión en los precursores de las células fotoreceptoras R1, R3, R4 y R6, sus productos también aparecen en parte de los neuroblastos embrionarios (Mlodzik y col. 1990) y en el

cuerpo graso en desarrollo (Hoshizaki y col. 1994). Se ha observado que la doble implicación de *svp* en la neurogénesis y en el desarrollo del ojo, son funciones que se conservan para los genes homólogos de vertebrados, donde, además, se ha propuesto que podrían participar en la diferenciación del mesodermo (Fjose y col. 1993).

El fenotipo de la mutación *svp* en clones homocigóticos para la mutación consiste en la transformación de los pares de células R3/R4 y R1/R6 en células morfológicamente semejantes a R7 (y que expresan marcadores moleculares de células R7), además de la aparición de algunas células extra también semejantes a R7. Este fenotipo sugiere que *svp* podría estar implicado en la especificación de los pares de fotorreceptores R3/R4 y R1/R6 (Mlodzik y col, 1990; revisado en Moses, 1991; Dickson y Hafén, 1993).

Recientemente se ha demostrado que *seven-up* requiere que la cascada de transducción de la señal *ras* esté activada en la misma célula en que se expresa para poder ejercer su función en la determinación de los fotorreceptores (Begemann y col. 1995; Kramer y col. 1995). La demostración procede del hecho de que cuando se expresa ectópicamente la proteína Seven-up en los precursores de las células como del omatidio, éstas se transforman a células de tipo R7. Este fenotipo de ganancia de función se ve específicamente suprimido por mutaciones en los genes de la cascada de transducción de la señal *ras*, indicando su interacción genética. Las mutaciones en reguladores negativos de la cascada incrementan el fenotipo debido a la expresión ectópica. Estos ensayos genéticos también muestran que los dos tipos de proteína Seven-up parecen tener la misma función genética e interactuar con los mismos genes, por lo que podrían ser redundantes (Begemann y col. 1995), contrariamente a lo propuesto inicialmente (ver más arriba).

7.2.3. Especificación de R7

La diferenciación neural del fotorreceptor R7 es el proceso mejor comprendido de todos los que se producen en el ensamblaje de un omatidio (revisado en Zipursky y Rubin, 1994). Se inicia con una interacción entre la proteína transmembrana Sevenless (Sev), expresada en la célula precursora de R7, entre otras células, y el ligando Bride-of-sevenless (Boss), que se expresa exclusivamente en la célula R8. La proteína Sev es un receptor de membrana que presenta actividad tirosina quinasa cuando se activa por la unión con su ligando específico. De hecho, lo que ocurre tras la interacción Sev-Boss es que Boss se internaliza en la célula precursora de R7 y Sev se activa debido a una autofosforilación. Esta autofosforilación desencadena toda una serie de reacciones de fosforilación y defosforilación sobre otros

sustratos, en una cascada que conduce a la transducción de la señal hasta el núcleo celular. Resumidamente, esta cascada se inicia con la proteína Ras, una GTPasa que presenta dos estados: uno activo, unida a GTP, y otro inactivo unida a GDP. En su estado activo esta proteína es capaz de fosforilar a D-Raf, esta a D-Mek y esta a Rolled, que transmite la señal al interior del núcleo. En el núcleo celular esta cascada de quinasas provoca la fosforilación de ciertos factores nucleares, entre los que se ha identificado las proteínas Pointed (*pnt*) y Yan, así como Sina (Wassarman y col. 1995; Dickson y Hafen, 1994; Zipursky y Rubin, 1994, Dickson y Hafen, 1993).

Se han descrito otros receptores de membrana con actividad tirosina quinasa semejantes a Sev, tanto en *Drosophila* como en otros invertebrados, así como gran parte de las quinasas y fosfatasas por debajo de éstas. Uno de ellos es la proteína Torso, que está implicada en la determinación del extremo posterior del embrión de *Drosophila*, y otro ejemplo es la proteína Let-23 que determina el destino vulval en *Caenorhabditis elegans*. Aunque, aparentemente, los procesos en que están implicados estos receptores tirosina quinasas son totalmente distintos, las evidencias genéticas apuntan a que la transducción de la señal de la membrana plasmática al núcleo es una cascada de serina/treonina y treonina/tirosina quinasas altamente conservada. De hecho, todos los datos son congruentes con la existencia de una cascada única y lineal, responsable de todos los aspectos de la señalización iniciada con la activación de la quinasa de membrana (revisado en Dickson y Hafen, 1994). Hasta el momento, no hay indicios de la existencia de una ruta de transducción de señal que funcione en paralelo, aunque sí de la existencia de una desviación en la misma: recientemente se ha demostrado para el receptor Torso que la transducción de su señal hasta el núcleo celular puede ocurrir, bien mediante la proteína Ras, siguiendo la ruta más conocida hasta el momento, o bien utilizando una nueva ruta, de la que no se conoce todavía ningún componente, y que converge en la proteína D-raf con la anterior (Hou y col. 1995).

Sin embargo, si la cascada de transducción de la señal es generalizada y es un inductor común en la diferenciación de todos los fotoreceptores, la especificación de los subtipos neuronales (R1 a R8) debe requerir otras señales. Probablemente la historia del desarrollo de cada precursor de fotoreceptor lleva a la activación de genes que determinan subtipos. Se espera que las mutaciones amorfas en estos genes que determinan subtipos neuronales afectarán a esta especificación, pero no a la determinación neuronal. Como hemos visto previamente, *seven-up* y *rough* cumplen estas dos condiciones, pero otra proteína nuclear podría pertenecer también a esta categoría de genes. *seven-in-absentia* (*sina*), se expresa en muchas células del ojo en desarrollo, pero se requiere tan sólo en el precursor de la R7. En ausencia de

Sina la precursora de R7 deja de expresar marcadores neuronales y se diferencia en una célula accesoria no neurona. Así pues, aunque las mutaciones *sina* afectan a la especificación del subtipo R7 de fotorreceptores, también se ve afectada la especificación de su destino neural y no queda claro en qué proceso actúa este factor de transcripción (revisado en Wassarman y col. 1995).

Hasta aquí hemos repasado las etapas principales en el desarrollo de algunos de los tejidos donde se expresa el gen PP2: el mesodermo embrionario y el ojo. Con ello se espera haber creado el contexto adecuado para tratar los resultados que hemos obtenido en la caracterización de este gen, y que presentamos a continuación.

OBJETIVOS

Dado nuestro interés por estudiar los mecanismos moleculares que llevan a la determinación y diferenciación terminal de células específicas, decidimos utilizar la especificación de la musculatura somática larvaria como modelo para este estudio, y centramos en la caracterización completa de un gen que podría estar implicado en estos procesos: el gen identificado en la cepa de trampa de los enhancer PP2.

Como veremos, este gen presenta varias características que lo hacen interesante para ese propósito: en primer lugar, fue identificado en base a que su patrón de expresión (detectado por el del gen informador *lacZ*) dependía del gen *wg* (A. Martínez Arias, com. pers.) lo cual sugiere que podría participar en alguna toma de decisiones celulares, pues *wg* participa directamente en estas decisiones. En segundo lugar, su patrón de expresión embrionario sugiere fuertemente que podría tener que ver, bien con la especificación de algún precursor muscular, o bien con la diferenciación de los músculos (o ambas cosas). Por todo ello, decidimos centrarnos en su caracterización genética y molecular.

Aunque nuestra meta a largo plazo es la caracterización completa del gen, en una etapa inicial nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Obtención de una sonda de DNA genómico adyacente a la inserción y clonación de toda la región genómica en la que se encuentra el gen.
2. Localización citogenética del gen.
3. Identificar los fragmentos de restricción de los clones genómicos que contengan algún exón.
4. Determinar los tamaños de los transcritos procedentes de la región, así como la posible existencia de un perfil temporal de expresión del gen durante el desarrollo.
5. Purificar clones de cDNA embrionarios empleando los fragmentos genómicos que contengan alguna región exónica. Posteriormente, secuenciar y analizar las posibles pautas abiertas de lectura que aparezcan.
6. Localizar las posiciones en el genoma de los exones del gen, así como los límites intrón-exón, para aclarar la estructura de la unidad de transcripción.

7. Describir el patrón de expresión embrionario tanto de la cepa PP2 (*lacZ*), como del gen PP2 en la cepa salvaje.
8. Localización en la región clonada de inserciones de transposones artificiales, y su utilización para la obtención de alelos del gen por movilización.
9. Mediante el estudio de los mutantes generados, aclarar la participación de este gen en los mecanismos genéticos que controlan la especificación/diferenciación de la musculatura somática larvaria

MATERIAL Y MÉTODOS

La mayoría de las técnicas empleadas en este trabajo pueden encontrarse descritas en los manuales de laboratorio Sambrook y col. (1989) y Ausubel y col. (1988), así como muchos de los reactivos y medios de cultivo estándar.

Gran parte de los enzimas de restricción y modificación del DNA y RNA se obtuvieron de Boehringer Mannheim y Pharmacia, por lo que se han utilizado según las recomendaciones de los proveedores.

Dado que algunas de las técnicas empleadas son ya estándar en el laboratorio, vamos a describir con especial detalle sólo aquellas que se han empleado por primera vez o en las que se ha realizado una modificación importante.

1. MATERIAL BIOLÓGICO

1.1. *Drosophila melanogaster*

Como cepa estándar en todos los cruces, así como para la obtención de DNA genómico total, mRNA poli(A)⁺ e hibridaciones *in situ* hemos empleado la cepa Oregon-R.

1.1.1. Inserciones en la región 54A: cepas originales

Hemos utilizado la cepa de trampa de los enhancer PP2 para iniciar la caracterización de la región 54A de *Drosophila melanogaster*, donde se encuentra un gen no descrito previamente y que hemos denominado provisionalmente PP2. Esta cepa, viable en homocigosis, fue generada en el laboratorio de A. Martínez Arias, por movilización de una inserción preexistente en el cromosoma X, la P129, en un rastreo genético en busca de genes cuyo patrón de expresión dependiera del gen de la polaridad de los segmentos *wingless* (A. Martínez Arias, comunicación personal). El DNA insertado en esta cepa es el elemento P-lArB. Para una descripción completa del transposón ver Wilson y col. (1989). Como marcador fenotípico lleva el gen *rosy*, y permite el rescate del plásmido del modo descrito en Wilson y col. (1989) y en el apartado 7.2. de Material y Métodos.

Además de esta inserción inicial, hemos empleado un total de 9 cepas más de trampa de los enhancer, que han sido localizadas citogenéticamente en la misma región que PP2, o en regiones adyacentes. Todas ellas llevan insertado el elemento PZ (marcado fenotípicamente también con *rosy*), descrito en Mlodzik y Hiromi (1992), y pueden ser rescatadas de modo semejante a PP2.

Estas inserciones han sido generadas en el marco del programa "The Berkeley *Drosophila* Genome Project" con el objetivo a largo plazo de obtener alelos recesivos letales de todos los genes de *Drosophila* susceptibles de ello. Más información sobre este proyecto y sobre las cepas

existentes en él puede encontrarse en la base de datos de *Drosophila* ("Flybase") en los siguientes ficheros: flybase/allied-data/genome-projects/lbl/LBL.doc y flybase/allied-data/genome-projects/lbl/Pelement.doc para información y flybase/allied-data/genome-projects/lbl/Pelement.cvs y flybase/allied-data/genome-projects/lbl/Pelement.rpt para un listado completo de las cepas generadas en el proyecto. La dirección electrónica para acceder a Flybase es <http://Morgan.Harvard.edu>.

Todas las cepas que hemos empleado procedentes del proyecto anterior tienen el siguiente genotipo general *cn*, P{*ry*⁺,P\T:*lacZ*:Hsp70Km[r]ori=PZ}l(2)NNNNN/CyO; *ry*⁵⁰⁶/*ry*⁵⁰⁶, donde l(2)NNNNN representa un número que identifica la inserción, siendo todas ellas únicas. Cada inserción tiene un número de stock asociado, que a continuación enumeramos junto con su localización citogenética, según los datos que figuran en esa base de datos.

l(2)04291	P1369	53F1-2
l(2)06253	P1480	53F1-5
l(2)04227	P1367	53F4-5
l(2)05091	P1393	53F4-5
l(2)01038	P976	54B1-2
l(2)07129	P2336	54B1-2
l(2)06373	P2034	54B4-5
l(2)10491	P2372	54B4-5
l(2)10505	P2373	54C11-12

1.1.2. Otras inserciones en la región 54A

Además de las mencionadas anteriormente, hemos empleado otra inserción, denominada P-*lacW*(55/7), procedente del grupo de Marek Mlodzik (EMBL, Heidelberg) y descrita en Török y col. (1993). Esta inserción es el punto de partida de la caracterización emprendida por ese grupo en la región 54A, y que ha llevado a establecer una colaboración entre nuestro laboratorio y el de Heidelberg.

Mediante movilización con transposasa, este grupo ha demostrado que la inserción es la única causa de la letalidad que presenta el cromosoma de la inserción. Nosotros hemos empleado esta cepa esencialmente para realizar ensayos de complementación con los revertientes de la cepa P976 (ver el apartado 15.2). Su genotipo completo es: *wy*; P-*lacW*(55/7)/CyO; +/+.

1.1.3. Revertientes espontáneos a partir de inserciones PZ

Varias de las cepas enumeradas anteriormente han sido empleadas también por la Dra. Mar Ruiz Gómez (Departamento de Zoología, Universidad de Cambridge), quien durante el mantenimiento de las mismas identificó tres revertientes espontáneos que también hemos empleado nosotros. Se trata de un revertiente de la inserción P2373 (rev2373) y dos de la P2336 (rev¹ 2336 y rev²⁺³ 2336).

1.1.4 Cepas empleadas en la movilización de inserciones PZ

Hemos empleado dos cepas para esta movilización. Se trata, por un lado, de una fuente de transposasa insertada en un cromosoma que está marcado fenotípicamente con una mutación dominante de quetas cortas (*Stubble, Sb*), y por otro, de una cepa con un cromosoma 2 portador de un letal, marcado con *cinnabar* y *brown*, frente a un cromosoma con letales equilibrados.

A continuación se indican los genotipos completos de estas cepas. Para una descripción más detallada de las distintas mutaciones y sus fenotipos ver el apartado 15.2 así como Lindsley y Zimm (1992) y Ashburner (1989).

w/-; +/+; P[ry⁺Δ2-3](99B)*Sbe*/TM6
+/+; l(2)*cnbw*/CyOS*bw*; MKRS/TM2ry

1.2. *Escherichia coli*

Los cultivos bacterianos se han realizado siguiendo condiciones estándar (Sambrook y col. 1989) en medio LB.

1.2.1. K802

Hemos empleado esta cepa de *E.coli* para la propagación del bacteriófago λEMBL3. Su genotipo es como sigue: *supE hsdR gal metB* (Brown, 1991).

1.2.2. C600Hfl⁻

Esta cepa se ha empleado para la selección de los fagos λgt10 recombinantes en la genoteca preparada con cDNA embrionario de 4-17 horas (ver el apartado 8). En este vector, la inserción del cDNA se produce en un sitio de clonación único *Eco* RI dentro del gen represor *cl*.

C600Hfr, también denominada *BNN102*, tiene el siguiente genotipo completo: *supE44hsdRthi-1thr-1leuB6lacY1tonA21hflA150 [chr::Tn10(tet^r)]* (Brown, 1991).

1.2.3. *DH5 α*

Ha sido la cepa utilizada para preparar células competentes para la transformación con plásmidos de la serie pUC. La principal ventaja de utilizar esta cepa con los plásmidos de la serie pUC radica en que se produce el fenómeno de la α -complementación cuando el plásmido no es recombinante y permite, por tanto, la selección de colonias recombinantes en un medio indicador con IPTG y X-gal por su color blanco (Sambrook y col. 1989). Su genotipo completo es el siguiente: *supE44 Δ lacU169 (ϕ i 80 lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 end A1 gyrA96 thi-1 relA1* (Brown, 1991).

2. VECTORES DE CLONACIÓN

2.1. Vectores basados en el fago lambda: λ EMBL3, λ gt10

Estos dos vectores derivan del bacteriófago lambda. El primero de ellos, λ EMBL3, es un vector de reemplazamiento utilizado para la construcción de la genoteca de DNA genómico que hemos empleado en este trabajo. Permite la clonación de fragmentos grandes, de entre 12 y 20 kb de tamaño.

Respecto a λ gt10, se trata de un vector de inserción utilizado, normalmente, para la construcción de genotecas de cDNA, y que admite insertos de hasta 7 kb. Lo hemos utilizado para la construcción de una genoteca de cDNA embrionario de 4-17 horas (ver el apartado 8). Más información sobre estos vectores puede encontrarse en Sambrook y col. (1989).

2.2. Vectores plasmídicos: pUC18, pUC19 y pNB40.

Los vectores de la serie pUC pertenecen a una familia de vectores plasmídicos que contienen un sitio de clonación múltiple dentro de la región codificante amino-terminal del gen *lacZ*. Los hemos utilizado para la subclonación de fragmentos de restricción procedentes de clones de λ EMBL3, de cósmidos y de cDNAs. Llevan un gen que codifica para una β -lactamasa, lo cual les confiere resistencia a ampicilina. Los clones recombinantes se distinguen de los parentales por el fenómeno de la α -complementación, tal como se ha indicado previamente. Los distintos miembros de la serie pUC se diferencian únicamente en su sitio de clonación múltiple.

Respecto al plásmido pNB40 es el empleado para la construcción de una genoteca de cDNA embrionario preparada en plásmido y proporcionada por Nick Brown (Wellcome/CRC

Institute of Cancer and Developmental Biology, Cambridge). Se trata, básicamente, de un pUC con un promotor SP6 en su extremo 5' y un promotor T7 en su extremo 3'. La preparación de esta genoteca de cDNA se describe en Brown y Kafatos (1988).

2.3. Lawrist4

Este vector es el empleado para la construcción de la genoteca en cósmidos descrita en Hoheisel y col. (1991). El DNA está clonado en el sitio *Bam* HI del vector pero, dado que el DNA procede bien de digestión parcial *Mbo* I, de digestión parcial *Mbo* I/*Dam*, o por rotura mecánica más adaptadores *Bam* HI, no siempre se regenera el sitio *Bam* HI y no es posible obtener el inserto libre de vector (de hecho, en promedio se regenera sólo 1 de cada 6 veces). A efectos de localización de sitios de restricción debe tenerse en cuenta lo siguiente (ver la figura 2-1): *Hind* III sólo corta en una posición en el vector, 7 nucleótidos antes del sitio *Bam* HI, con lo cual libera prácticamente el inserto por un lado, y unido el vector entero (5,5 kb) con el fragmento *Hind* III del inserto por el otro extremo. *Eco* RI corta en 3 posiciones, liberando dos fragmentos constantes de 1,2 y 3,5 kb y corta, respecto del sitio de clonación, a 95 y 330 nucleótidos. *Sal* I no corta en el plásmido.

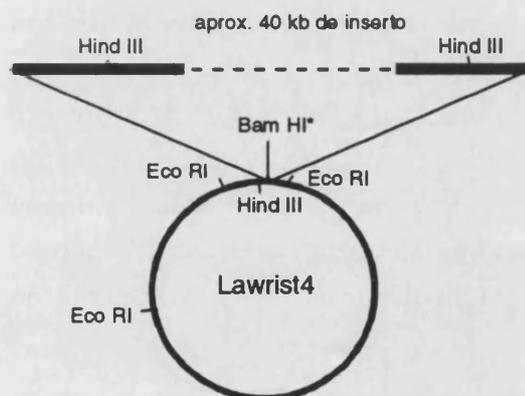


FIGURA 2-1. Esquema con información útil para poder localizar los sitios de restricción *Eco* RI, *Hind* III y *Bam* HI, en los insertos clonados en el vector Lawrist4. El asterisco en el sitio *Bam* HI significa que los insertos están clonados en este sitio del vector, pero en promedio, sólo se regenerará la diana para este enzima en 1 de cada 6 ocasiones. Los sitios *Hind* III dibujados en el inserto son el primero y el último en el DNA clonado. La figura no está a escala.

3. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

3.1. DNA genómico total de *Drosophila*

En distintas etapas de este trabajo hemos aislado DNA genómico total de las cepas enumeradas en el apartado 1.1. Por ejemplo, para los rescates de los plásmidos de los elementos P-lArB (cepa PP2) y los de la serie PZ, o para la localización de las inserciones P2336 y P1393. En estos casos, la extracción de DNA genómico total de individuos adultos se ha realizado siguiendo el método de Junakovic y col. (1984), modificado para 150 adultos. Este protocolo se

basa en el homogeneizado de las moscas en un tampón de extracción Tris-HCl 0,1 M (pH 9), EDTA 0,1 M y una incubación posterior a 65°C en SDS al 2%. El DNA se recupera por precipitación con isopropanol y centrifugación, y se purifica por fenolización y tratamiento con RNasa.

3.2. DNA plasmídico y cósmidos

Para la extracción de DNA plasmídico a pequeña escala hemos empleado el método de la lisis alcalina (descrito en Ausubel y col. 1988) con las modificaciones señaladas en Pérez Alonso (1989). El rendimiento de la técnica ha sido normalmente alto, entre 3 y 5 µg de DNA por ml de cultivo inicial.

Para la obtención de grandes cantidades de cósmido hemos utilizado esta misma técnica, aunque normalmente en estos casos el rendimiento es claramente inferior, de 1 a 3 µg/ml de cultivo.

3.3. DNA del bacteriófago lambda.

El protocolo empleado parte de lisados líquidos de pequeño volumen (50 ml), que son procesados según el protocolo descrito en Ausubel y col. (1988). El rendimiento ha sido, normalmente, de 50 a 100 µg de DNA por 35 ml de lisado procesado. La etapa limitante de esta técnica ha sido la obtención del lisado líquido. Las mejores condiciones encontradas fueron incubar los matraces con fuerte aireación (matraces de 1 litro con 50 ml de medio y fuerte agitación) así como realizar la infección con concentraciones elevadas de fagos. Esto último requiere, normalmente, realizar una lisis previa en placa siguiendo el protocolo descrito en Ausubel y col. (1988).

3.4. Extracción de mRNA poli(A)⁺

Para la realización de los Northern Blot descritos en el apartado 5.1.2 ha sido necesario extraer mRNA poli(A)⁺ en distintos estadios del desarrollo de *Drosophila*. En concreto, hemos extraído mRNA poli(A)⁺ del siguiente material biológico: embriones de 0-4h, 4-8h, 8-12h, 12-24h, larvas de tercer estadio, pupas y adultos de la cepa estándar Oregon-R. También hemos empleado mensajeros poliadenilados para la construcción de una genoteca de cDNA embrionario (ver el apartado 8).

El protocolo seguido se basa en dos kit de Pharmacia, uno para la extracción de RNA total (núm.cat. 27-9270-01) y otro para la purificación de mRNA (núm.cat. 27-9258-02). En esencia, la extracción a gran escala se realizó a partir de 1 g de material biológico, que había sido

previamente congelado en nitrógeno líquido y almacenado a -80°C . El material se homogeneizó en un tampón de extracción que contiene tiocianato de guanidinio (un agente caotrópico potente que protege al RNA de la degradación por parte de las RNasas endógenas y exógenas), los restos celulares se eliminaron por centrifugación y el sobrenadante se sometió a rotura mecánica haciendo pasar el sobrenadante a través de una jeringa. Este sobrenadante se sometió, posteriormente, a ultracentrifugación en gradiente de trifluoroacetato de cesio donde se separan el DNA genómico del RNA total en el gradiente formado. Las proteínas quedan en la superficie del gradiente, el DNA genómico se reparte dentro del gradiente y el RNA total sedimenta en el fondo. Este RNA total se resuspendió en TE tratado con 0,1 % DEPC (Serva, núm.cat. 18835) y se ha utilizado como material de partida para la purificación del mRNA poli(A)⁺.

La purificación de mensajeros poliadenilados se basa en una cromatografía de afinidad. En concreto, se utiliza una cromatografía en columna de oligo(dT)-celulosa en la cual los RNAs poliadenilados quedan retenidos en condiciones de fuerza iónica alta, y eluyen en un tampón de baja fuerza iónica. El mRNA poli(A)⁺ se ha mantenido almacenado precipitado en etanol a -20°C . Para comprobar la calidad de este mRNA y su cuantificación aproximada hemos realizado un gel de agarosa.

El rendimiento del procedimiento, según las mediciones en un espectrofotómetro, ha sido de 10 a 15 μg de mRNA poli(A)⁺ por gramo de material de partida.

4. MARCAJE Y DETECCIÓN DE DNA

En las hibridaciones en filtro así como en las hibridaciones *in situ* sobre embriones y en cromosomas politénicos, hemos empleado el método de marcaje no radiactivo desarrollado por Boehringer Mannheim (B.M.), siguiendo puntualmente las recomendaciones del proveedor para cada técnica. En esencia se trata de tres fuentes de información: los manuales "The DIG System User's Guide for Filter Hybridization", "Nonradioactive In Situ Hybridization: Application Manual" y las hojas de información técnica que acompañan a cada producto.

El método consiste en la incorporación de un análogo del nucleótido dTTP (el DIG-11-dUTP B.M. núm. cat. 1277065) durante la copia del DNA de interés. Para ello se utiliza el enzima Klenow (B.M. núm. cat. 1008404) y hexanucleótidos al azar (B.M. núm. cat. 1277081) como iniciadores de la síntesis. Esta marca, el esteroide digoxigenina añadido al nucleótido dTTP, se detecta mediante un anticuerpo anti-DIG conjugado con fosfatasa alcalina (B.M. núm. cat. 1093274) empleando como sustratos para el enzima dos tipos de reactivos: bien sustratos que dan color (NBT y X-fosfato, B.M. núm. cat. 1087479 y 760994 respectivamente) o bien sustratos que producen luz (Lumigen PPD, B.M. núm. cat. 1357328). Tras cada reacción de marcaje, hemos cuantificado la cantidad aproximada de DNA marcado mediante la detección de diluciones de la reacción de marcaje y DNA control del kit en un filtro, siguiendo el método

descrito en el manual de usuario de B.M., pero con modificaciones en lo que respecta a las concentraciones ensayadas.

5. HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

5.1. Hibridación en filtro

En todas las técnicas de hibridación en filtro hemos empleado el método no radiactivo de marcaje de ácidos nucleicos, basado en la digoxigenina, ya descrito en el apartado anterior así como las membranas de nylon del mismo proveedor (B.M. núm. cat. 1417240) o de Amersham (Hybond-N, núm.cat. RPN.303N).

5.1.1. Southern Blot

Hemos empleado esta técnica para las siguientes aplicaciones: 1. confirmar o aportar datos que aclarasen el mapa de restricción de la región 54A; 2. para confirmar los clones positivos en los distintos rastreos de genotecas; 3. para probar las sondas de los rastreos frente a DNA genómico y ver si son de copia única o contienen DNA repetitivo y, en general; 4. siempre que ha sido necesario demostrar la presencia de un DNA.

En todos los casos, el protocolo utilizado ha sido el descrito en Sambrook y col. (1988), con las modificaciones requeridas para el uso de sondas marcadas con digoxigenina (Boehringer Mannheim, 1993). Las hibridaciones se han llevado a cabo en tubos de hibridación y empleando un horno giratorio a 65°C. La mezcla de hibridación ha sido SSC 5X, N-Lauroilsarcosina 0,1%, SDS 0,02% y agente de bloqueo al 1% (B.M. núm. cat. 1096176). La concentración de DNA marcado ha variado entre 5 ng/ μ l y 20 ng/ μ l dependiendo de la disponibilidad de DNA marcado. La mezcla de hibridación se ha recuperado en todos los casos tras su utilización, pues la marca con digoxigenina es relativamente estable a -20 °C (al menos 1 año) y puede emplearse repetidamente sin pérdida apreciable de sensibilidad.

Por lo general, las hibridaciones han sido realizadas durante toda la noche, excepto cuando se ha tratado de DNAs clonados (clones de fagos, plásmidos o cósmidos) para los cuales hemos comprobado que 3-4 horas son suficientes para obtener una señal satisfactoria.

Los lavados empleados han sido para máxima exigencia de identidad, es decir, dos lavados de 5 min a temperatura ambiente en SSC 2X, SDS 0,1% y dos lavados de 15 min a 68°C en SSC 0,5X, SDS 0,1% y en agitación.

La detección de la señal se ha llevado a cabo siguiendo las recomendaciones del proveedor (Boehringer Mannheim, 1993). En esencia, el filtro debe tratarse en primer lugar con agente de bloqueo al 1% para evitar la unión inespecífica del anticuerpo. Posteriormente se incubaba con el anticuerpo anti-DIG conjugado con fosfatasa alcalina y, finalmente, se revela por adición de los sustratos para la fosfatasa, que pueden ser de dos tipos:

1. Revelado colorimétrico. En este caso se emplean los sustratos NBT y X-fosfato. La reacción enzimática da lugar a un producto coloreado allí donde haya hibridado la sonda.

2. Revelado lumínico. En este caso hemos empleado el sustrato LumigenPPD que, tras una breve incubación a 37°C, produce luz en las bandas donde la sonda haya hibridado. Esta señal puede visualizarse exponiendo una película fotográfica para rayos X. Este revelado es mucho más sensible y rápido que el colorimétrico. Como ventaja adicional permite la reutilización del mismo filtro en una nueva hibridación, en nuestras manos hasta 7 veces. El protocolo que hemos empleado para eliminar la sonda del filtro ha sido el siguiente: lavar brevemente el filtro en agua destilada, posteriormente lavar dos veces en NaOH 0,2 M, 0,1% SDS a 37°C (20 minutos cada lavado) y, finalmente, un lavado en SSC 2X. Llegados a este punto los filtros bien han sido rehibridados inmediatamente o bien secados y almacenados envueltos en papel de aluminio. Los mejores resultados se han obtenido cuando las distintas hibridaciones han sido inmediatas, y sin tener que secar los filtros entre una hibridación y la siguiente.

5.1.2. Northern Blot

La transferencia de los mRNAs al filtro de nylon se realizó durante unas 4 horas siguiendo el protocolo descrito en Sambrook y col. (1989), con las modificaciones descritas en Boehringer Mannheim (1993). En esencia, se trata el gel durante 20 minutos en NaOH 0,05 M para hidrolizar parcialmente el RNA (este paso aumenta la eficiencia de la transferencia) y después se coloca el gel en un sistema en el que la transferencia se produce por el flujo ascendente del tampón SSC 20X (libre de RNasas) a temperatura ambiente. En cada carrera se han cargado, aproximadamente, 3 µg de mRNA poli (A)⁺

Para comprobar que un resultado negativo no se debe a degradación del mRNA por la acción de RNasas contaminantes, y para tener un dato aproximado de la cantidad real de mRNA en cada carrera (que pueda explicar una señal más fuerte en una de ellas, por ejemplo), después de la hibridación frente a la sonda de interés los filtros de los Northern Blot se han

hibridado frente a una sonda del gen de la actina, un gen de expresión elevada y aproximadamente constante durante todo el desarrollo.

5.2. Hibridación *in situ* en embriones de *Drosophila*

Hemos empleado esta técnica con dos objetivos principales. En primer lugar, para identificar fragmentos de restricción en los clones genómicos que contengan secuencias presentes en un mRNA maduro (exones), pues obtendremos señal en el embrión y ésta será preferentemente citoplásmica. En segundo lugar, para describir el patrón de expresión embrionario del gen identificado en la inserción PP2. El interés de la primera aproximación radica en que los fragmentos de restricción identificados de este modo pueden ser empleados, posteriormente, como sonda para rastrear cDNAs procedentes de la región.

El protocolo seguido se basa en el descrito por Tautz y Pfeifle (1989) con modificaciones menores. Este protocolo también puede encontrarse descrito en detalle, junto con información general y otros métodos relacionados, en Wilkinson (1992).

Debe destacarse la extraordinaria sensibilidad de esta técnica a la contaminación con RNasas, especialmente si los mRNAs a detectar son poco abundantes. Esto obliga a extremar las recomendaciones habituales para el trabajo con RNA (para una recopilación de estas recomendaciones ver Sambrook y col. 1989).

En concreto, el protocolo seguido puede dividirse en seis apartados que pasamos a describir con detalle:

1. Preparación de la sonda.

Se ha llevado a cabo siguiendo el protocolo estándar para el marcaje con digoxigenina (ver el apartado 4). Las sondas han sido, habitualmente, fragmentos de restricción purificados con los métodos señalados en el apartado 9.3, es decir, mediante electrolución o mediante el kit QIAEX (núm. cat. 20020). Normalmente hemos marcado unos 100 ng de DNA purificado y se ha comprobado y cuantificado el marcaje del modo indicado en el apartado 4.

2. Fijación.

1. Recoger embriones del periodo embrionario adecuado en cestillas con un pincel y bajo el grifo.
2. Decorionizar en lejía comercial al 50% durante 3-4 min. Lavar los embriones decorionizados en agua de grifo hasta que pierdan el olor característico de la lejía. Esta etapa no mata los embriones.
3. Fijar los embriones durante 20-30 min a temperatura ambiente en una mezcla 1:1 de heptano y paraformaldehído al 10% disuelto en Hepes 0,1 M (pH 6.9), MgSO₄ 2 mM y

EGTA 1 mM (pH 8). Este paso puede realizarse en tubos eppendorf o en viales de mayor volumen.

El paraformaldehido se disuelve calentando a 65°C durante varias horas. Debe pesarse con mascarilla y manejarse con guantes. Es conveniente almacenarlo alicuotado a -20°C, pero no puede volver a ser usado una vez descongelado.

4. Desechar la fase del fijador (inferior) pipeteando. Añadir un volumen de metanol y agitar violentamente durante 30 segundos. En este paso los embriones pierden la membrana vitelina y caen al fondo del vial. Si quedan muchos embriones en la interfase puede repetirse este paso.
5. Eliminar la mezcla heptano-metanol y lavar varias veces con etanol absoluto. Los embriones pueden almacenarse de este modo a -20 °C.

3. Pretratamientos. ¡Hasta el momento de la detección deben extremarse las precauciones para evitar la contaminación con RNAsas!. Pueden utilizarse tubos eppendorf o placas de pocillos múltiples (de un volumen aproximado de 2 ml por pocillo), en las cuales se minimiza el riesgo de contaminación con RNAsas. Todos los lavados son de 1 ml.

6. Rehidratar los embriones en etanol 70%, 50%, 30% y tres lavados en PBT. Cada lavado son unos 3-5 min.

El PBS se compone de NaCl 130 mM y tampón fosfato 10 mM (pH 7.2). Puede prepararse 10 veces más concentrado y alicuotarse a -20°C. Para liberarlo de RNAsas lo hemos tratado con DEPC al 0,1 % y autoclavado posteriormente. Al PBS suplementado con el detergente Tween 20 al 0.1 % le llamamos PBT.

7. Fijar durante 20 min en paraformaldehido al 4% disuelto en PBT. Lavar cinco veces con PBT para eliminar completamente el fijador.
8. Incubación breve en proteinasa K (B.M. núm. cat. 745 723) a 50 µg/ml disuelta en PBT. Puede alicuotarse y almacenarse a -20°C como stock a 20 mg/ml.

El tiempo de incubación debe comprobarse empíricamente para cada lote de proteinasa, pero suele estar entre 2 y 4 min. Este paso es crítico pues, si es demasiado corto, se pierde señal y se gana fondo, y si es demasiado largo, los embriones se desintegran en etapas posteriores.

9. Parar la digestión con proteinasa lavando dos veces en glicina al 2 mg/ml disuelta en PBT. Lavar dos veces más en PBT.
10. Fijar nuevamente en paraformaldehido al 4 % en PBT durante 20 min. Lavar cinco veces con PBT
11. Lavar una vez con una mezcla 1:1 de PBT y mezcla de hibridación.

4. Hibridación. La mezcla de hibridación ha consistido en:

Formamida desionizada	50%
SSC 20X	5X
tRNA (B.M. núm. cat. 109541)	250 µg/ml
Solución Denhardt's (Sigma, núm. cat. D-9905)	5X
DNA de esperma de salmón (Sigma, núm. cat. D-7290)	300 µg/ml
Tween 20 (B.M. núm. cat. 1332 465)	0,1 %

12. Prehibridar en unos 300 µl de mezcla de hibridación durante varias horas a 45°C. En general, los tiempos de prehibridación largos tienden a reducir el ruido de fondo.

13. Hibridar a 45° C durante toda la noche, y en agitación suave, con una concentración de sonda marcada entre 0,1-0,5 ng/µl en mezcla de hibridación. La sonda debe ser desnaturalizada previamente calentando durante 10 min en agua hirviendo y enfriando rápidamente en hielo.

5. Lavados. Todos los lavados son a 45°C. La mezcla de hibridación con la sonda puede reutilizarse y, por lo tanto, las hemos recuperado y almacenado a -20°C.

14. Un lavado de 20 min en mezcla de hibridación. A su vez, inicio de la preabsorción del anticuerpo.

15. Un lavado de 20 min en una mezcla 1:1 mezcla de hibridación-PBT.

16. Cinco lavados en PBT durante 15 min cada uno.

6. Detección de la señal.

17. Diluir el anticuerpo anti DIG-AP en PBT a 1:2000. Incubar durante 1 hora al menos a temperatura ambiente. Este anticuerpo debe haber sido preabsorbido, previamente, frente a una volumen considerable de embriones fijados.

18. Lavar cinco veces, 15 min cada lavado, en PBT.

19. Lavar brevemente tres veces en tampón 3 del protocolo de detección del kit de detección de la digoxigenina, suplementado con Tween 20 al 0,1 % y Levamisol 1 mM (Serva, núm. cat. 27750).

20. Añadir al último lavado 4,5 µl de NBT y 3,5 µl de X-fosfato para la reacción de color. Dejar proceder la reacción en oscuridad hasta que la señal sea claramente visible a la lupa. Puede ser necesario cambiar la solución de color si ésta se oscurece o cambia de color.

Una vez obtenida la señal, se han montado los embriones en glicerol al 80% y se han estudiado con óptica Nomarski (contraste interferencial o DIC) en un microscopio Nikon. Para los aspectos descriptivos de la morfología del embrión, así como para la clasificación en los

diferentes estadios embrionarios, hemos seguido la clasificación de Campos Ortega y Hartenstein (1985).

5.3. Hibridación in situ en cromosomas politénicos de *Drosophila*

Hemos empleado esta técnica con tres fines. En primer lugar, para localizar citogenéticamente el punto de inserción del vector P-1ArB en la cepa PP2. En segundo lugar, para confirmar la procedencia de cada uno de los clones genómicos que hemos obtenido en el curso de la clonación de la región. En tercer lugar, para orientar la región clonada en el cromosoma politénico.

Para obtener preparaciones de cromosomas politénicos hemos seguido el protocolo de Atherton y Gall (1972) con las modificaciones introducidas en Terol y col. (1991). El protocolo de hibridación y detección ha sido el descrito en De Frutos y col. (1990) basado en el método de marcaje no radiactivo de la digoxigenina. Una variante en la detección de la señal ha sido la empleada para orientar la región clonada en el cromosoma. En este caso, utilizamos un anticuerpo anti-DIG conjugado a oro coloidal (B.M. núm. cat. 1450 590) y un reactivo de plata (B.M. "Silver Enhancement Reagent" núm. cat. 1465 350) que se deposita en la superficie de las partículas hasta darles mayor tamaño y un color marrón oscuro, visible al microscopio. Las hibridaciones se llevaron a cabo en una cámara húmeda a 65°C en presencia de SSC 4X y los lavados se realizaron a 60°C con SSC 4X.

En las pocas ocasiones en las que hemos utilizado sondas marcadas radiactivamente se ha seguido la técnica de inicio de síntesis mediante oligos al azar e introducción enzimática de la marca (descrita en Feinberg y Volgestein, 1983). El nucleótido radiactivo ha sido el ³H-dCTP y hemos marcado normalmente unos 100 ng de DNA. La separación del DNA marcado de los nucleótidos no incorporados se realizó en columna de Sephadex G-50, y la eficiencia del marcaje se midió en un contador de centelleo. Se han empleado, aproximadamente, 10⁶ cpm por preparación. Las condiciones de hibridación y lavados fueron como las descritas para sondas marcadas no radiactivamente. Tras 30 días de autoradiografía en emulsión fotográfica Kodak AR10, las preparaciones se revelaron con revelador D-19 y se fijaron. Los cromosomas se tiñeron con Giemsa.

6. DETECCIÓN *in situ* DE β -GALACTOSIDASA

Hemos detectado la producción de β -galactosidasa en las cepas de trampa de los enhancer de dos modos. En primer lugar mediante el sustrato cromogénico X-gal que produce tinción azul en los lugares donde existe β -galactosidasa. El protocolo empleado es el descrito en Ghysen y O'Kane, (1989). En segundo lugar, mediante un anticuerpo de ratón anti β -

galactosidasa (B.M. núm. cat. 1083 104), que detecta directamente la producción de la proteína, en vez de su actividad enzimática. En este caso, la señal se ha detectado con un segundo anticuerpo anti-Ig de ratón conjugado a biotina al que se añade, posteriormente, un complejo avidina-peroxidasa biotinilada. Ambos reactivos se han empleado en forma de kit, del proveedor Vector Laboratories (núm. cat. PK-6102 *Elite*) y la señal se detecta con los sustratos normales para la peroxidasa: diaminobencidina y H₂O₂ (núm. cat. SK-4100 del mismo proveedor). Este último método proporciona una resolución superior a la detección directa.

7. CLONACIÓN DE DNA EN *E. coli*

7.1. Subclonaciones

El vector de clonación pUC18 y pUC19 ha sido preparado por ultracentrifugación en gradiente de CsCl, siguiendo esencialmente el protocolo descrito en Sambrook y col. (1989). En cuanto a las condiciones de ligación, hemos seguido las recomendaciones del proveedor (B.M.), y se han tenido en cuenta las recomendaciones descritas en Sambrook y col. (1989) en cuanto a relaciones inserto-plásmido, tiempos de ligación, etc.

La introducción de los plásmidos recombinantes en *E.coli* se ha llevado a cabo por el método de choque térmico (42°C) a células DH5α competentes para la transformación. Estas se han preparado siguiendo distintos métodos, entre ellos el descrito en Sambrook y col. (1989) y el descrito en Nishimura y col. (1990), y se han almacenado a -80°C hasta el momento de su utilización.

La selección de clones recombinantes se ha realizado sembrando las células transformadas sobre placas que contienen ampicilina y medio indicador (IPTG y X-Gal) según descrito en Sambrook y col. (1989). Las colonias blancas se han sembrado normalmente en un cultivo líquido a pequeña escala (4 ml) que contiene el antibiótico y han sido procesadas según se describe en el apartado 3.2. tanto para DNA plasmídico como DNA de cósmido.

7.2. Rescate plasmídico

El rescate del plásmido Bluescript que lleva el vector P-lArB de la cepa PP2 (ver la figura 7-1) se ha realizado en tres etapas fundamentales (Wilson y col. 1989). En primer lugar, digestión con un enzima de restricción del sitio de clonación múltiple del plásmido. En segundo lugar, ligación a una baja concentración de DNA, con el objetivo de favorecer la circularización del producto de la digestión, más que la formación de moléculas quiméricas. Por último, la transformación de *E.coli* con el producto de la ligación.

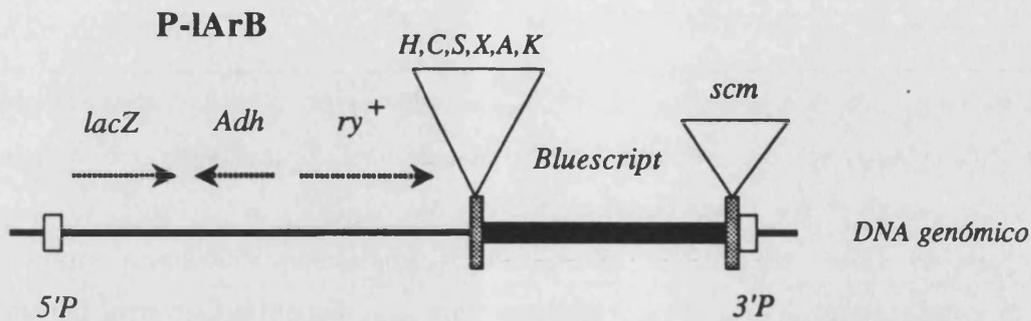


FIGURA 7-1. Representación esquemática de la estructura del elemento P-lArB. Se representan los dos marcadores fenotípicos de la inserción, *Alcohol deshidrogenasa (Adh)* y *rosy (ry)*, así como el gen informador, en este caso el gen *lacZ* de *E.coli*. En trazo más grueso se marca el plásmido Bluescript. 5'P y 3'P significan las repeticiones terminales del elemento P. Se emplean las siguientes abreviaturas: H, *Hind* III; C, *Cla* I; S, *Sal* I; X, *Xho* I; A, *Apa* I; K, *Kpn* I; scm, sitio de clonación múltiple.

De este modo, al transformar bacterias y seleccionar para la capacidad de crecer en presencia de un antibiótico, sólo permitimos que los fragmentos circulares (muy raros) que llevan integrado el plásmido puedan formar colonias, pues serán los únicos que llevan un origen de replicación para bacterias. El resultado final es, pues, la clonación inmediata de un fragmento de DNA genómico adyacente al punto de inserción, el cual puede ser empleado como punto de entrada para un paseo cromosómico o cualquier otra técnica molecular (ver también la figura 3-2 de resultados).

De modo equivalente se ha llevado a cabo el rescate de los plásmidos de las cepas con inserciones PZ (Mlodzik y Hiromi, 1992), cuya estructura se muestra en la figura 7-2.

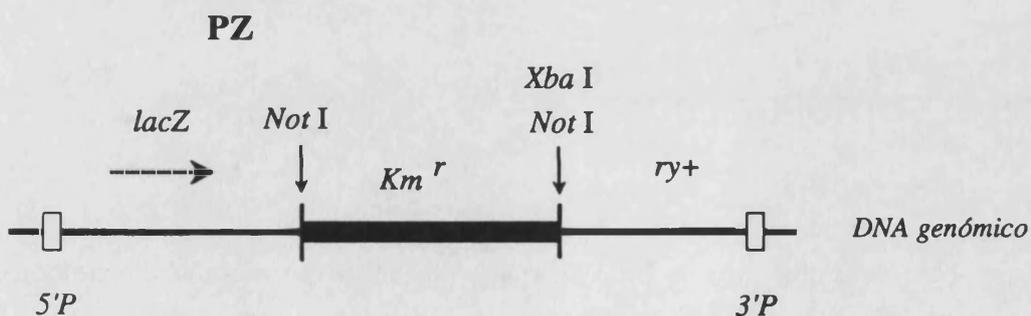


FIGURA 7-2. Representación esquemática de la estructura del elemento PZ. En trazo grueso se muestra el plásmido, que lleva un gen de resistencia a la kanamicina. El marcador fenotípico es el gen *ry* y el informador *lacZ*. La estrategia para rescatar el plásmido ha sido una digestión doble *Xba* I/*Nhe* I y *Xba* I/*Spe* I, pues los enzimas *Nhe* I y *Spe* I dan extremos compatibles para la ligación con *Xba* I y no están presentes en el elemento P. El resto de abreviaturas son como en la figura anterior.

8. PREPARACIÓN DE UNA GENOTECA DE cDNA EMBRIONARIO DE 4 A 17 H

Hemos construido esta genoteca a partir de mensajeros poliadenilados purificados del modo descrito en el apartado 3.4, empleando embriones de 4 a 17 horas de desarrollo de la cepa Oregon-R. En esencia hemos seguido las siguientes etapas:

1. Síntesis del cDNA utilizando un kit específico del proveedor Pharmacia (núm. cat. 27-9260-01) que emplea oligo d(T)₁₂₋₁₈ como cebadores para la transcriptasa reversa. Partimos de unos 2 µg de mRNA poli(A)⁺ en esta reacción.

2. El mismo kit de síntesis de cDNA permite la ligación de adaptadores *Eco* RI/*Not* I a los cDNA generados. Estos adaptadores tienen la siguiente secuencia:



Se resalta en negrita la diana *Not* I y el extremo protuberante es cohesivo con un extremo *Eco* RI. La principal ventaja de estos adaptadores es que permiten recuperar un cDNA intacto por digestión con *Not* I aún en el caso de que existan dianas *Eco* RI en el mismo.

3. Una vez añadidos los adaptadores a los cDNA procedimos a la ligación de estos con el vector λgt10, también digerido con *Eco* RI. El vector se obtuvo del proveedor Stratagene (núm. cat. 233210) en forma de kit. Al igual que en los casos precedentes hemos seguido las instrucciones del proveedor.

4. Por último, procedimos al empaquetamiento de los fagos recombinantes en partículas fágicas funcionales. Para ello empleamos los extractos de empaquetamiento Gigapack II Gold (núm. cat. 200214) del proveedor Stratagene. Con 2 µl de los 11 µl totales en los que se llevó a cabo la ligación del cDNA con adaptadores y los brazos del vector, conseguimos un total de 200000 clones primarios, en este caso suficiente para la purificación de varios cDNAs de la región.

9. TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS

9.1. Electroforesis de DNA

Para la separación de fragmentos de DNA hemos utilizado dos técnicas, la electroforesis en geles de agarosa y la electroforesis en geles de poliacrilamida.

En el primer caso, hemos seguido los procedimientos estándar descritos en Ausubel y col. (1988) y Sambrook y col. (1989). La concentración de los geles de agarosa ha variado entre 0.4 y 2%, dependiendo del tamaño de los fragmentos a separar, y se han preparado en tampón TBE 1X (tampón Tris-Borato-EDTA, Sambrook y col. 1989) en presencia de bromuro de etidio (0,5 mg/ml). Como patrón de pesos moleculares se ha empleado el fago λ digerido con *Hind* III

para tamaños grandes (B.M., núm.cat. 1292609) y el marcador número VI de Boehringer Mannheim (núm. cat 1062 590) para fragmentos entre 2 kb y 154 pares de bases.

En el segundo caso, hemos empleado la electroforesis en geles de poliacrilamida para la separación de los fragmentos marcados durante la secuenciación de DNA, utilizando el sistema de electroforesis Macrophor de Pharmacia-LKB. Los geles se han preparado a partir de una mezcla (instagel) que incluye todos los componentes, excepto el persulfato amónico y el TEMED. El instagel se compone de acrilamida al 8% (a partir de un stock de acrilamida:bisacrilamida (19:1) al 40%), urea 7M y TBE 1X. Esta solución puede almacenarse durante varios meses guardada en oscuridad y a temperatura ambiente. Para la polimerización de los geles se ha utilizado el persulfato amónico (B.M. num. cat. 103735) al 0,1% final y el TEMED (B.M. num. cat. 100139) al 0,12% final. Sólo se han preparado dos tipos de geles, unos de 0,2 mm de grosor (geles para lecturas lejos del cebador) y otros en gradiente de grosor de 0,2 a 0,4 mm para lecturas cercanas al cebador. Los primeros se han desarrollado a un voltaje de 1500V durante unas 16 horas y los segundos (en gradiente de grosor) a 2500V durante 2-3 horas. Tras la electroforesis, los geles se han fijado durante 20 minutos en agitación en ácido acético al 10% y secado. Finalmente, hemos obtenido su autorradiografía exponiendo unas 48 horas.

9.2. Electroforesis de RNA

Las electroforesis de mRNA poli(A)⁺ para la transferencia de Northern Blot se realizaron en condiciones desnaturalizantes, utilizando un gel de agarosa al 1% con formaldehído, según el método descrito en Sambrook y col. (1989). En cada carrera utilizamos unos 3 µg de mRNA poli(A)⁺ y, como marcador de pesos moleculares, una mezcla de RNAs comercializada por Boehringer Mannheim (núm. cat. 1062 620). Las electroforesis se desarrollaron a 100 V durante 4 horas aproximadamente, en ausencia de bromuro de etidio. Posteriormente, cortamos la porción del gel donde se encontraba el marcador y procedimos a teñir sólo esta porción.

9.3. Purificación de fragmentos de DNA

En los casos en que ha sido necesario purificar un fragmento de restricción a partir de plásmido, fago o cósmido para su posterior subclonación o marcaje con digoxigenina, hemos seguido esencialmente dos protocolos. En primer lugar, la electrolución del DNA a partir del fragmento de gel de agarosa donde ha migrado en el gel preparativo (protocolo descrito en Sambrook y col. (1989) con las modificaciones de Pérez-Alonso, 1989) seguido de fenolización y precipitación con etanol. El rendimiento de esta técnica no es alto (aproximadamente un 50% del DNA de partida) pero proporciona un DNA de elevada pureza, pues se extrae con fenol-cloroformo. En segundo lugar, hemos empleado el kit QIAEX (núm. cat. 20020), basado en la

solubilización mediante un agente caotrópico potente de la matriz de agarosa donde tenemos el DNA. El DNA, una vez liberado, se une a una matriz de sílice. Esta unión es reversible y el DNA se concentra en el último paso eluyendo en un volumen muy pequeño. Hemos seguido las recomendaciones del proveedor y el rendimiento ha sido generalmente muy bueno (del 80-90%), aunque esta técnica es muy sensible al pH de la agarosa, y si éste es mayor de 7.5 el rendimiento baja drásticamente.

10. RASTREOS DE GENOTECAS DE DNA GENÓMICO

10.1. Rastreos de genotecas en fago lambda.

La genoteca en fago lambda empleada fue cedida por el Dr. Tom Weaver (Departamento de Anatomía, Universidad de Cambridge), aunque fue realizada originalmente por el Dr. John Tamkun (Dept. de Biología, Div of Natural Sciences, Sinsheimer labs, Santa Cruz, California). La genoteca está construida en el vector λ EMBL3 con DNA genómico de la cepa Oregon-R de *Drosophila melanogaster*.

Para la propagación del bacteriófago λ EMBL3 hemos utilizado como bacteria huésped la cepa K802 de *E. coli*, descrita en el apartado 1.2.1. El protocolo seguido para la preparación de bacterias aptas para la infección ha sido el descrito en Sambrook y col. (1989), con las modificaciones de Pérez Alonso (1989). Hemos comprobado que estas células pueden ser empleadas satisfactoriamente hasta 3 semanas después de su preparación cuando se conservan a 4°C.

En cada rastreo genómico hemos empleado 4 ó 5 equivalentes genómicos (un equivalente genómico son unos 10000 clones λ independientes en *Drosophila melanogaster*) para tener la seguridad de identificar varios clones distintos de la misma región. La siembra de estos fagos se ha realizado en placas petri de 90 mm de diámetro según el protocolo descrito en Kaiser y Murray (1985). Para cada infección hemos empleado un volumen de 100 a 200 μ l de células y unos 10000 fagos en un volumen que depende de la concentración de la genoteca (pfu/ml).

La detección de clones positivos se realizó según el método descrito en Kaiser y Murray (1985) y Sambrook y col. (1989), con las modificaciones necesarias para la hibridación con una sonda no radiactiva descritas en Boehringer Mannheim (1993).

Respecto a las condiciones de hibridación, concentración de sonda, lavados y detección hemos seguido los mismos protocolos que para las hibridaciones en Southern Blot ya comentadas (ver el apartado 5.1.1).

Dado el elevado número de clones de partida, resulta imposible purificar un clon positivo en un solo paso. En general, ha sido necesario coger la región de la placa donde aparecía un clon positivo, permitir la difusión de los fagos en 500 μ l de tampón SM (ver composición en Sambrook y col. 1989) y sembrar de nuevo a diluciones elevadas (aproximadamente 200-400

clones por placa). La hibridación de las réplicas en filtro de estas placas sí que ha permitido, normalmente, aislar un único fago. En determinados casos ha sido necesario más de un paso de purificación dado que diluciones muy elevadas en el primer paso de purificación conducían a la pérdida del clon positivo. Como caso especial, durante el paseo cromosómico entre los cósmidos 85D4 y 50A10 (ver resultados), en la purificación de los clones hibridamos éstos con una sonda del extremo del clon anterior, y un filtro réplica de la misma purificación con una sonda interna del mismo clon. Esto redujo drásticamente el número de clones a purificar y aumentó la distancia avanzada. Por ejemplo, de 15 clones positivos iniciales en el primer paso, sólo dos cumplían la condición de hibridar con la primera sonda pero no con la segunda.

Una vez obtenido el fago puro se realizó la extracción de su DNA (ver el apartado 3.3) para su posterior análisis de restricción y la comprobación de su procedencia de la región correcta, tanto por Southern Blot como por hibridación *in situ* en cromosomas politénicos.

10.2. Rastreo de genotecas en cósmido

Con objeto de cubrir regiones genómicas mayores procedimos al rastreo de una genoteca de DNA genómico en cósmido (vector Lawrist4) cedida por el Dr. Jörg Hoheisel (Angewandte Tumorstudiologie (ATV) Molekulargenetische Genomanalyse, Raum H603, Im Neuenheimer Feld 280, D-69120, Heidelberg) y descrita en Hoheisel y col. (1991). Esta genoteca ha sido construida con DNA genómico total de la cepa Canton-S de *Drosophila melanogaster* y consiste en un filtro donde están dispuestos, ordenadamente, 96 X 96 cósmidos que suponen un total de dos equivalentes genómicos. La hibridación de este filtro se realizó siguiendo los protocolos descritos para los Southern Blot (ver el apartado 5.1.1) con la detección luminiscente que permite su reutilización.

11. RASTREO DE GENOTECAS DE cDNA

11.1. Genoteca embrionaria preparada en λ gt10 (4-17h)

En este caso, el procedimiento empleado ha sido, en todo, el mismo que para el rastreo de genotecas genómicas, excepto que la cepa bacteriana utilizada es la C600Hfl⁻ de *E.coli*.

El rastreo se realizó sobre aproximadamente 100000 pfu y, tras obtener el DNA de los clones positivos y confirmar que la señal era correcta mediante Southern Blot, procedimos a la subclonación de los cDNAs en plásmido y a la secuenciación de sus extremos.

11.2. Genoteca embrionaria preparada en plásmido (12-24h)

Este rastreo se realizó siguiendo el protocolo recomendado por Boehringer Mannheim (1993) sobre aproximadamente 450000 colonias. Dada la necesidad de una eficacia de transformación muy elevada, hemos utilizado células competentes del proveedor GibcoBRL (MAX Efficiency DH5 α , núm. cat. 18258-012), siguiendo el protocolo suministrado con las mismas. Tras cada transformación, hemos sembrado distintas diluciones para calcular el número de transformantes por ml.

A efectos prácticos debe destacarse que las señales de hibridación empleando esta genoteca han sido siempre débiles y propensas a los falsos positivos.

12. MAPAS DE RESTRICCIÓN

Para obtener el mapa de restricción de los distintos clones genómicos purificados en la clonación de la región hemos seguido estrategias diferentes en el caso de tratarse de fagos, en el vector λ EMBL3, o de cósmidos, en el vector Lawrist4.

Para clones de fagos se ha seguido la estrategia convencional de realizar todas las digestiones simples y dobles de los enzimas de restricción en cuestión. En nuestro caso hemos localizado los sitios *Sal* I, *Bam* HI, *Eco* RI y *Hind* III por encontrarse los tres primeros en el sitio de clonación múltiple del vector λ EMBL3, y el último por cortar sólo una vez en el brazo corto del vector. Tras el cálculo de los tamaños de los distintos fragmentos de restricción puede proponerse un orden lineal de sitios de restricción. Nótese que en este vector *Sal* I libera el inserto completo, pues corta en el sitio de clonación múltiple. En caso de no poder ordenar los sitios, debido a que sólo un enzima corta en una región del clon, se recurrió a la técnica de las digestiones parciales. Para ello necesitamos una sonda del extremo del fragmento en el que están los sitios a localizar. Cada digestión parcial consistió en, aproximadamente, 250 ng de DNA del fago y una concentración de enzima variable de 16U, 8U, 4U, 2U, 1U y 0.5 U. Esta mezcla fue incubada durante una hora a 37°C y las digestiones paradas con 1 μ l de EDTA 0,5M y congeladas a -20°C o cargadas inmediatamente en un gel de agarosa al 0,8%. Este gel fue transferido a una membrana de nylon e hibridado frente a una sonda del extremo del fragmento de restricción que contiene los sitios a colocar.

En el caso de los cuatro cósmidos aislados, la estrategia ha sido menos directa. En primer lugar, hemos aclarado qué fragmentos eran comunes o solapaban con los clones de fagos ya analizados, basándonos principalmente en los tamaños de los fragmentos de restricción y mediante hibridación en filtro. Posteriormente, bien se subclonó, por ejemplo en el caso del cósmido 85D4 un fragmento *Bam* HI de aproximadamente 12 kb y se aclararon todos los sitios de restricción, o bien se determinaron sólo los sitios *Sal* I y *Bam* HI mediante digestiones

simples y dobles y con algunas hibridaciones, por ser estos dos enzimas mucho menos frecuentes en esta región genómica.

13. SECUENCIACIÓN DE DNA

13.1. *Obtención de secuencias*

El método empleado es el de terminación por incorporación de didesoxinucleótidos (Sanger y col. 1977). El nucleótido utilizado para el marcaje radiactivo de los fragmentos ha sido el $\alpha^{35}\text{S}$ -dATP (Amersham, num. cat. SJ1304), y el enzima la DNA polimerasa del fago T7 (Pharmacia, núm. cat. 27-0985-01). Los cebadores empleados para la secuenciación de los clones plasmídicos han sido los universales directo y reverso en -22 (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3' y 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' respectivamente) y los cebadores directo y reverso en -60 (5'-CGAAAGGGGGGATGTGCTGCAA-3' y 5'-ACACTTTATGCTTCCGGC-3' respectivamente), estos últimos descritos en Paricio (1993). En algunas ocasiones se han utilizado oligonucleótidos diseñados específicamente para rellenar huecos en la secuencia no cubiertos por deleciones.

Para cada reacción de secuenciación se han utilizado unos 2 μg de DNA plasmídico procedente de minipreparaciones, y hemos seguido el protocolo recomendado en el kit de secuenciación de la polimerasa T7 de Pharmacia (núm. cat. 27-1682-01), con las modificaciones señaladas en Paricio (1993). Entre estas modificaciones se incluye la utilización de la mitad de la cantidad de nucleótido marcado radiactivamente y el incremento del tiempo de marcaje.

13.2. *Obtención de deleciones direccionales*

Ha sido necesario realizar deleciones seriadas durante la secuenciación completa del cDNA $\lambda\text{Dm.D}$ y del $\lambda\text{Dm.B}$, dado que sus tamaños relativamente grandes impiden la secuenciación directa desde los extremos de los clones. Para ello se ha utilizado el kit de Pharmacia "Double-stranded Nested deletion kit" (núm. cat. 27-1691-01), con las modificaciones descritas en Paricio (1993). El método explota la acción selectiva del enzima exonucleasa III sobre los extremos 5' protuberantes y romos para degradar selectivamente el inserto y no el plásmido donde está clonado. La acción de la exonucleasa III más la nucleasa S1 conducen a moléculas de DNA delecionadas en distinta medida. Esta mezcla de reacción ha sido ligada del modo descrito en el apartado 7.1 y de entre los recombinantes se han seleccionado, por tamaño, aquellos que presentaban deleciones crecientes pero cuyas secuencias podían solapar.

14. ANÁLISIS DE SECUENCIAS

Los estudios referidos al análisis de secuencias se han llevado a cabo en el Servicio de Bioinformática de la Universitat de Valencia, utilizando los programas del paquete informático GCG (Genetics Computer Group) de la Universidad de Wisconsin, instalado en un ordenador VAX de Digital.

El ensamblaje y la corrección de las secuencias obtenidas se ha realizado con los programas del paquete informático DNASTAR instalado en un ordenador Olivetti tipo PC.

Las búsquedas de similitudes en bases de datos se han realizado con el programa WORDSEARCH contenido en el paquete GCG. Los alineamientos y las comparaciones de parejas de secuencias se han realizado con los programas GAP y BESTFIT, del mismo paquete informático. Las búsquedas de pautas de lectura en los cDNAs se llevaron a cabo con el programa FRAMES, y el análisis de su posible capacidad para codificar una proteína con TESTCODE y CODONPREFERENCE.

15. ANÁLISIS GENÉTICO

15.1. Estudio de las fases de letalidad

Como primera aproximación al análisis de las cepas que han sido localizadas citogenéticamente en la misma región que PP2 o adyacentes a ella (ver el apartado 1.1) hemos estudiado su fase de letalidad. El análisis de esta letalidad se llevó a cabo cruzando machos de las distintas inserciones por hembras vírgenes de la cepa Oregon-R.

$$cn P[ry^+NNN]/CyO \times +/+$$

De la descendencia se seleccionaron tanto machos como hembras que no fueran *CyO*, y con estos individuos se estableció un nuevo cruce en botella.

$$cn P[ry^+NNN]/+ \times cn P[ry^+NNN]/+$$

Los descendientes de este cruce van a ser bien heterocigotos para la inserción, salvajes o tendrán la inserción en homocigosis, que es lo que pretendemos. En un cuarto de los individuos, pues, podremos estudiar el efecto de tener la inserción en homocigosis.

El estudio se realiza recolectando a mano unos 300 embriones del cruce anterior y agrupándolos en grupos de cinco en cinco. El objetivo de esto es poder contar con facilidad el número de embriones que han eclosionado o que han muerto. Debe tenerse en cuenta, a la hora de los recuentos, que no todos los huevos puestos por las hembras están fecundados. Estos

últimos tienen aspecto de recién puestos (blancos) aunque lleven días depositados, mientras que los fecundados pero muertos se verán oscuros, y a veces es posible observar estructuras del embrión en desarrollo.

15.2. Obtención de revertientes

En la región genómica que hemos clonado hemos podido identificar dos inserciones del vector PZ que se comportan como letales, la P976 y la P2336 (ver Resultados). Estas inserciones podrían ser dos alelos del gen PP2. Sin embargo, previamente debe demostrarse que la inserción es realmente la causa de la letalidad, y no cualquier otra mutación letal que haya podido fijarse en ese cromosoma gracias a estar frente a un cromosoma con letales equilibrados, que permite su mantenimiento en heterocigosis.

El protocolo que hemos seguido en este caso es esencialmente el descrito en Fasano y col. (1991) y que consiste en colocar una fuente genómica estable y constitutiva de transposasa en el genoma en que se encuentra la inserción para provocar su movilización. Como fuente de transposasa hemos empleado un elemento P modificado mediante técnicas de Biología Molecular de tal modo que porta un marcador fenotípico de color de ojos (gen *rosy*), y una deleción entre los exones 2 y 3 que sólo le permite codificar para transposasa (Robertson y col. 1988). El cromosoma va marcado con la mutación dominante *Stubble* (*Sb*, quetas cortas) y la recesiva *ebony* (*e*, cuerpo oscuro). Este cromosoma está equilibrado frente a TM6 que lleva, entre otros marcadores recesivos, un alelo dominante *Ultrabithorax* (*Ubx*, halterio ligeramente mayor y más aplanado que el salvaje debido a la transformación homeótica de halterio a ala). Más información sobre los cromosomas equilibradores y sobre los fenotipos de las mutaciones marcadoras puede obtenerse en Ashburner (1989) y en Lindsley y col. (1992). En este primer cruce seleccionamos aproximadamente 100 hembras vírgenes de la inserción P976 y las cruzamos por unos 50 machos de la cepa portadora de la fuente de transposasa. El cruce se realiza en botella.

$+/+; cnP[ry^{+976}]/CyO; ry/ry \times w/-; +/+; P[ry^{+\Delta 2-3}](99B)Sbe/TM6$

Los genotipos posibles para cada cromosoma en la descendencia son los siguientes:

Cromosomas sexuales	Cromosoma 2	Cromosoma 3
$+/w$	$cn P[ry^{+976}]/+$	$P[ry^{+\Delta 2-3}](99B)Sbe/ry$
$+/-$	$+/CyO$	$ry/TM6$

De esta descendencia seleccionamos aquellos machos que fueran de quetas cortas (*Sb*), y por tanto, portadores de la fuente de transposasa, y de alas normales pues la inserción P976

queda frente a un cromosoma salvaje. Se muestran estos genotipos en negrita. Estos machos fueron cruzados por una cepa portadora de una mutación letal en el cromosoma 2 más los marcadores recesivos *cinnabar* (*cn*, ojos brillantes) y *brown* (*bw*, ojos marrones). Este cromosoma está equilibrado con un cromosoma *CyOSbw* que, además de llevar el marcador recesivo *cn*, tiene también *Star* (*S*) y *bw*. En el cromosoma 3 esta cepa lleva los dos cromosomas equilibradores *MKRS* y *TM2ry*. El primero de ellos está marcado fenotípicamente con las mutaciones recesivas *kar* (*karmoisin*, ojos como *st* pero menos brillante) y *ry*, así como la dominante *Sb*. *TM2ry* lleva el marcador dominante *Ubx* y varios otros recesivos. Este cruce se realiza en botella.

$$\begin{array}{c}
 +/-; cnP[ry^{+976}]/+; P[ry^{+\Delta 2-3}](99B)Sbe/ry \\
 \times \\
 +/+; l(2)cnbw/CyOSbw; MKRS/TM2ry
 \end{array}$$

Los genotipos posibles para cada cromosoma en la descendencia son los siguientes:

Cromosomas sexuales	Cromosoma 2	Cromosoma 3
+/+	<i>cnP[ry+976]/l(2)cnbw</i>	" <i>P[ry+Δ2-3](99B)Sbe/MKRS</i> "
+/-	<i>cnP[ry+976]/CyOSbw</i>	<i>P[ry+Δ2-3](99B)Sbe/TM2ry</i>
	<i>l(2)cnbw/+</i>	<i>ry/MKRS</i>
	<i>CyOSbw/+</i>	<i>ry/TM2ry</i>
	<i>cnP[ry-976]/l(2)cnbw</i>	
	<i>cnP[ry-976]/CyOSbw</i>	

De esta descendencia es posible seleccionar aquellos individuos que han perdido la inserción por su color de ojos naranja. Este color se debe a una doble mutación *cnry* y que sólo aparecerá en los individuos que hayan perdido la inserción P976, pues en el cromosoma 3 toda la descendencia es mutante *ry* (excepto los individuos que porten la fuente de transposasa que serán *cn* o salvajes) y en el 2 son mutantes *cn*. Así pues, sólo si se pierde la inserción en la movilización, el individuo será doble mutante *cnry*, pues el transposón está marcado fenotípicamente con *ry*. Este suceso se reconocerá fácilmente por el color de ojos naranja.

Entre comillas se señala un genotipo letal y en negrita los genotipos relevantes. Fueron seleccionados como revertientes todos los machos con color de ojos naranja (portaran o no el equilibrador *CyOSbw*) y las hembras portadoras del cromosoma equilibrador *CyOSbw*, independientemente de que fueran vírgenes o no. En el primer caso, los machos fueron

cruzados por la cepa *l(2)cnbw/CyOSbw; MKRS/TM2ry* con el fin de obtener descendencia de ellos que permitiera establecer un stock. En el segundo, permitimos a las hembras dejar descendencia y seleccionamos de entre los machos aquellos que fueran de color de ojos revertiente. Estos machos fueron cruzados del modo descrito previamente para los machos revertientes originales.

A efectos prácticos, debe destacarse que el color de ojos de los revertientes cambia considerablemente con la edad de la mosca. Este efecto se debe a la oxidación de pigmentos que oscurecen el ojo. Asimismo, dado que la viabilidad de los mutantes de color de ojos es menor que la del tipo salvaje, pues tienen afectadas rutas metabólicas importantes, no es conveniente que el cultivo presente una gran competencia pues podríamos perder, selectivamente, los dobles mutantes *cnry*.

A continuación se detalla el cruce realizado para un macho revertiente equilibrado frente a *CyOSbw*. Del mismo modo se procedió con aquellos machos revertientes de alas normales y con cualquier genotipo en el cromosoma 3 (por ser revertientes para ojos no pueden llevar la transposasa y serán bien *MKRS/ry* o *TM2ry/ry*). Tal como se indica más arriba, a las hembras equilibradas frente a *CyOSbw* se les permitió dejar descendencia y, de entre los machos de la misma, se seleccionaron aquellos con fenotipo de ojos revertiente, que fueron cruzados del mismo modo que los machos revertientes originales. Los cruces se realizaron en tubos individuales para cada revertiente y empleamos de tres a cinco hembras vírgenes por macho. Nótese que la combinación de alelos *cnbw* en el cromosoma portador del *l(2)* es necesaria para poder seguir el cromosoma que ha perdido la inserción, pues dará ojos blancos frente a *CyOSbw*, mientras que frente al revertiente será fenotípicamente naranja (*cnry*). A su vez, es necesario que exista un letal para poder mantener el stock.

$$\begin{array}{c}
 +/-; cnP[ry^{976}]/CyOSbw; ry/MKRS \\
 \times \\
 +/+; l(2)cnbw/CyOSbw; MKRS/TM2ry
 \end{array}$$

Los genotipos posibles para cada cromosoma en la descendencia son los siguientes:

Cromosomas sexuales	Cromosoma 2	Cromosoma 3
+/+	<i>cnP[ry⁹⁷⁶]/l(2)cnbw</i>	<i>MKRS/ry</i>
+/-	<i>cnP[ry⁹⁷⁶]/CyOSbw</i>	<i>MKRS/TM2ry</i>
	<i>l(2)cnbw/CyOSbw</i>	" <i>MKRS/MKRS</i> "
	" <i>CyOSbw/CyOSbw</i> "	<i>TM2ry/ry</i>

En **negrita** se destacan los genotipos seleccionados para establecer los stock de cada revertiente.

Respecto a la inserción **P2336** se ha seguido el mismo esquema de cruzamientos que el descrito para la cepa **P976**, pero no hemos podido detectar ningún revertiente. Aparentemente esta inserción ha sufrido alguna mutación que la ha hecho defectiva e incapaz de ser movilizada de nuevo con transposasa.

RESULTADOS

1. DESCRIPCIÓN DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE LA INSERCIÓN PP2

La inserción de elementos P especiales, portadores de genes cuya expresión puede detectarse con gran facilidad ("informadores"), pone de manifiesto el patrón de expresión que confiere un enhancer cercano a un gen. En nuestro caso, la cepa PP2 lleva insertado el transposón P-lArB, y su expresión puede detectarse por la actividad enzimática de la β -galactosidasa, o mediante una detección inmunohistoquímica de la misma. Deben tenerse en cuenta, sin embargo, varios aspectos a la hora de interpretar los patrones de expresión resultantes. En primer lugar, existirá un cierto retraso entre la activación de la expresión del gen *lacZ* del elemento P-lArB, y la acumulación de suficiente cantidad de enzima funcional para que pueda ser detectado. En segundo lugar, el enzima β -galactosidasa es muy estable, y puede permanecer en una estructura, o en las generadas a partir de ella, mucho después de que la activación del gen *lacZ* haya cesado. Por último, aunque la inserción pone de manifiesto el patrón de expresión que confiere un enhancer a un gen cercano, se esperan diferencias entre el patrón detectado con el elemento P-lArB y el del gen salvaje. A continuación veremos el patrón de expresión de la cepa PP2 con ambos métodos de detección.

1.1. Detección de la actividad enzimática β -galactosidasa

Como hemos visto, es posible detectar directamente la producción de β -galactosidasa mediante el sustrato artificial X-gal, que el enzima convierte en un producto coloreado allí donde se está expresando el gen *lacZ*.

En la figura 1-1 se presenta el patrón de expresión de la cepa PP2 en embrión y en larva. Como puede observarse, la expresión embrionaria se restringe fuertemente al mesodermo somático y al sistema nervioso central. Esta especificidad por el mesodermo, que en estadios tardíos abarca a toda la musculatura somática (figura 1-1c), es la observación que nos llevó a emprender la caracterización molecular del gen PP2. La expresión en el SNC es muy compleja y dinámica. Se inicia en forma de dos grupos de células, simétricas respecto a la línea ventral del embrión, repetidas metaméricamente (ver figura 1-1b). En estadios más tardíos, otras muchas células del SNC empiezan a transcribir *lacZ* (figura 1-1d), aunque no pueden ser asignadas con certeza en base a criterios morfológicos.

Por otra parte, destaca la gran diferencia entre los niveles de expresión en los segmentos torácicos y los abdominales, especialmente en embriones donde la expresión de β -galactosidasa

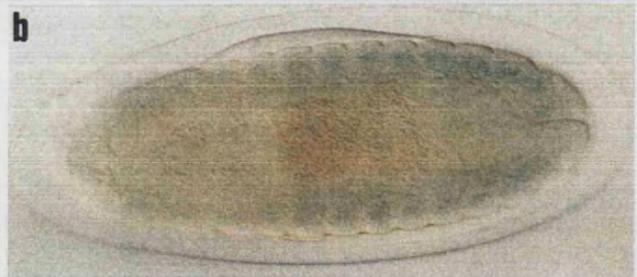
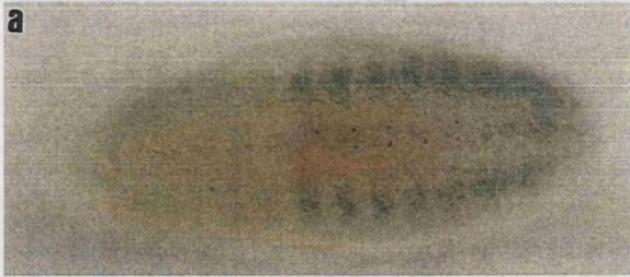
se ha iniciado recientemente (figura 1-1a y b). Para una descripción más detallada del patrón embrionario ver el siguiente apartado.

Respecto a la expresión en larva, hemos detectado β -galactosidasa en el SNC, y en el disco imaginal de ojo-antena. En el SNC, la expresión se ve claramente restringida al cerebro y al ganglio ventral de la larva, mientras que no se detecta señal en los lóbulos ópticos (figura 1-1e,f,g). Esta producción de β -galactosidasa sigue un patrón concreto y complejo pues marca células en particular. El ejemplo más claro es la expresión en el ganglio ventral. Este ganglio está organizado en una región central, el neuropilo, y un córtex, en el que se sitúan los cuerpos celulares de las motoneuronas e interneuronas (Truman y col. 1993). En el córtex, pueden observarse que sólo ciertas neuronas expresan fuertemente β -galactosidasa. Esta expresión en neuronas concretas del SNC podría indicar una función del gen PP2 en la formación del SNC adulto, pues, al contrario de otras estructuras larvarias, el SNC de la larva persiste durante la metamorfosis y no se histoliza (Truman y col. 1993).

Respecto a la expresión en el disco imaginal de ojo-antena, lo más destacable es la presencia de β -galactosidasa detrás del surco morfogenético, durante la especificación de los fotoreceptores (figura 1-1h; esta fotografía ha sido cedida por Gerrit Begemann, EMBL, Heidelberg). Un patrón de expresión tan específico apunta a que el gen PP2 pueda tener alguna función en la especificación de los fotoreceptores en los ommatidios en desarrollo.

En el adulto, ante la posibilidad de que el gen identificado con la inserción PP2 pudiera tener algún efecto materno, hemos analizado la expresión de PP2 en ovarios diseccionados. Si esto fuera así, se esperaría que el gen en cuestión se expresara en las células foliculares durante la formación del óvulo. Sin embargo, en ninguna ocasión hemos observado señal en ovarios de la cepa PP2 y, aparentemente, el gen PP2 no se expresa en las células foliculares.

FIGURA 1-1. Patrón de expresión embrionario y larvario de la inserción PP2. Las fotos (a) y (b) corresponden a un mismo embrión, en estadio 14 aproximadamente, en el que puede observarse el inicio de la expresión en el SNC embrionario, así como la producción de β -galactosidasa en el mesodermo. Obsérvese también la fuerte diferencia en el nivel de señal de los segmentos torácicos y abdominales, aunque dada la estabilidad del enzima, este hecho puede reflejar tan sólo que en los segmentos abdominales la producción se ha iniciado previamente. En las fotos (c) y (d) se muestran dos visiones de un mismo embrión, en estadio 16 aproximadamente, con señal clara en la musculatura somática y en el SNC embrionario. Respecto a la expresión de la inserción PP2 en el SNC larvario, se presentan dos visiones, una más superficial (e), en la que pueden observarse ciertas células centrales en el neuropilo con señal, y otra media (f), en la que se observa mejor la especificidad por determinadas neuronas del córtex del ganglio ventral (señaladas con una flecha). En la foto (g) se presenta la especificidad por cerebro, y no lóbulo óptico, en la producción de β -galactosidasa (una flecha indica el límite entre cerebro y lóbulo óptico). En (h) se muestra un disco imaginal de ojo-antena de larva en tercer estadio, donde puede observarse la presencia de β -galactosidasa inmediatamente después del surco morfogenético (foto cedida por Gerrit Begemann, EMBL). El SNC larvario se ha diseccionado de la larva y está orientado con su extremo anterior arriba y posterior abajo. En esta, y en todas las figuras siguientes, los embriones están orientados con su extremo anterior a la izquierda y su extremo posterior a la derecha.



1.2. Detección inmunohistoquímica de β -galactosidasa

Hemos realizado una detección inmunohistoquímica de β -galactosidasa en embriones completos de la cepa PP2, con objeto de describir más detalladamente el patrón de expresión embrionario de la misma. Esta técnica proporciona un grado de resolución de estructuras embrionarias mucho mayor que la detección directa de la actividad enzimática y, por tanto, nos centraremos en estos datos para ilustrar el patrón espacial de expresión en la cepa PP2.

El primer aspecto que debemos señalar es que este patrón de expresión es muy complejo espacialmente, pues afecta, por una parte, a la musculatura embrionaria, un tejido de una elevada complejidad morfológica, y por otra parte, al SNC donde, prácticamente, no existen referencias morfológicas. Además, en el caso del SNC sólo determinadas células transcriben el gen *lacZ*, lo cual demuestra un gran refinamiento en el control espacial de la expresión del gen PP2 y hace difícil asignar estas células con certeza. Por otra parte, este patrón también es muy dinámico en el tiempo. Por todo ello, vamos a realizar una descripción pormenorizada por estructuras embrionarias, más que por estadios embrionarios, aunque haciendo referencia constante a éstos últimos (seguimos la clasificación de Campos Ortega y Hartenstein, 1985).

EPIDERMIS: La primera señal detectable en la cepa PP2 es epidérmica, en forma de 10 grupos de células laterales en el estadio 10 tradío (figura 1-2a), que algo más tarde se convierten en bandas de expresión (figura 1-2b). Entre estas últimas la producción de β -galactosidasa es ligeramente distinta y se observa una cierta alternancia de bandas algo más intensas y otras algo más débiles. De hecho, no sólo se observan intensidades distintas entre bandas, sino también entre células dentro de cada banda de expresión. Un ejemplo de este hecho se muestra en la figura 1-2c, donde se ha señalado con una flecha una célula marcada mucho más fuertemente que las circundantes.

Esta primera señal no se restringe a los segmentos abdominales y torácicos, sino que también afecta a los segmentos cefálicos, aunque de forma bastante difusa. En general, la producción de β -galactosidasa se concentra sobre todo en los segmentos mandibular y maxilar, estando relativamente libre de señal el segmento labial.

Más tarde en el desarrollo, esta expresión epidérmica parece mantenerse hasta los estadios 12-13, donde afecta sólo a algunos grupos de células. En la figura 1-2d se ilustra este patrón, aparentemente restringido a la porción posterior de los segmentos, en un embrión en retracción de banda germinal.

MESODERMO SOMÁTICO: La señal muscular es, probablemente, la más evidente de todas en la cepa PP2. Se inicia hacia el final de la etapa de retracción de la banda germinal, cuando puede observarse expresión en las masas de mesodermo por debajo de la epidermis (figura 1-2f). La señal, al igual que en la epidermis, parece restringirse inicialmente al compartimento posterior de cada segmento abdominal y torácico, aunque rápidamente se extiende a todo el mesodermo somático del segmento (figura 1-2g).

También hemos encontrado, de modo reproducible, que la señal en la porción ventral de los segmentos torácicos es sensiblemente menor que la de los abdominales. Este hecho puede observarse en distintos embriones (por ejemplo en 1-2d), pero especialmente en el embrión 1-2g, en el que hemos señalado con flechas los tres segmentos torácicos donde la señal es menor.

Posteriormente, tras la determinación de los músculos, puede detectarse β -galactosidasa en toda la musculatura somática de embriones tardíos (figuras 1-2 i, k, y l). Visto en conjunto, el patrón de expresión muscular parece ser más débil en los segmentos torácicos que en los abdominales.

Como hemos señalado anteriormente, este aspecto del patrón de expresión de la cepa PP2 es el que nos decidió a emprender su caracterización molecular. En concreto por dos motivos: en primer lugar, porque afecta inicialmente a parte del mesodermo somático y, posteriormente, a toda la musculatura de la larva, con lo cual podría tratarse bien de un gen necesario para la especificación de los músculos, o bien para la diferenciación muscular. En segundo lugar, porque la expresión ocurre en el momento del desarrollo en el que se están produciendo los fenómenos comentados: estadio 11 y 12 para especificar los músculos y estadio 13 en adelante para la diferenciación terminal de éstos.

MESODERMO VISCERAL: La expresión en este tejido no es muy aparente y, de hecho, sólo se detecta claramente en algunos embriones. En general, hemos encontrado señales relativamente fuertes en estadios tardíos de la embriogénesis, entre el 15 y el 17 (ver la figura 1-2e y 1-2j). En embriones más tempranos, como el mostrado en la figura 1-2f, parece seguirse el proceso de separación entre el mesodermo visceral y somático (comparar con la figura 7-1e), aunque en otras visiones, como la del embrión en 1-2e la señal parece afectar al intestino medio ("midgut") más que el mesodermo visceral.

VASO DORSAL: No hemos observado señal en el vaso dorsal en ningún estadio.

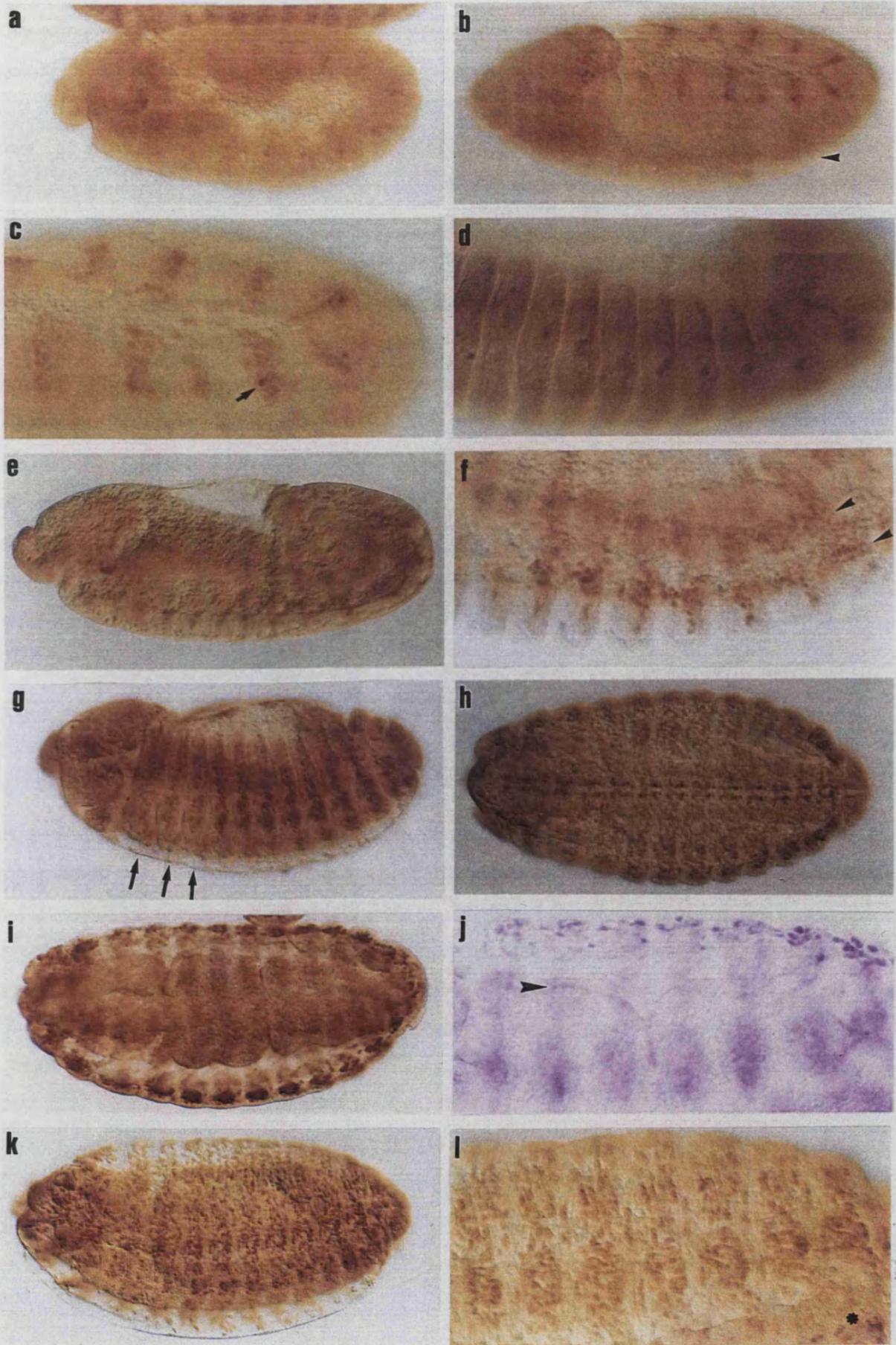
INTESTINO: En estadios muy tardíos, aparece claramente marcado la parte posterior del intestino ("hindgut"), y con menor claridad lo que parecen distintas partes del intestino medio y cloaca gástrica.

SISTEMA NERVIOSO CENTRAL: La inserción PP2 se detecta claramente en el sistema nervioso central (SNC) a partir del estadio 13 y hasta el final de la embriogénesis. La señal más fuerte aparece según un patrón bastante regular, semejante a una escalera, de pares de células situadas simétricamente respecto del eje anteroposterior. Además de estas células, otras muchas expresan la β -galactosidasa siguiendo un patrón repetitivo, aunque menos regular, que el de las anteriores.

2. POSICIÓN CITOGÉNÉTICA DE LA INSERCIÓN PP2

Dado que la inserción del transposón P-lArB en la cepa PP2 es viable en homocigosis, aunque el stock se mantiene frente al cromosoma *CyO*, sus larvas pueden emplearse directamente para determinar la posición citogenética del elemento. Sólo debe tenerse en cuenta que dos tercios de las preparaciones serán heterocigóticas para la inserción, y esto puede observarse en la preparación por la ausencia de apareamiento correcto entre las cromátidas, y un tercio de ellas serán homocigóticas para la inserción, y por tanto adecuadas para la hibridación *in situ* (la mutación *Cy* provoca letalidad, en homocigosis, en fase de embrión tardío o larva temprana, ver Lindsley y Zimm, 1992).

FIGURA 1-2. Patrón de expresión embrionario de la cepa PP2 detectado mediante un anticuerpo anti- β -galactosidasa. A continuación detallamos el estadio embrionario aproximado de cada embrión, así como el aspecto del patrón de expresión que se pretende ilustrar en cada caso. (a) Embrión en estadio 10 aproximadamente, cuando se observa la primera señal epidérmica. (b) Algo más tarde, los grupos iniciales de células se convierten en bandas de expresión epidérmica. Con una flecha se señala el surco ventral. (c) Detalle a mayor aumento del embrión anterior donde se aprecian células mucho más marcadas que las circundantes (flecha en c). La foto en (d) muestra un embrión en retracción de banda germinal (estadio 12) con el patrón epidérmico típico, que afecta a la porción posterior de los segmentos y a grupos de células en los mismos. Nótese la diferencia en el nivel de expresión de los segmentos torácicos y abdominales. Un embrión en el mismo estadio, pero en un enfoque a nivel medio (e), demuestra el inicio de la expresión *lacZ* en el mesodermo visceral y en el somático. Detalle a mayor aumento de la expresión somática y visceral (f). Con cabezas de flechas se indica la señal en el mesodermo somático y visceral, que en este estadio se están separando. El embrión en (g) muestra distintas intensidades entre los segmentos torácicos y abdominales en la porción ventral (estadio 14 aproximadamente). Detalle de la expresión en el SNC de un embrión tardío (h) en el que también puede apreciarse la existencia de señal en la musculatura. Los embriones en (i), (k) y (l) ilustran la expresión muscular generalizada de la cepa PP2. En el embrión (i) y, especialmente, en (j) se puede observar la presencia de β -galactosidasa en el mesodermo visceral (señalado con una flecha en este último). La foto en (l) muestra un detalle de la musculatura somática ventro-lateral. Con un asterisco se marca el SNC.



Como sonda empleamos el plásmido pUR290 completo (que incluye gran parte de la porción 3' del gen *lacZ*), proporcionado por el Profesor Juan Modolell (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC). La señal resultó ser única y centrada en la región 54A del cromosoma 2. Esta hibridación *in situ* se realizó, sin embargo, marcando la sonda radioactivamente y, dada la baja resolución de esta técnica, nos remitimos a un *in situ* posterior (ver la figura 4-4), para ilustrar la posición citogenética del gen PP2.

Una búsqueda en la base de datos de *Drosophila* "Flybase" indicó que sólo se había caracterizado a nivel molecular un gen en la región 54A. En concreto, se trata de dos genes estructurales para la α -amilasa, duplicados y situados ambos en un intervalo de sólo 11 kb. Un clon genómico de la cepa Canton-S con los dos genes hibrida en la región 54A1-54B1 (Gemmill y col. 1985). Sin embargo, no se espera de un gen estructural para la α -amilasa que tenga un patrón de transcripción tan peculiar como el detectado para el gen que hemos identificado en la cepa PP2. De hecho, el intestino medio es el tejido donde se observa mayor actividad α -amilasa, y el patrón de β -galactosidasa en este tejido no es especialmente claro. Así pues, con estas evidencias de que estábamos ante un gen que no había sido caracterizado previamente, procedimos a iniciar su clonación y análisis.

3. CLONACIÓN DEL DNA GENÓMICO ADYACENTE A LA INSERCIÓN

3.1. Determinación de un fragmento híbrido inserción-DNA genómico

Con objeto de confirmar la presencia del elemento P-1ArB en el genoma de la cepa PP2 realizamos un Southern Blot con DNA genómico total de individuos adultos de la misma. Empleamos como sonda el plásmido pUC18, ya que hibrida con el segmento Bluescript del transposón (ver la figura 7-1 de Material y Métodos). Además, al digerir el DNA genómico con enzimas de restricción presentes en el sitio de clonación múltiple de Bluescript, esta hibridación nos permite determinar la existencia de un fragmento híbrido de DNA genómico más plásmido, de tamaño adecuado para el rescate del mismo. El resultado de la hibridación en filtro se muestra en la figura 3-1.

En este filtro la carrera 5 es una digestión doble *Hind* III/*Bam* HI que libera el plásmido Bluescript entero, y sirve como control de la hibridación y del tamaño del plásmido. En las carreras 1, 2, 3 y 4 puede observarse el incremento en tamaño debido a la presencia de un cierto DNA genómico extra, el que se sitúa entre el extremo del plásmido y el primer sitio de restricción genómico para el enzima en cuestión. En concreto, se trata respectivamente de las

digestiones con los enzimas *Hind* III, *Sal* I, *Xho* I y *Kpn* I que están presentes en el sitio de clonación múltiple del Bluescript, pero no en dirección 3' en el resto de la secuencia del transposón P-IArB (ver la figura 3-1 y la 3-2).

Dado el gran tamaño de los fragmentos generados con los enzimas *Sal* I y *Xho* I, que probablemente no podrían ser rescatados, decidimos concentrarnos en las digestiones *Hind* III y *Kpn* I, de unos tamaños mucho más apropiados para su clonación en plásmido.

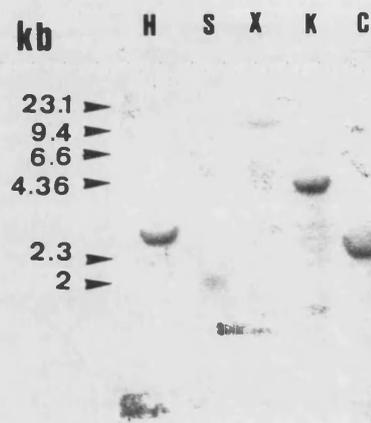


FIGURA 3-1. Fragmentos genómicos de la cepa PP2 portadores del plásmido Bluescript. La sonda empleada ha sido el plásmido pUC18. Abreviaturas empleadas: H, *Hind* III; S, *Sal* I; X, *Xho* I; K, *Kpn* I; C, digestión control *Hind* III/*Bam* HI. El marcador mostrado en el fago lambda digerido con *Hind* III. Ver el texto para más detalles.

3.2. Rescate del plásmido Bluescript de P-IArB

Hemos aislado el DNA adyacente a la inserción siguiendo la estrategia del rescate plasmídico (ver el apartado 7.2 de Material y Métodos y la figura 3-2). En concreto, empleamos las digestiones de DNA genómico con *Hind* III y *Kpn* I para realizar una ligación y transformar *E.coli*, pues el tamaño del fragmento híbrido DNA genómico-Bluescript es muy apropiado para tener éxito en la clonación (ver apartado anterior). De la primera ligación obtuvimos dos plásmidos, pDmPP2.H1 y pDmPP2.H2 y de la segunda uno sólo, pDmPP2.K1. Sin embargo, para la mayor parte del trabajo posterior nos centramos en este último plásmido pues una digestión *Kpn* I/*Not* I, que separa el DNA genómico de la parte plasmídica (ya que *Not* I está en el otro sitio de clonación múltiple del Bluescript) libera un fragmento de 2,3 kb de DNA genómico, en principio adyacente a la inserción. En el caso de los otros dos plásmidos pDmPP2.H1 y pDmPP2.H2 estas digestiones dobles liberan unos insertos de tan solo 0,5 kb.

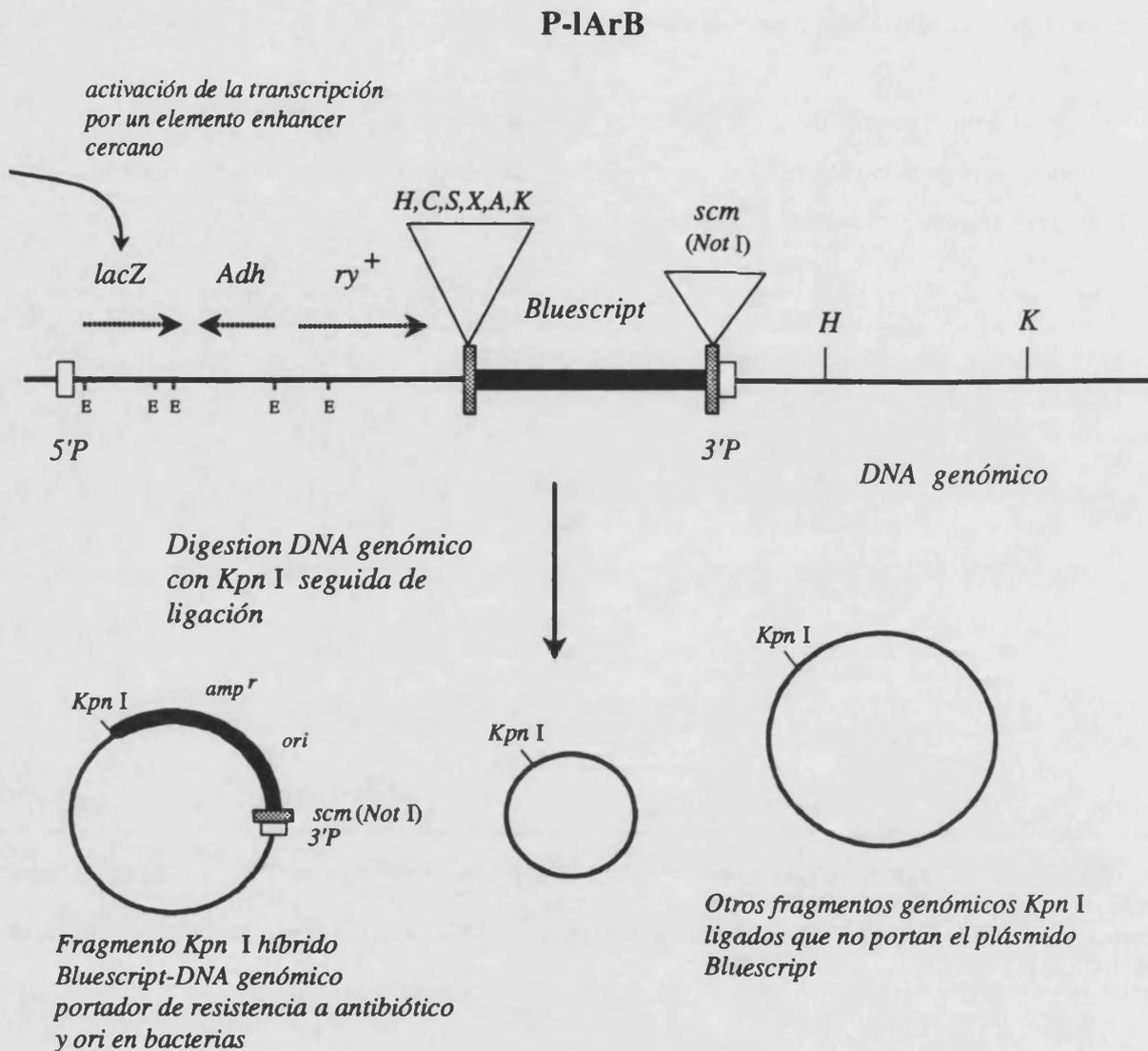


FIGURA 3-2. Esquema general de la estrategia para el rescate del plásmido del elemento P-lArB. En el DNA genómico hemos señalado varios sitios de restricción, desconocidos a priori. Tras una digestión adecuada del DNA genómico, se procede a la ligación de todos los fragmentos generados. Al transformar *E.coli* con el resultado de esta ligación, sólo los fragmentos circularizados que contengan un plásmido podrán propagarse en la bacteria, pues llevan un origen de replicación para *E.coli* (*ori*), y además, conferirán resistencia a ampicilina porque llevan un gen que codifica para una β -lactamasa (*amp*^r). Se han empleado las siguientes abreviaturas: H, *Hind* III; C, *Cla* I; S, *Sal* I; X, *Xho* I, A, *Apa* I; K, *Kpn* I; E, *Eco* RI y scm, sitio de clonación múltiple en el que se destaca la presencia de un sitio *Not* I entre paréntesis. Se han indicado los sitios *Eco* RI para ayudar en la interpretación de la figura 3-3. La figura no está dibujada a escala

Posteriormente, mediante un Southern Blot con DNA genómico de la cepa estándar Oregon R y con DNA genómico de la cepa PP2, hemos podido comprobar que el inserto del plásmido pDmPP2.K1 procede, en efecto, de las inmediaciones del punto de la inserción PP2. Empleando como sonda el inserto del plásmido pDmPP2.K1 sobre una digestión *Eco* RI (que

corta fuera de este inserto) en los DNA genómicos antes detallados, se espera detectar una variación en el tamaño del fragmento *Eco* RI que hibrida con pDmPP2.K1, si la inserción, en efecto, está en ese fragmento. Este Southern Blot se muestra en la figura 3-3 donde los tamaños observados son congruentes con esta interpretación tanto en la carrera control (Or-R) como en la PP2, teniendo en cuenta que *Eco* RI corta dentro del gen *rosy* del elemento P-lArB, a 7 kb del extremo de éste (ver la figura 3-3 y también la 3-2).



FIGURA 3-3 Resultado de un Southern Blot genómico de las cepas Oregon-R y PP2 utilizando como sonda el inserto del plásmido pDmPP2.K1. Puede observarse que el fragmento *Eco* RI que detecta el inserto de pDmPP2.K1 en la carrera con el DNA salvaje varía de tamaño en la carrera con DNA de la cepa PP2, demostrando que existe un DNA adicional en ese fragmento de restricción. Abreviaturas empleadas: S, DNA genómico total de la cepa Oregon-R; P, DNA genómico total de la cepa PP2; M, marcador de pesos moleculares, en este caso el fago lambda digerido con *Hind* III.

4. EXTENSIÓN DE LA REGIÓN GENÓMICA CLONADA

Hemos empleado distintas aproximaciones para conseguir la clonación de toda la región genómica (o gran parte de ella) donde se encuentra el gen que hemos detectado por la inserción PP2. En esencia ha constado de cinco etapas (ver la figura 4-1):

1. En una primera etapa obtuvimos dos clones lambda en un rastreo sobre una genoteca de DNA genómico. Empleamos como sonda el DNA genómico rescatado de la cepa PP2, es decir, el inserto del plásmido pDmPP2.K1. Estos clones fueron λ Dm.TE1 y λ Dm.TB1

2. En la segunda etapa, aislamos tres clones lambda empleando como sonda un clon de cDNA entero aislado previamente, λ cDm.D. Estos nuevos clones genómicos no solapaban con los primeros.
3. En tercer lugar, cubrimos el hueco entre ambos conjuntos de clones lambda mediante un cósmido (85D4), que solapaba con ambos.
4. Posteriormente, el grupo de Marek Mlodzik (EMBL, Heidelberg) aisló varios cósmidos de la región de donde procede el extremo 3' de dc12, un cDNA de disco imaginal de ojo aislado por este grupo. Entre estos cósmidos figuran el 50A10 y el 12E7, los cuales han sido situados en el paseo cromosómico en nuestro laboratorio.
5. Finalmente, tras dos etapas de paseo cromosómico en clones del fago lambda, hemos solapado el cósmido 85D4 con los cósmidos 50A10 y 12E7.

Cada uno de los siguientes apartados desarrolla una de estas etapas, excepto la número 4 que ha sido llevada a cabo por el grupo de Marek Mlodzik (EMBL, Heidelberg), aunque la localización de sus cósmidos sobre resto de paseo cromosómico y los mapas de restricción se han llevado a cabo en nuestro laboratorio.

De modo sistemático nos hemos asegurado de que ninguna hibridación "cruzada" de una sonda con un clon procedente de otra región del genoma, nos llevara a continuar el paseo cromosómico en una posición equivocada. Para ello, hemos comprobado que las sondas empleadas fueran de copia única mediante un Southern Blot frente a DNA genómico de la cepa Oregon-R. Se presentan estos resultados en la figura 4-2 para las dos sondas de la etapa 5. La sonda del primer rastreo fue empleada en un Southern Blot genómico para comprobar que el DNA rescatado en el plásmido pDmPP2.K1 procedía de las inmediaciones de la inserción PP2, y se muestra en la figura 3-3. La etapa 2 se realizó utilizando como sonda un cDNA, del que se puede esperar, como mucho, que presente algún dominio conservado. Por último, la etapa 4 se llevó a cabo en el grupo de Marek Mlodzik (EMBL, Heidelberg).

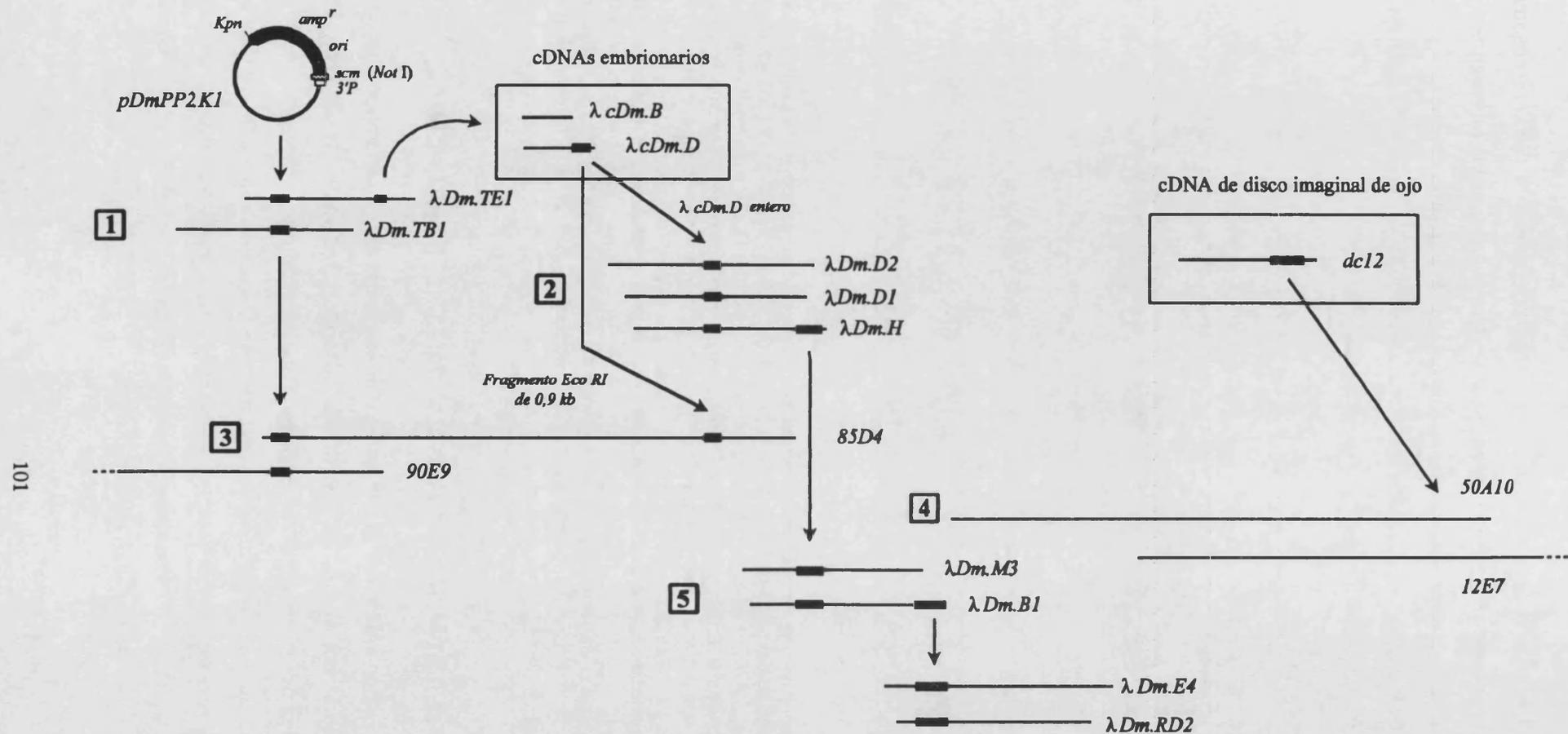


Figura 4-1. Representación esquemática de los distintos pasos que hemos seguido para la clonación de la región 54A. En trazo más grueso se representan las sondas empleadas en cada rastreo. Los tamaños de los clones son aproximados. Los cósmidos 90E9 y 12E7 continúan en 5' y 3' respectivamente. El plásmido *pDmPP2.K1* procede del rescate del plásmido realizado en la cepa con la inserción PP2 original. Los clones lambda proceden de una genoteca de Oregon-R y los cósmidos de una realizada a partir de Canton-S. El cDNA *dc12*, así como los cósmidos 50A10 y 12E7, han sido aislados por el grupo de Marek Mlodzik (EMBL, Heidelberg). Ver texto para más detalles.

Por otra parte, hemos confirmado, mediante hibridación *in situ* en cromosomas politénicos, que todos los clones aislados proceden de la región 54A o bandas adyacentes. En todos los casos, la señal de hibridación en cromosomas es única y en la región correcta.

Gran parte del DNA clonado en fagos y en el cósmido 85D4 se ha subclonado en el plásmido pUC19 para facilitar su manipulación o su secuenciación.

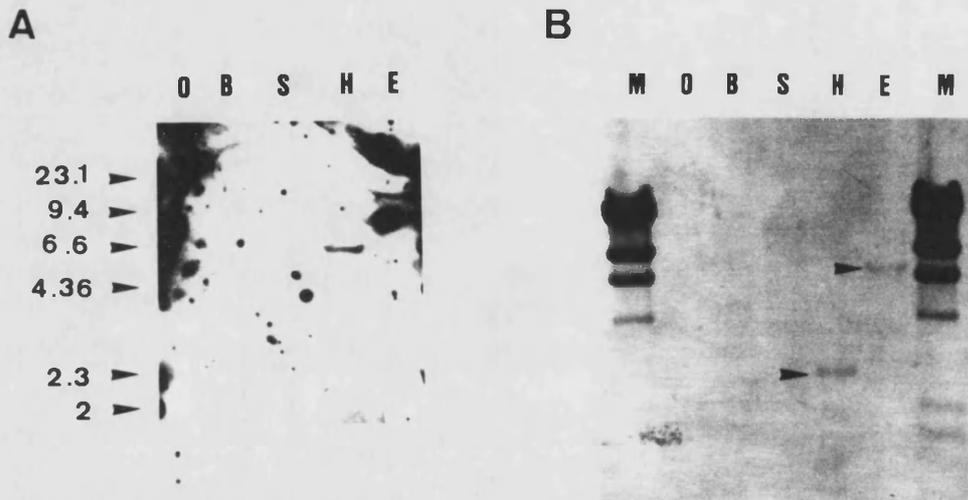


FIGURA 4-2: Southern Blot frente a distintas digestiones de DNA genómico total de la cepa Oregon-R con objeto de comprobar si dos sondas del paseo cromosómico son de copia única. En el Southern Blot (A) se presenta el resultado para el fragmento *Sal I/Bam HI* de 0,7 kb del extremo del clon λ Dm.H, empleada en el primer paso de la etapa 3 del paseo cromosómico. En el Southern Blot (B) se muestra el resultado con el fragmento *Bam HI* de 2,2 kb del extremo del clon λ Dm.B1 (este clon posee un sitio *Bam HI* en el extremo del inserto, que no está en el DNA genómico, sino que se genera en la clonación), empleado en el segundo paso esta misma etapa. En los dos casos, la señal en algunas carreras no es visible en la reproducción, pero sí en el original. Se han señalado con una cabeza de flecha las dos bandas más claras. Las dos sondas detectan bandas discretas, por lo que se descarta que contengan DNA repetitivo. Abreviaturas empleadas: O, DNA genómico total de Oregon-R sin digerir; B, digestión *Bam HI* del mismo DNA; S, digestión *Sal I*; H digestión *Hind III*; E, digestión *Eco RI*. M es el marcador de pesos moleculares (fago lambda digerido con *Hind III*).

4.1. Aislamiento de los primeros clones genómicos: λ Dm.TE1 y λ Dm.TB1

En este apartado vamos a describir el aislamiento de los primeros clones genómicos de la región 54A, empleando como sonda el inserto del plásmido rescatado de la cepa PP2 (pDmPP2.K1). Esta sonda no contiene DNA repetitivo, pues en el Southern Blot presentado en la figura 3-3 sólo detectó una banda frente a una digestión de DNA genómico total de Oregon-R. Así pues, empleamos este inserto directamente como sonda en el rastreo de una genoteca de DNA genómico de Oregon-R. La genoteca fue proporcionada por el Dr. Tom Weaver (Departamento de Anatomía, Universidad de Cambridge).

De este rastreo purificamos dos clones, λ Dm.TE1 y λ Dm.TB1, de los que se aisló su DNA y se procedió al análisis de restricción según se muestra en el apartado 4.5 y en la figura 5-1.

En estos clones pudimos identificar los fragmentos de restricción que hibridaban con el inserto del plásmido pDmPP2.K1, así como localizar los sitios de restricción para el enzima *Kpn* I. Estos datos, y el tamaño del inserto, permiten situar el elemento P-lArB en el mapa de restricción así como orientarlo en el mismo. En concreto, la parte del vector P-lArB donde está el plásmido Bluescript tiene que ser la más cercana al sitio *Kpn* I localizado en los clones λ Dm.TE1 y λ Dm.TB1. Esta información se resume en la figura 5-1.

Una de las cuestiones más esenciales en la caracterización de estos clones genómicos ha sido el utilizarlos para identificar los fragmentos de restricción que contuvieran regiones codificantes. Hemos empleado dos aproximaciones para ello: en primer lugar el ensayo en hibridación *in situ* en embriones de distintos fragmentos genómicos (ver el apartado 5.1), y en segundo lugar el uso de estas sondas en Northern Blot (ver el apartado 5.2).

Con la primera aproximación identificamos dos fragmentos que reproducían claramente el patrón de expresión mesodérmico observado en la cepa de trampa de los enhancer. Uno de estos fragmentos, la sonda número 6 (ver la figura 5-1), fue utilizada en un rastreo de cDNAs embrionarios procedentes de la región. El resultado fue la obtención de dos clones de cDNA: λ cDm.D y λ cDm.B. El otro fragmento, marcado con el número 4 en la figura 5-1, fue empleado en un Northern Blot en el que identificamos tres transcritos mayoritarios. Ambos resultados serán tratados más adelante, en los apartados 5.1. y 5.2.

4.2. Aislamiento de clones genómicos a partir de un cDNA

Al intentar aclarar qué fragmentos genómicos de los clones λ Dm.TE1 y λ Dm.TB1 contenían los exones utilizados por el cDNA λ cDm.D, resultaba evidente que estos primeros clones genómicos no cubrían todo el gen. De hecho, al utilizar el λ cDm.D entero (3 kb) como sonda en un Southern Blot frente a las digestiones de los clones λ Dm.TE1 y λ Dm.TB1, la señal se restringía exclusivamente a un fragmento *Hind* III de 0,5 kb.

Así pues, decidimos utilizar todo el inserto del clon λ cDm.D como sonda en un nuevo rastreo genómico. De este rastreo purificamos tres nuevos clones genómicos, λ Dm.D2, λ Dm.H y λ Dm.D1 (ver las figuras 4-1 y 6-2) que solapaban entre sí en gran medida. Uno de ellos, λ Dm.D2, presenta un inserto de unas 20 kb y nos centramos especialmente en él para realizar el mapa de restricción (ver el apartado 4.5). Asimismo, localizamos en estos clones genómicos el exón de donde procedía mayoritariamente el clon λ cDm.D y orientamos la unidad de

transcripción sobre los clones genómicos, pues el cDNA procedía de un mRNA poliadenilado y la señal de poliadenilación se encuentra en este exón (ver también el apartado 6.1.2)

Mediante Southern Blot se comprobó que los clones genómicos λ Dm.TE1 y λ Dm.TB1 no solapaban en absoluto con estos tres nuevos clones genómicos. Teníamos, por tanto, dos conjuntos de clones genómicos separados por un intrón (pues λ cDm.D hibridaba con ambos conjuntos) de tamaño desconocido.

4.3. Rastreo de genoteca en cósmidos.

Ante la evidencia de que nos encontrábamos ante un gen de gran tamaño, decidimos utilizar un vector de clonación de mayor capacidad, en este caso cósmidos. Dado que estos vectores admiten insertos de unas 40 kb, era probable que pudiésemos aislar un cósmido que cubriese la región completa entre los dos conjuntos de clones detallados anteriormente. Empleamos para ello una genoteca ordenada de DNA genómico de la cepa Canton-S, preparada en el vector Lawrist4 y suministrada en un filtro de 96 x 96 clones por el Dr. J. Hoheisel (Hoheisel y col. 1991).

Para identificar cósmidos que cubriesen toda la región genómica entre los fagos λ Dm.TE1, λ Dm.TB1 y los λ Dm.D2, λ Dm.H, λ Dm.D1, realizamos un rastreo doble: empleamos como sonda, en primer lugar, el inserto del plásmido pDmPP2.K1, y en segundo lugar un fragmento *Eco* RI de 0,9 kb del clon λ cDm.D, que era característico del segundo conjunto de clones. En ambos casos, se obtuvieron muchas señales positivas, del orden de las 40 para pDmPP2.K1 y sobre las 80 para el fragmento de λ cDm.D. De todas ellas elegimos un positivo fuerte para ambas sondas (el cósmido JHD4:85D4, abreviado a 85D4), que en principio cubriría la región entre los dos conjuntos de clones, y otro positivo fuerte para cada una de las sondas por separado, el cósmido JHD4:61G9 y el JHD4:90E9, abreviados respectivamente a 61G9 y 90E9.

Mediante un ensayo de Southern blot procedimos a confirmar las señales de cada cósmido frente a las dos sondas empleadas en los rastreos. Este ensayo descartó el cósmido 61G9 para un análisis posterior, pues no hibridó significativamente con ninguna de las dos sondas.

Utilizando como base los mapas de restricción obtenidos para los dos conjuntos de fagos ya analizados, pudimos aclarar la disposición de los dos cósmidos 85D4 y 90E9 respecto a los clones lambda (ver la figura 6-2). El cósmido 85D4, en efecto, solapaba con ambos grupos de fagos y completaba la clonación de la región intermedia. Sin embargo, en esta región no resulta sencillo localizar los sitios de restricción con la aproximación habitual de digestiones simples y

dobles, ya que, en el caso de los cósmidos, se genera un gran número de fragmentos de restricción, por tratarse de insertos muy grandes. Por ello, procedimos a subclonar un fragmento *Bam* HI que contenía toda esa región y aclaramos el mapa de restricción en dicho subclón (ver el apartado 4-5 para más detalles y la figura 6-2).

Tal como hemos comentado anteriormente, el clon de cDNA λ cDm.D orienta la unidad de transcripción en los clones genómicos λ Dm.D2, λ Dm.H y λ Dm.D1 pues en ellos se encuentra el extremo 3' de este cDNA. Con la nueva información del cósmido 85D4, que aclara la posición que ocupan los dos conjuntos de clones lambda (fagos λ Dm.TE1, λ Dm.TB1 y λ Dm.D2, λ Dm.H, λ Dm.D1) la disposición de todos los clones en la unidad de transcripción es como sigue. En el extremo 5' los clones λ Dm.TE1 y λ Dm.TB1, después una región clonada solamente en el cósmido 85D4 y, finalmente, los clones λ Dm.D2, λ Dm.H y λ Dm.D1 en dirección 3' de la unidad de transcripción (ver la figura 6-2).

4.4. Paseo cromosómico en dirección 3' de la unidad de transcripción

A pesar de la gran cantidad de DNA genómico ya clonado, el aislamiento por parte del grupo de Marek Mlodziej (EMBL, Heidelberg) del cDNA de disco imaginal de ojo dc12, que codifica para una proteína, indicaba que debían existir regiones transcritas en dirección 3' respecto a los últimos clones genómicos aislados hasta ese momento. En concreto, un fragmento *Pvu* II de 2,2 kb en 3' de este cDNA, no hibridaba con los clones genómicos disponibles hasta entonces (Gerrit Begemann, com. pers.)

Para completar la clonación de la región genómica iniciamos, pues, un paseo cromosómico en esa dirección, mientras en Heidelberg se aislaban varios cósmidos que contenían la región genómica de la que procede el extremo 3' de dc12, entre ellos los clones 50A10 y 12E7. El paseo ha consistido en dos pasos de aislamiento de clones lambda, que completan la región entre el cósmido 85D4 y el 50A10 (ver la figura 6-2). En concreto, se trata de los clones, λ Dm.M3 y λ Dm.B1, en un primer paso, y de λ Dm.E4 y λ Dm.RD2 en un segundo, solapantes en gran medida estos últimos con el cósmido 50A10. En la figura 4-2 se presenta más información sobre las dos sondas empleadas en estos rastreos, así como la comprobación de que estas sondas son de copia única.

4.5. Mapas de restricción.

Como primer dato para la caracterización de los distintos clones lambda genómicos que hemos purificado, se ha realizado el mapa de restricción de cada uno de ellos para cuatro enzimas: *Eco* RI, *Hind* III, *Sal* I y *Bam* HI. Esencialmente, se utilizaron datos de digestiones simples y dobles de los cuatro enzimas a localizar, así como distintos ensayos de Southern Blot para confirmar la posición de algunos sitios de restricción. En las ocasiones en que un enzima corta repetidamente en una región, hemos recurrido a un Southern Blot de digestiones parciales utilizando como sonda un fragmento del extremo del clon. Este es, por ejemplo, el caso del clon λ Dm.TE1 en el que *Hind* III corta 5 veces en una región del mismo (ver la figura 5-1). Un ejemplo del resultado obtenido con esta técnica puede observarse en la figura 4-3. En ella se realizaron digestiones *Hind* III parciales según se especifica en el apartado 12 de Material y Métodos y el Southern Blot fue hibridado con una sonda del extremo del clon, en este caso el fragmento *Hind* III/*Sal* I de 3 kb de λ Dm.TE1 (nótese que *Sal* I corta en el sitio de clonación múltiple del vector; ver la figura 5-1). En otros casos, como en los clones λ Dm.D2, λ Dm.H y λ Dm.D1, los sitios *Eco* R1 fueron localizados mediante digestiones parciales e hibridación con una sonda del extremo de modo semejante a los primeros clones identificados λ Dm.TE1 y λ Dm.TB1.

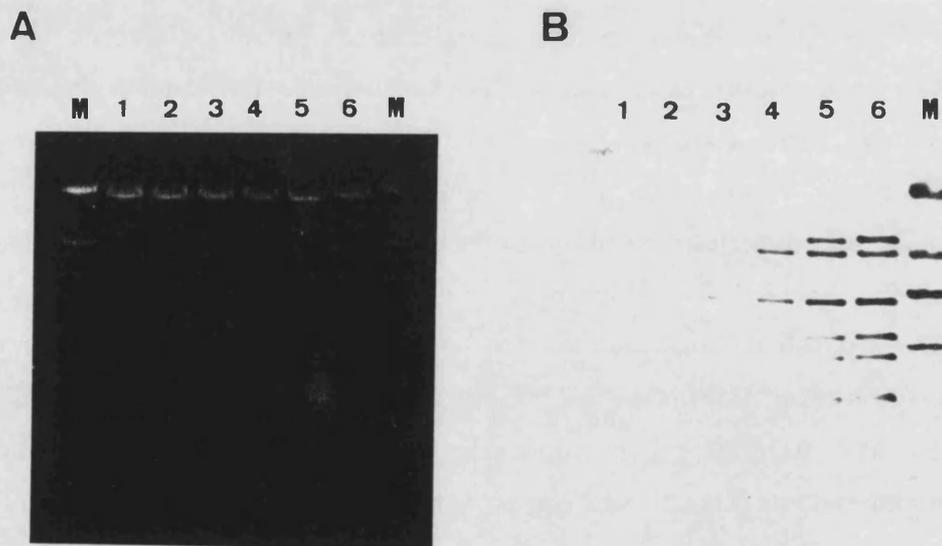


FIGURA 4-3. Digestiones parciales *Hind* III del clon λ Dm.TE1 (A) y Southern Blot (B) con una sonda de 3 kb del extremo del mismo (*Hind* III/*Sal* I). Puede observarse claramente que, cuando las digestiones son progresivamente más parciales, el tamaño de los fragmentos detectados se va incrementando. Cada salto de tamaño localiza el siguiente sitio de restricción en el clon. Se utilizaron las siguientes condiciones de digestión: (1) 16U 1,5h; (2) 16U 1h; (3) 8U 1h; (4) 4U 1h; (5) 2U 1h; (6) 1U 1h. M es el fago lambda digerido con *Hind* III.

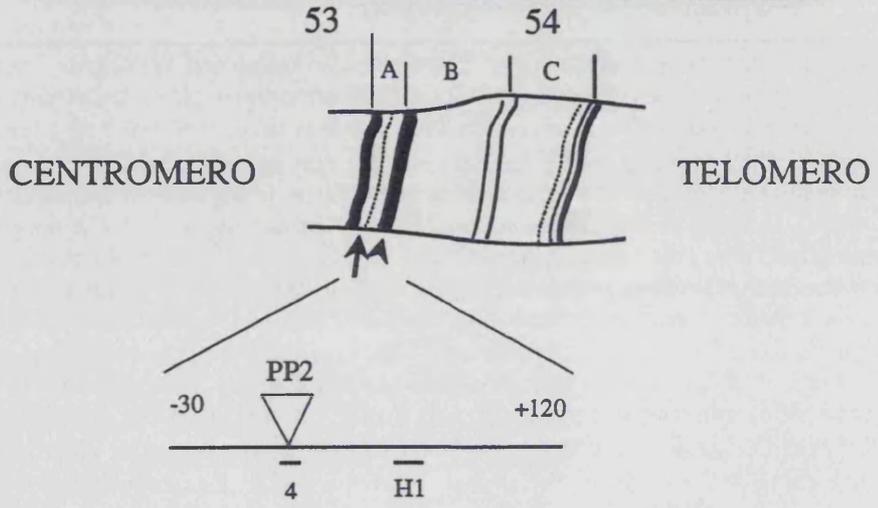
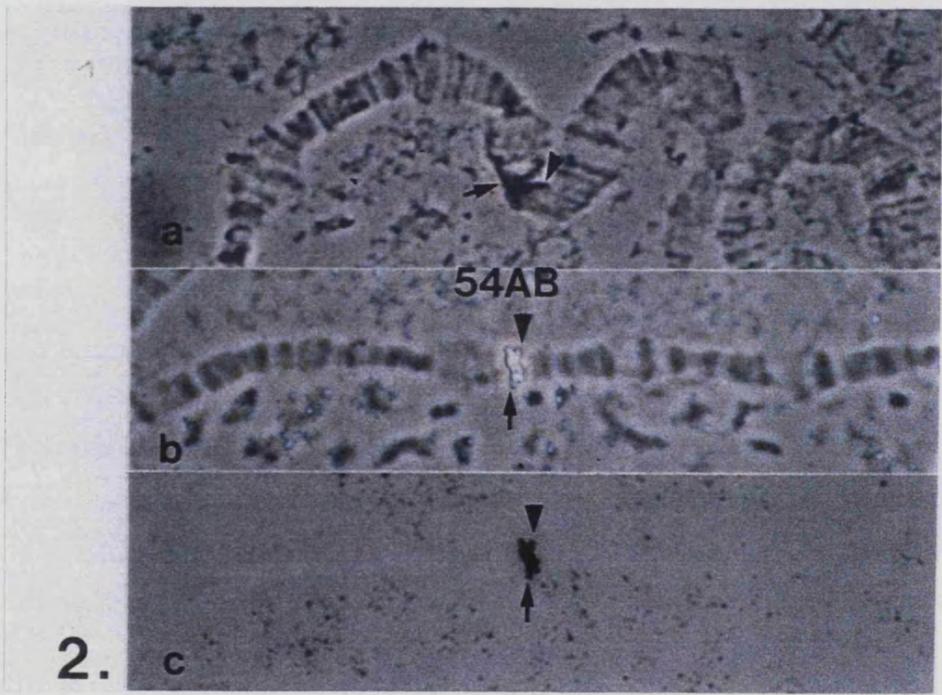
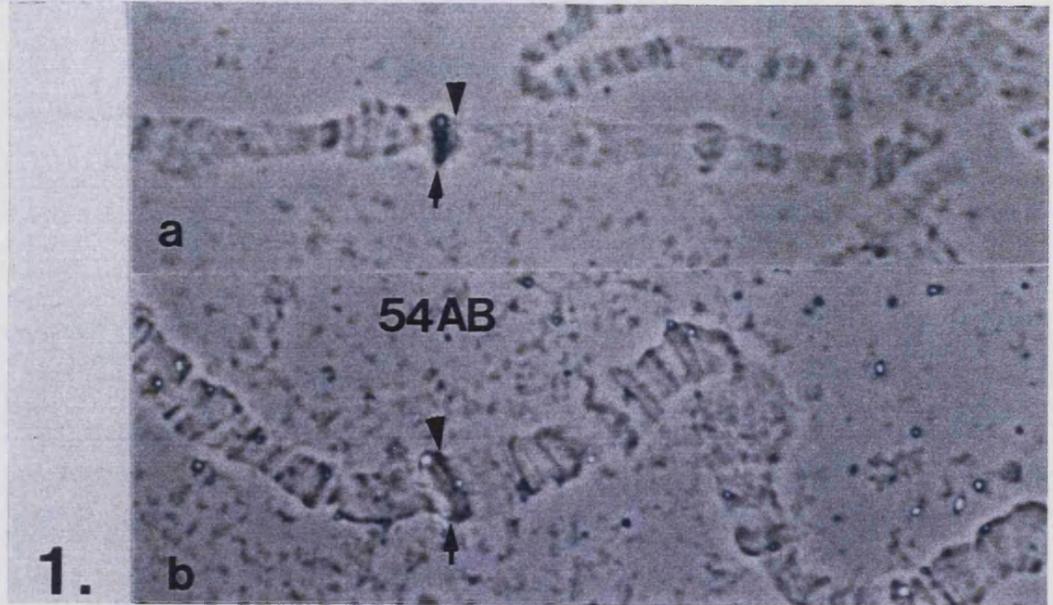
Tal como se ha indicado anteriormente, no resulta sencillo localizar los sitios de restricción en los cósmidos debido a su gran tamaño. Por ello, en varias ocasiones, bien nos hemos limitado a localizar tan sólo los sitios *Sal* I y *Bam* HI, pues son relativamente raros en esta región genómica, o bien se ha subclonado un fragmento de cósmido en plásmido, como ha ocurrido con el 85D4. En concreto, en este caso se trata de un fragmento *Bam* HI de aproximadamente 12 kb del cósmido 85D4, que hemos subclonado en pUC19, y del que se ha obtenido el mapa de restricción de la región entre los clones λ Dm.TE1 y λ Dm.D2. En el apartado 12 de Material y Métodos se especifican varias particularidades del vector Lawrist4 que deben tenerse en cuenta para localizar sitios de restricción en estos cósmidos.

En la figura 6-2 se resume toda la información disponible sobre localización de sitios de restricción en los diferentes clones. Una versión ampliada de mapa de restricción para los clones λ Dm.TE1 y λ Dm.TB1 puede observarse en la figura 5-1. En cuatro ocasiones hemos podido detectar polimorfismo para un sitio de restricción entre los clones procedentes de la genoteca en fago lambda, construida con DNA de la cepa Oregon-R, y los procedentes de la genoteca en cósmido, construida con DNA de la cepa Canton-S. Todos ellos aparecen reflejados en la figura 6-2 con un pequeño asterisco.

4.6. Identificación de regiones que contienen DNA repetitivo.

En la región situada entre las coordenadas -30 y +49 kb (es decir, los cósmidos 90E9 y 85D4 más los fagos correspondientes; ver la figura 6-2) hemos identificado tres regiones que contienen DNA repetitivo. El ensayo aplicado consistió en emplear como sonda el DNA genómico total de la cepa Oregon-R en hibridación frente a un filtro que contiene varias digestiones de todos los clones de la región señalada. Se espera de un Southern Blot en estas condiciones que sólo los fragmentos alta o moderadamente repetitivos hibriden con suficiente cantidad de sonda como para ser detectables en el filtro.

FIGURA 4-4. Señales de hibridación en cromosomas politénicos obtenidas con dos sondas separadas por 46 kb y su interpretación. En la parte 1 de la figura se muestra el resultado al hibridar por separado con la sonda *Hind* III de 2 kb del clon λ Dm.TE1 (a) y la sonda *Eco* RI/*Sal* I de 2,9 kb del extremo del clon λ Dm.H (b). Puede observarse como la señal pasa de estar situada en 54A con la primera sonda (señalado con una flecha) a desplazarse ligeramente hacia 54AB con la segunda (señalado con una cabeza de flecha). En la parte 2 de la figura se muestra el resultado al hibridar con ambas sondas conjuntamente. En la foto (a) puede observarse como cada sonda hibrida a un lado de una pequeña rotura en una de las cromátidas, demostrando que las sondas detectan regiones distintas en el cromosoma. Las fotos (b) y (c) presentan este mismo resultado, en otro cromosoma, cuando la señal es revelada con un anticuerpo anti-DIG conjugado a partículas de oro y con un reactivo de plata que incrementa la señal (ver el apartado 5.3 de Material y Métodos). Se observa en contraste de fases para la foto (b) y en campo claro en la foto (c). Hemos marcado cada señal, como en la parte 1, con una flecha y cabeza de flecha. La parte 3 de la figura presenta una interpretación de los resultados. La sonda *Hind* III de 2 kb del clon λ Dm.TE1 se ha abreviado a 4 y *Eco* RI/*Sal* I de 2,9 kb del extremo del clon λ Dm.H a H1. Este experimento se ha realizado en colaboración con el Profesor Valery F. Semeshin.



Los tres fragmentos detectados son los siguientes: un fragmento *Eco* RI de 3,3 kb en la región del clon λ Dm.TB1, un fragmento *Bam* HI/*Hind* III de 2,3 kb en la región de los clones λ Dm.D2, λ Dm.D1 y λ Dm.H (el mismo fragmento donde está localizada la inserción del elemento PZ de la cepa P976, ver apartado 8.1.) y, por último, el fragmento *Hind* III de 1,4 kb situado en la región del clon λ Dm.TE1. Los tres fragmentos se han enumerado en orden de intensidad de la señal de hibridación. Aunque nos hemos referido a los clones lambda para nombrar los fragmentos de que se trata, estas señales de hibridación también se observan en los cósmidos.

4.7. Orientación de la región clonada en el cromosoma politénico

Gracias a la gran longitud de la región clonada (aproximadamente 120 kb en total) ha sido posible determinar la orientación de los clones genómicos sobre el cromosoma politénico. Para ello, hemos empleado dos sondas, el fragmento *Hind* III de 2 kb del clon λ Dm.TE1 (marcado con el número 4 en la figura 5-1), y el fragmento *Eco* RI/*Sal* I de 2,9 kb del extremo del clon λ Dm.H, en hibridación *in situ* sobre cromosomas politénicos. Ambas sondas están separadas por unas 46 kb, y las hemos utilizado tanto por separado como conjuntamente, con el objeto de correlacionar el avance en un sentido en la región clonada con un desplazamiento en la señal de hibridación sobre el cromosoma.

Con la primera de estas sondas la señal aparece centrada en 54A mientras con la segunda aparece ligeramente desplazada hacia el telómero del cromosoma (54AB, ver la figura 4-4). Esto orienta la región clonada en el sentido de valores de coordenadas negativos hacia el centrómero y valores positivos hacia el telómero, tal como se dibuja en la figura 4-4.

5. IDENTIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN GENÓMICOS QUE PUEDEN CONTENER EXONES

Un objetivo prioritario en la caracterización de cualquier gen es identificar y estudiar sus transcritos a nivel molecular. Este objetivo, sin embargo, no es inmediato en el caso de genes descritos por primera vez y de gran tamaño, como es nuestro caso. En estas ocasiones, en primer lugar debe localizarse un fragmento de restricción genómico que contenga algún exón, el cual servirá como sonda para la purificación de cDNAs que lo incluyan. En la bibliografía hemos encontrado dos estrategias, principalmente, que se han aplicado a genes de *Drosophila*: la primera basada en datos de hibridación *in situ* en embriones, y la segunda basada en datos de

Northern Blot. Hemos empleado ambas aproximaciones en nuestro caso y describimos a continuación los resultados obtenidos.

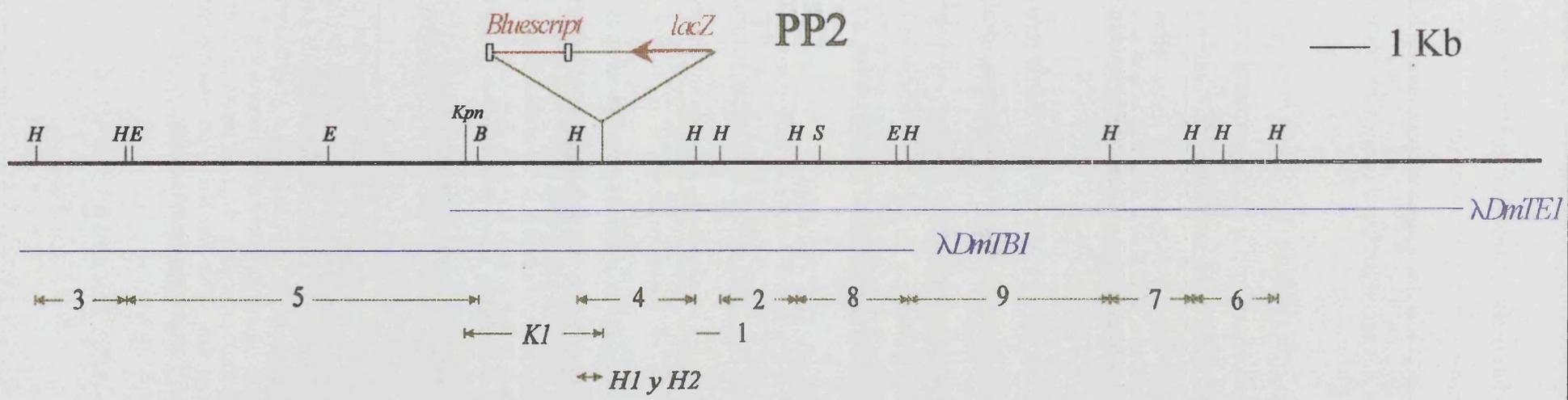
5.1. Localización de regiones exónicas mediante hibridación *in situ* en embriones

Esta aproximación consiste en purificar los distintos fragmentos de restricción de un clon genómico, el marcaje de cada uno de ellos con digoxigenina y su ensayo, por separado, en una hibridación *in situ* sobre embriones completos. Sólo se espera obtener señal de hibridación con los fragmentos que contengan alguna región que se transcriba en el embrión, aunque la intensidad de la señal dependerá de si se trata de un exón presente en el mRNA maduro, o de un intrón, que rápidamente es eliminado. Aquellas sondas que no detecten ningún patrón de expresión de RNA estarán situadas, en principio, fuera de la unidad de transcripción.

Otro dato indicativo de si estamos ante una región que contiene un exón o un intrón es la localización de la señal en el citoplasma o en el núcleo. Una señal citoplásmica es característica de los mRNAs maduros, mientras que una señal en el núcleo puede ser debida a que nuestra sonda detecta un intrón o a que se trata de un transcrito de gran tamaño, pues en este caso el RNA está fijado al punto de transcripción hasta que ésta termina (es el caso, por ejemplo, de *Ultrabithorax*, ver Shermoen y O'Farrell, 1991; Artero y col. 1992).

Evidentemente, el interés se centra en identificar algún fragmento de restricción que detecte un patrón de transcripción en el embrión semejante al que pone de manifiesto el transposón P-1ArB de la cepa inicial, pues ello indica que en ese fragmento se encuentra un exón del gen que queremos caracterizar. Estos fragmentos de DNA genómico pueden ser empleados, posteriormente, para un rastreo de cDNAs, ensayos de Northern Blot, etc.

FIGURA 5-1. Mapa de restricción de los clones genómicos λ DmTE1 y λ Dm.TB1, punto de entrada de la inserción PP2 y su orientación respecto a los clones genómicos. Los fragmentos señalados como K1, H1 y H2 son los insertos de los plásmidos rescatados con las digestiones *Kpn* I (pDmPP2.K1) y *Hind* III (pDmPP2.H1 y pDmPP2.H2) del DNA genómico total de PP2, respectivamente. Debajo del mapa de restricción se señalan las 10 sondas que hemos empleado en hibridación *in situ* en embriones completos para la búsqueda de regiones genómicas que incluyeran secuencias exónicas. El resultado de tres de estas hibridaciones se muestra en la parte inferior de la figura para dos estadios embrionarios, estadio 11 (a, b, c) y estadio 13 (d, e, f), en cada caso se especifica la sonda empleada. El resultado fue negativo para las sondas 5 y K1. En cambio, la sonda 4 detecta claramente doce grupos de células mesodérmicas (señaladas con una flecha en la foto c) lo que indica la presencia de un exón en este fragmento genómico. En estadios más tardíos esta hibridación se concentra en el mesodermo somático (señalado con una flecha en la foto f). El resultado de otras tres hibridaciones puede observarse en la figura 5-2. Ver texto para más detalles.

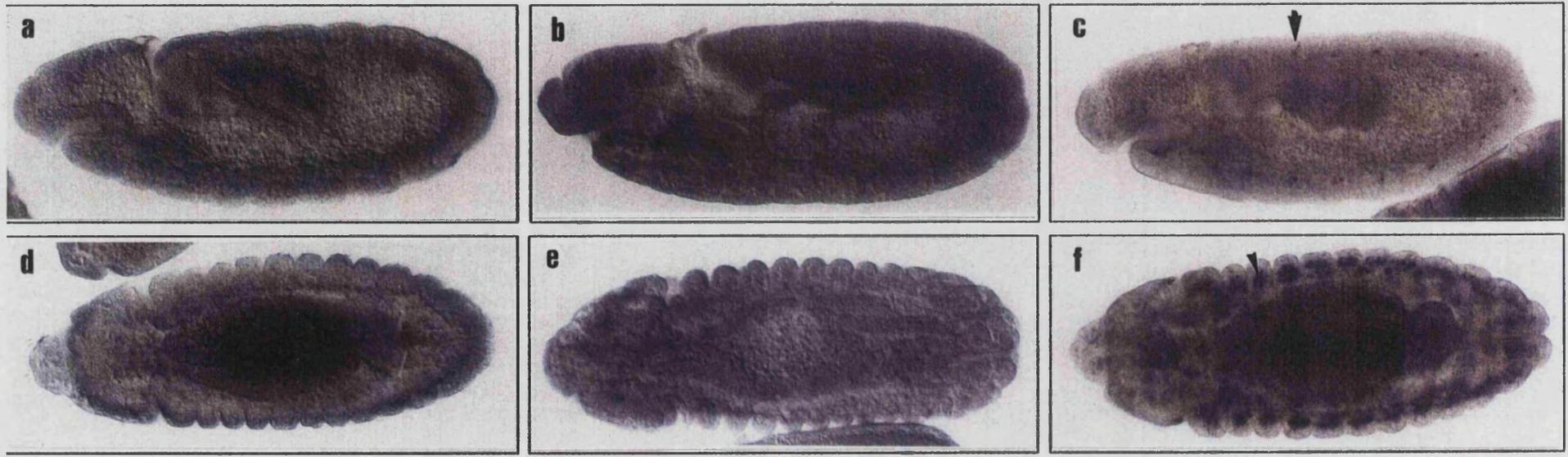


111

SONDA 5

SONDA K1

SONDA 4



RESULTADOS

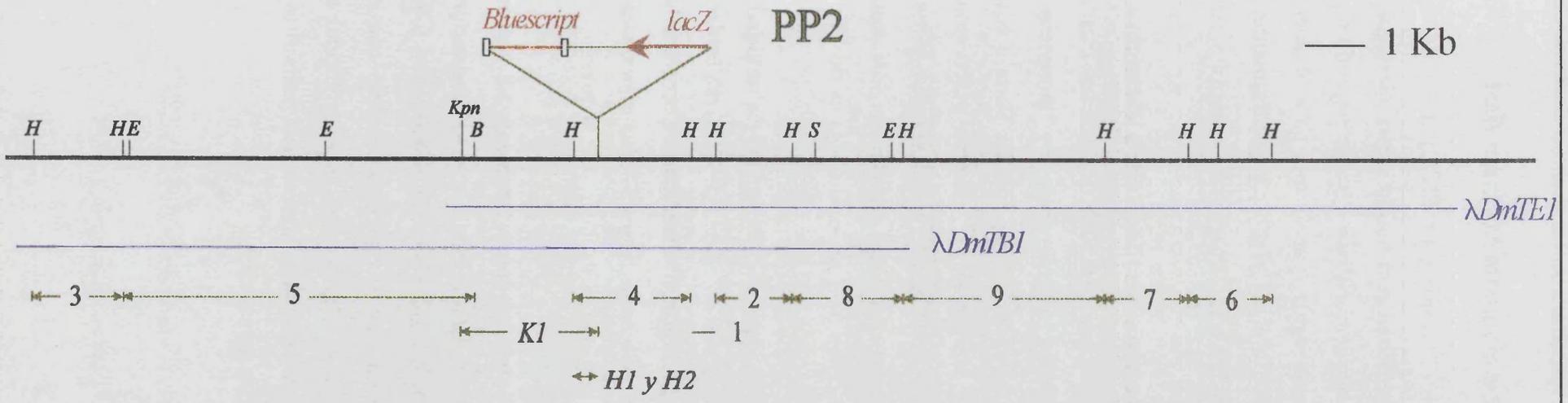
Esta estrategia es la que hemos seguido para identificar fragmentos genómicos en los clones λ Dm.TE1 y λ Dm.TB1 que contengan exones presentes en mRNAs embrionarios. En total hemos purificado 10 fragmentos de restricción de estos clones, principalmente fragmentos *Hind* III, aunque no únicamente. En la figura 5-1 se representan estas sondas así como los nombres asignados a cada una de ellas.

La mayoría de los fragmentos empleados dieron cierta señal de hibridación *in situ* en los embriones y, a "grosso modo", podemos clasificar las señales en tres tipos. En primer lugar, las sondas 3, 5 y K1 no dieron ninguna señal apreciable de hibridación, ni siquiera con tiempos de incubación en reacción de color muy largos (unas 15 horas). Nótese que todas ellas se encuentran en el mismo lado respecto a la inserción y, por lo tanto, asumimos que la unidad de transcripción termina antes de la región de donde proceden estas sondas.

En segundo lugar se encuentra un grupo de cinco sondas (1, 2, 8, 9 y 7) que dieron señales en general muy débiles, justo visibles por encima del fondo en algunas ocasiones, o algo mejores en el caso de la 9 y la 7. En estos dos casos la señal es claramente visible, aunque débil, en estadios tardíos, pero también puede apreciarse muy débilmente en algunos embriones más jóvenes (estadio 11). La señal tras la retracción de la banda germinal se concentra en el mesodermo somático (ver la figura 5-2).

Por último, dos sondas hibridaron fuertemente, las número 4 y 6. En ambos casos puede observarse señal en embriones de estadio 11 en forma de doce grupos de células ventrales dispuestas regularmente en el mesodermo (ver las figuras 5-1 y 5-2, foto (c) en cada caso). Estos grupos de células, por su posición en el embrión, podrían ser las precursoras de algún tipo de musculatura somática, aunque este extremo no ha sido aclarado. Además de estos grupos de células, aparece otro grupo con señal justo al lado de la apertura del estomodeo. En estadios más tardíos la señal se acumula principalmente en el mesodermo somático del embrión (ver las figuras 5-1 y 5-2, foto (f) en cada caso). Concluimos, por tanto, que estas sondas incluyen, potencialmente, algún exon de la unidad de transcripción que estamos caracterizando.

FIGURA 5-2 Resultado de las hibridaciones *in situ* de tres fragmentos genómicos del clon λ Dm.TE1 (señalados en la parte superior de las fotos), en dos estadios embrionarios, el estadio 11 (fotos a, b c) y el estadio 13 (fotos d, e, f). La sonda 6 detecta un patrón espacial idéntico al del fragmento 4 (ver figura 5-1), es decir, 12 grupos de células mesodérmicas en el estadio 11 y el mesodermo somático en el estadio 13. Ambas señales se han marcado con flechas en la figura. Respecto a las sondas 9 y 7, las señales de hibridación son mucho más débiles pero, en general, es posible observar cierta señal en el mesodermo somático de embriones tardíos (estadio 13 en este caso, señalado con una flecha) y ocasionalmente durante la fase de banda germinal extendida. Ver texto para más detalles.

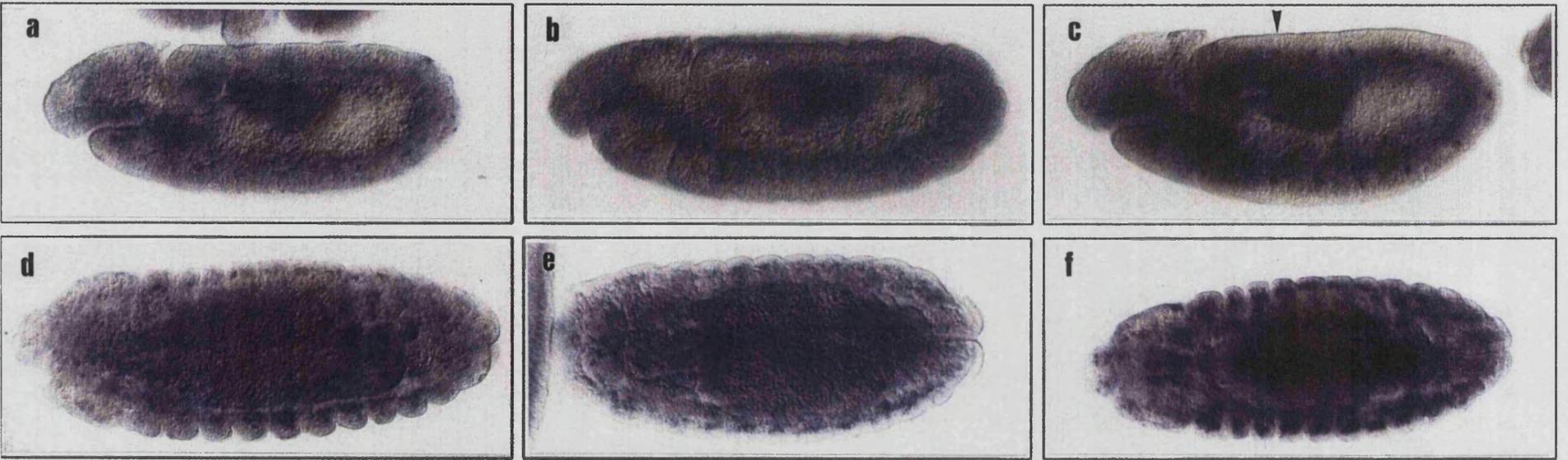


113

SONDA 9

SONDA 7

SONDA 6



RESULTADOS

5.2. Determinación del tamaño de los transcritos mediante Northern Blot

Hemos realizado varios experimentos de Northern Blot frente a mRNA poli(A)⁺ de todos los estadios del desarrollo de *Drosophila*. Estos Northern Blot han tenido varios objetivos: en primer lugar, conocer si una región genómica en concreto se transcribe o no; en segundo lugar, para determinar los tamaños de los transcritos de cada región; por último, para obtener un perfil temporal de expresión de cada uno de los mRNAs detectados. Específicamente, los estadios analizados han sido embriones de 0-4h, 4-8h, 8-12h y 12-24h horas de desarrollo, larvas de tercer estadio, pupas y adultos.

La primera sonda que hemos empleado ha sido el fragmento *Hind* III de 2 kb común a los clones λ Dm.TE1 y λ Dm.TB1, donde hemos localizado la inserción PP2, que aparece marcada con el número 4 en la figura 5-1. Esta sonda identifica, principalmente, tres transcritos, de aproximadamente 7, 4,6 y 3 kb de longitud, con un cierto perfil temporal. En pupa y adulto prácticamente sólo aparecen los transcritos de mayor tamaño (7 kb), estando prácticamente ausentes los mensajeros menores. En cambio, durante el desarrollo embrionario y el tercer estadio larvario, los tres tipos de mRNA están presentes en cantidades semejantes. Sólo destaca en estos estadios una mayor abundancia de los transcritos de 7 kb en embriones de 12 a 24 horas (ver la figura 5-3).

Para descartar que estas diferencias se debieran a que en cada carrera la cantidad de mRNA cargado no fuera la misma, o a una cierta degradación en alguna de ellas, rehíbramos el filtro frente a una sonda del gen de la actina, de expresión aproximadamente constante a lo largo del desarrollo de *Drosophila*. Como puede observarse en la figura 5-3, las diferencias de hibridación entre carreras descritas previamente no se pueden explicar por la presencia de cantidades diferentes de mRNA.

De modo semejante al anterior, hemos empleado como sonda un fragmento *Sal* I de unas 4,2 kb del extremo del clon λ Dm.D2 en un Northern Blot. Esta misma sonda, en hibridación *in situ* sobre embriones, da una señal débil en la musculatura somática. Sin embargo, no hemos podido obtener ninguna señal apreciable en Northern Blot y debemos concluir que este fragmento genómico no incluye ningún exón o, al menos, ninguno grande. Al rehíbrar este mismo filtro con la sonda del gen de la actina se detectan cantidades normales de transcritos. El resultado negativo no se debe, pues, a degradación de los mensajeros.

Por último, hemos empleado el clon λ cDm.D completo (ver el apartado 6.1.2) como sonda en un Northern Blot frente a los mismos mRNAs que en los filtros descritos previamente. Los resultados en este caso han sido bastante distintos a los obtenidos con la sonda *Hind* III de 2 kb común a los clones λ Dm.TE1 y λ Dm.TB1. En concreto, además del transcrito de 7 kb, se detectan transcritos de unas 9 kb, especialmente en larvas de tercer estadio, aunque aparecen también muy débilmente en los estadios embrionarios previos (0-4h, hasta 12-24h de desarrollo). Se detecta también una banda muy débil a unas 0,8 kb. Al igual que en los casos precedentes las señales fueron confirmadas mediante una hibridación posterior con el gen de la actina.

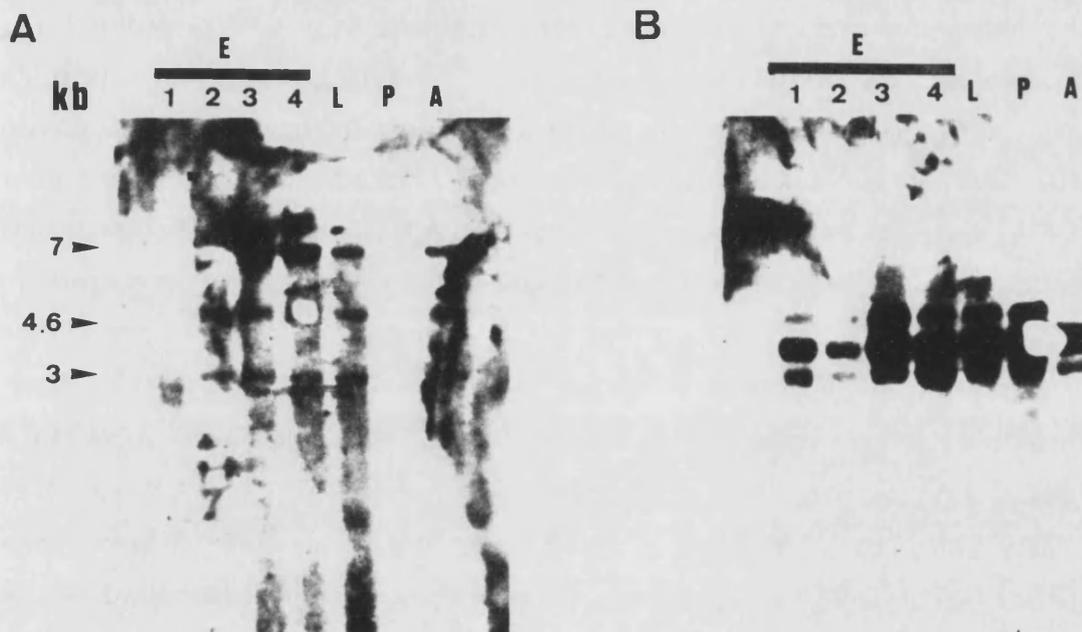


FIGURA 5-3. Tamaños de los mRNAs detectados con la sonda *Hind* III de 2 kb común a los clones genómicos λ Dm.TE1 y λ Dm.TB1 así como su perfil temporal de expresión (A). Posteriormente el filtro fue rehibridado frente a una sonda del gen de la actina para poder comparar intensidades de hibridación entre carreras (B). Se utilizan las siguientes abreviaturas: los números del 1 al 4 se refieren al mRNA de los periodos embrionarios 0-4h, 4-8h, 8-12h y 12-24 h respectivamente; L, larvas de tercer estadio; P, pupa; A, adulto.

6. RASTREO DE GENOTECAS DE cDNA

6.1. Clones procedentes de genoteca embrionaria de 4-17h en λ gt10

Tal como se indica en el apartado 4.1, hemos empleado un fragmento de restricción del clon genómico λ Dm.TE1 para rastrear una genoteca de cDNA embrionario construida específicamente para este trabajo (ver el apartado 8 de Material y Métodos). En concreto, la

sonda empleada es una mezcla de dos fragmentos *Hind* III de pequeño tamaño, 0,9 y 0,5 kb (marcados con el número 6 en la figura 5.1), que, en hibridación *in situ*, dan una señal clara en el mesodermo somático y en grupos de células mesodérmicas en el estadio 11 (ver la figura 5-2). Dado que este fragmento genómico es capaz de detectar un patrón de expresión en el embrión, asumimos que contiene algún exón de un mRNA.

De este rastreo pudimos purificar dos clones, λ cDm.D y λ cDm.B, que pasamos a describir con detalle.

6.1.1. Clon λ cDm.B.

Este clon tiene aproximadamente 1,5 kb y, tras subclonarlo en pUC19, procedimos a la secuenciación completa del mismo. Sorprendentemente (pues la genoteca fue construida empleando oligo d(T)₁₂₋₁₈ como cebadores) no pudimos identificar ninguna secuencia consenso para la poliadenilación de mRNAs ni regiones con un número de adeninas que hiciera pensar en que ese cDNA procediera de un mensajero poliadenilado. Además, el análisis de la secuencia del mismo indica que ninguna de las posibles pautas de lectura es codificante (ver el apartado 8.13). Así pues, a falta de más datos proponemos que puede tratarse de un cDNA parcial o de un RNA que no codifica para proteína.

Cuando este cDNA se emplea como sonda frente a los clones genómicos λ Dm.TE1 y λ Dm.TB1, toda la señal se restringe a dos fragmentos del clon λ Dm.TE1, uno *Hind* III de aproximadamente 1 kb y otro *Hind* III-*Sal* I de unas 3 kb. En base a estos datos, y a la existencia de un sitio *Hind* III en el cDNA que, aparentemente, es el mismo que hemos localizado en los clones genómicos, proponemos que este transcrito procede de la región señalada en la figura 6-2.

6.1.2. Clon λ cDm.D.

Este clon tiene un tamaño aproximado de 3 kb y al secuenciar ambos extremos del mismo encontramos una región poliadenilada, así como una secuencia consenso para la poliadenilación de mRNAs (AATAAA) a la distancia habitual del extremo. Ambos datos nos decidieron a la secuenciación completa del mismo.

Tras secuenciar por completo ambas cadenas y resolver las indeterminaciones de la secuencia, hemos analizado las posibles pautas de lectura mediante los programas FRAMES, TESTCODE y CODONPREFERENCE (ver el apartado 8.1.3). Sin embargo, este análisis indica

que no existe ninguna región grande en λ cDm.D con capacidad codificante. Tan solo un pequeño fragmento, común con el cDNA de disco imaginal dc12, de aproximadamente 84 aminoácidos (ver el apartado 8.1.3).

Cuando hemos utilizado este cDNA como sonda frente a los clones genómicos λ Dm.TE1 y λ Dm.TB1, la señal se ha restringido a un fragmento *Hind* III de 0,5 kb de λ Dm.TE1 lo cual indica que el mRNA de este cDNA procede, principalmente, de otra región. Esta observación fue la que nos llevó a utilizar este cDNA completo como sonda en un rastreo de nuevos clones genómicos (ver el apartado 4.2 y la figura 4-1).

Una vez purificados los nuevos clones genómicos que detecta la sonda λ cDm.D (λ Dm.D2, λ Dm.D1 y λ Dm.H, ver las figuras 4-1 y 6-2), pudimos aclarar dónde está situado el exón del que procede el mRNA clonado en λ cDm.D. Las señales de hibridación frente a estos nuevos clones genómicos se limitan a dos fragmentos *Eco* RI de 1,8 y 0,9 kb, en una región central de estos clones con 7 sitios consecutivos *Eco* RI (ver la figura 6-2). Los tamaños de estos fragmentos prácticamente coinciden con los del cDNA y, como primera aproximación, asumimos que se trataba de un solo exón.

Tras aclarar la disposición de los dos conjuntos de clones genómicos lambda en el cósmido 85D4 (ver el apartado 4.3) quedó claro que el mRNA del que procede λ cDm.D utiliza dos exones, uno situado en el fragmento *Hind* III de 0,5 kb de λ Dm.TE1 y otro situado en los fragmentos *Eco* RI de 1,8 y 0,9 kb de los clones genómicos λ Dm.D2, λ Dm.H y λ Dm.D1 (ver la figura 6-2), ambos exones separados por unas 25 kb. No es probable la existencia de un nuevo intrón en esta última zona pues, por secuenciación del fragmento genómico correspondiente hemos identificado las secuencias consenso para el corte y empalme del RNA primario en el extremo 5' del exón (ver el apartado 8.2) y el mapa de restricción es el mismo para los enzimas *Eco* RI y *Sac* I en esta región. A continuación se muestra la localización de los sitios de corte para los enzimas *Eco* RI, *Hind* III, *Sal* I, *Bam* HI y *Sac* I en λ cDm.D (ver la figura 6-1 y 6-2).

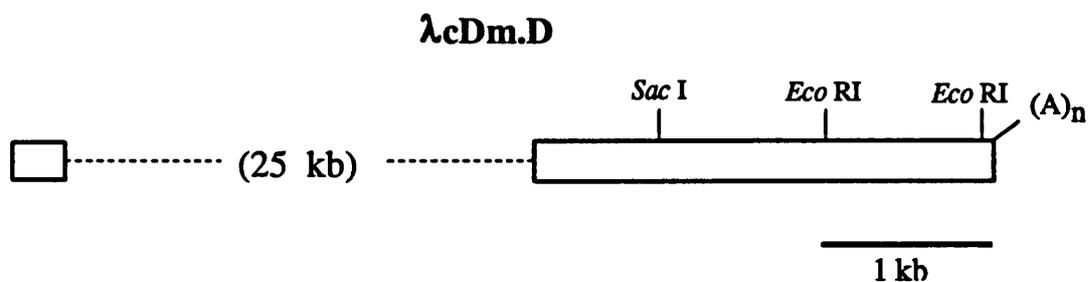


FIGURA 6-1: Mapa de restricción del clon λ cDm.D para los enzimas *Eco* RI, *Hind* III, *Sal* I, *Bam* HI y *Sac* I.

Otro aspecto importante que aclara λ cDm.D es la orientación de la unidad de transcripción respecto a los clones genómicos. Al encontrarse el extremo poliadenilado del cDNA en el exón de los clones λ Dm.D2, λ Dm.H y λ Dm.D1, podemos decir que ese exón está en 3' en la unidad de transcripción.

Por último, tenemos indicios de que λ cDm.D es un cDNA parcial en su extremo 5'. Apoyan esta conclusión tres observaciones. En primer lugar, cuando hemos secuenciado el fragmento genómico con el que hibrida λ cDm.D en el clon λ Dm.TE1 (fragmento *Hind* III de 0,5 kb), hemos encontrado una región genómica muy poliadenilada (ver la figura 8-2) a la que podrían haber hibridado los cebadores oligo d(T)₁₂₋₁₈ durante la síntesis de los cDNA, parando la retrotranscripción de regiones en dirección 5' del mRNA. En segundo lugar, el clon de cDNA de disco imaginal dc12, purificado por el grupo de Marek Mlodzik (EMBL, Heidelberg), define un exón de mayor tamaño en la misma región (ver la figura 6-2). Por último, el cDNA pcDm.A2 termina en 3' precisamente en la misma región poliadenilada en la que λ cDm.D tiene su extremo 5', a tan solo unos pocos nucleótidos del mismo (ver la figura 8-2).

6.2. Clones procedentes de una genoteca embrionaria de 12-24h en pNB40

Esta genoteca de cDNAs embrionarios en plásmido (ver el apartado 11.2 de Material y Métodos) fue rastreada empleando como sonda el fragmento *Hind* III de 2 kb de tamaño (marcado con el número 4 en la figura 5-1) del clon λ Dm.TE1. Como resultado del rastreo purificamos 7 clones positivos, aunque 6 de ellos (E3, C1, D4, D6, A2 y B2) presentaron el mismo patrón de restricción. Así pues, sólo caracterizamos posteriormente dos clones, un representante de los repetidos, el pcDm.A2, y el pcDm.B5. Describiremos ambos con detalle a continuación.

6.2.1. Clon pcDm.A2.

Este cDNA tiene un tamaño de 1,2 kb y la secuenciación de ambos extremos no identificó ninguna región poliadenilada ni secuencias consenso para la misma. Debido a este hecho, no hemos obtenido más datos de secuencia del mismo.

Para delimitar los fragmentos genómicos de los que procede el mRNA correspondiente a pcDm.A2, cortamos el cDNA en dos porciones. En primer lugar, un fragmento *Hind* III de 1 kb y, en segundo lugar, un fragmento *Hind* III/*Eco* RI de 0,2 kb (siendo este último sitio de restricción del plásmido en que está clonado el cDNA). La sonda de 1 kb hibrida con el

fragmento *Hind* III de 2 kb del clon genómico λ Dm.TE1, la misma región donde hemos localizado la inserción PP2. La sonda de 0,2 kb hibrida en el fragmento de 0,5 kb del clon λ Dm.TE1, el mismo que detecta el cDNA λ cDm.D en este clon genómico (ver la figura 6-2). De hecho, cuando hemos comparado la secuencia del extremo 3' de pcDm.A2 con la secuencia del fragmento genómico *Hind* III de 0,5 kb, el alineamiento se pierde justo antes de una región poliadenilada, unas pocas decenas de nucleótidos antes de donde termina λ cDm.D (ver la figura 8-2).

Así pues, queda clara la presencia de un intrón de al menos 8 kb en este cDNA y la sorprendente cercanía entre pcDm.A2 y λ cDm.D. De hecho, como veremos posteriormente, la localización sobre los clones genómicos de los exones de los que procede el cDNA de disco imaginal dc12 (Gerrit Begemann, EMBL, Heidelberg), indica que casi todo el fragmento genómico *Hind* III de 0,5 kb de λ Dm.TE1 es un exón y, desde luego, la pequeña zona genómica que separa pcDm.A2 y λ cDm.D está presente en dc12. Sin embargo, aunque parece probable que los clones pcDm.A2 y λ cDm.D sean parciales, y que el exón delimitado por el cDNA imaginal también esté presente en los cDNA embrionarios, no podemos unir conceptualmente ambos en un mismo cDNA pues la combinación de exones que resulta podría no ser real (esto es, que un transcrito tipo pcDm.A2 utilizase después otro exón que no fuera el que aparece en λ cDm.D).

6.2.2. Clon pcDm.B5

pcDm.B5 es un cDNA de 1,8 kb aproximadamente que, al igual que el anterior, secuenciamos por ambos extremos en busca de señales que indicaran si procedía de un mRNA poliadenilado o no. En este caso sí encontramos estas señales, tanto una secuencia consenso para la poliadenilación a la distancia apropiada del extremo, como una parte de la región poli(A)⁺ misma.

Al igual que pcDm.A2 separamos el cDNA pcDm.B5 en dos fragmentos de restricción, uno *Hind* III de 1,6 kb y otro *Hind* III/*Eco* RI de 0,33 kb (el sitio *Eco* RI está en el plásmido). Cuando se utilizan estas sondas sobre los clones de DNA genómico, toda la señal aparece exclusivamente en dos fragmentos contiguos. La sonda de 1,6 kb hibrida con el fragmento *Hind* III de 2 kb de λ Dm.TE1 (donde se localiza la inserción PP2) mientras la sonda de 0,33 kb hibrida con el fragmento *Hind* III de 0,4 kb, adyacente al anterior (ver la figura 6-2 y también la 5-1 para un mapa de restricción más ampliado de λ Dm.TE1).

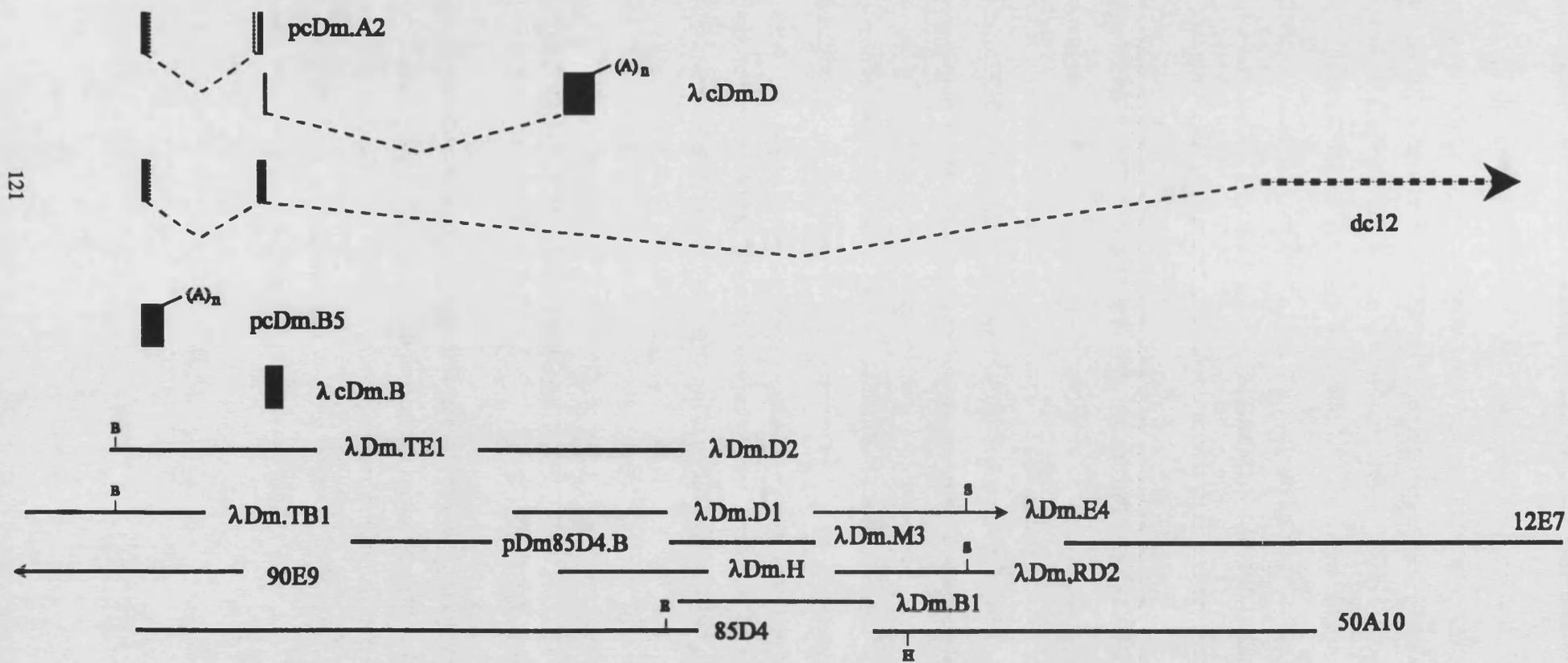
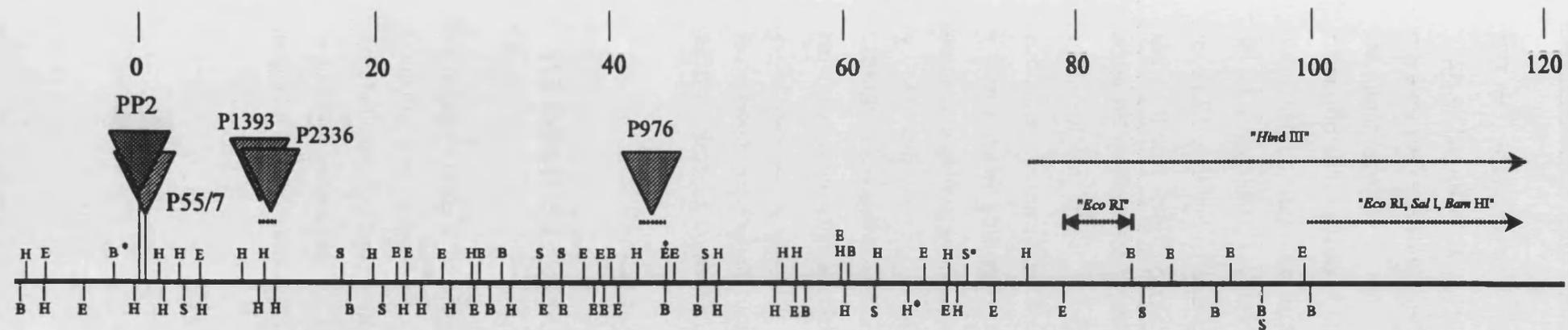
Al comparar la secuencia del extremo 5' de pcDm.B5 y pcDm.A2 se comprueba que son idénticas, aunque el segundo cDNA presenta un intrón que no tiene pcDm.B5. De hecho, los datos de secuencia y de hibridación frente a los clones genómicos apuntan a que este cDNA procede de un único exón, situado en la zona descrita previamente (ver la figura 6-2).

6.3. Otros clones de cDNA: dc12.

Este cDNA ha sido aislado de una genoteca de cDNA de disco imaginal de ojo por el grupo de Marek Mlodzik (EMBL, Heidelberg) y secuenciado en su totalidad por este mismo grupo. Tiene un tamaño de 3846 nucleótidos (Gerrit Begemann, com. pers.), y nuestro trabajo con el mismo se ha centrado en localizar sus exones en los clones genómicos.

Mediante distintos experimentos de Southern Blot, hemos identificado varios fragmentos de restricción genómicos donde hibrida dc12. Lo más interesante de esta localización de exones ha sido el gran tamaño del intrón encontrado, de unas 85 kb (ver la figura 6-2) y, según nuestros datos, el más grande descrito en *Drosophila*.

FIGURA 6-2. Estructura de la unidad de transcripción del gen PP2. En esta figura se recopila toda la caracterización molecular que hemos llevado a cabo en la región 54A. En la parte inferior de la figura se representan todos los clones genómicos identificados, tanto fagos lambda como cósmidos, con la notación empleada en cada caso. Seguidamente se representa la localización de los cuatro cDNAs que hemos caracterizado y dc12 sobre el genoma, con algunas incertidumbres señaladas con líneas discontinuas verticales. La línea central representa el DNA genómico y en ella se sitúan todos los sitios de restricción localizados. En los casos en que existe polimorfismo entre distintos clones genómicos hemos marcado el sitio de restricción con un pequeño asterisco y se especifica en qué clones sí que corta el enzima. Con triángulos se representan los puntos, o regiones si hay incertidumbre, de inserción de los elementos especificados. El mapa de restricción para los cósmidos 50A10 y 12E7 es preliminar, por lo que se especifica la ausencia de información para un enzima con una línea que cubre la región donde no se conocen los sitios, y encima de ella el nombre del enzima entre comillas. Por último, hemos colocado un sistema de coordenadas, iniciadas en el punto de inserción de PP2, que también es la escala de la figura. Aunque no se ha especificado en la figura, la dirección de la transcripción de los genes *lacZ* en las inserciones PP2 y P-lacW/55/7) es opuesta. Abreviaturas empleadas: E, *Eco* RI; H, *Hind* III; S, *Sal* I; B, *Bam* HI.



RESULTADOS

En concreto, dc12 hibrida con el fragmento *Hind* III de 2 kb del clon genómico λ Dm.TE1 (donde se localiza la inserción PP2), y su secuencia es idéntica en 5' a las de pcDm.A2 y pcDm.B5 (ver el apartado 8.1.2) con lo que concluimos que en esa región debe existir un exón también presente en los mensajeros del disco imaginal de ojo. Por otra parte, tanto las comparaciones de secuencias, como los datos de hibridación, indican la existencia de otro exón en la región situada entre los cDNAs pcDm.A2 y λ cDm.D, es decir, el fragmento genómico *Hind* III de 0,5 kb de λ Dm.TE1, aunque los límites del exón no coinciden exactamente con los de este fragmento (ver el apartado 8.2 y la figura 6-2). Por último, un fragmento *Pvu* II de 2,2 kb en 3' de dc12 no hibrida con ninguno de los exones localizados previamente, y ha sido la sonda para la purificación de los cósmidos 50A10 y 12E7 (Gerrit Begemann, com. pers.). En estos cósmidos, cuyo mapa de restricción no está completo, hemos identificado dos fragmentos en los que hibrida el clon dc12. Se trata de un fragmento *Bam* HI/*Sal* I de 4,2 kb, presente en ambos cósmidos, y de otro *Bam* HI/*Sal* I, de más de 20 kb, de 12E7. Aquí las posibilidades son varias y podría tratarse de un exón único que el sitio *Bam* HI común a los dos fragmentos anteriores separa en dos, o bien que existan varios exones (incluso alguno fuera de los cósmidos 50A10 y 12E7). Esta última posibilidad se ve apoyada por la observación de Gerrit Begemann (EMBL, Heidelberg) de que el fragmento *Pvu* II de 2,2 kb de dc12 hibrida exclusivamente en un fragmento *Hind* III de 1,6 kb de los cósmidos 50A10 y 12E7. Así pues, bien la porción de cDNA que no hibrida con el fragmento *Hind* III de 1,6 kb es demasiado pequeña para detectar un fragmento adyacente, o bien realmente todavía no está clonado todo el DNA genómico y dc12 termina más en 3', fuera de la región clonada hasta el momento.

7. PATRÓN DE EXPRESIÓN EMBRIONARIO DEL GEN DETECTADO EN LA CEPA PP2.

Hemos realizado esta descripción basándonos en los datos obtenidos en hibridación *in situ* sobre embriones completos de la cepa Oregon-R, empleando como sondas los fragmentos genómicos marcados con los números 4 y 6 en la figura 5-1. Con ambas sondas el resultado ha sido el mismo. Al igual que para la descripción de la expresión de β -galactosidasa en la cepa PP2, vamos a pormenorizar este patrón de transcripción por estructuras embrionarias más que por estadios.

MESODERMO: La primera señal detectable en hibridación *in situ* con las sondas genómicas anteriores son 12 grupos de células mesodérmicas en el estadio 11, y otro grupo de células mesodérmicas adyacentes a la apertura del estomodeo (ver la figura 7-1a).

Esta primera señal es muy diferente a la obtenida con la expresión de β -galactosidasa en la cepa PP2. En primer lugar, esta señal es mesodérmica, mientras que en la cepa PP2 es epidérmica. En segundo lugar, los grupos de células mesodérmicas detectados con la sonda genómica 4 son simétricas respecto de la línea media ventral, mientras que en la cepa PP2, las señales son laterales (comparar los embriones de las figuras 1-2b y 7-1c).

Posteriormente en el desarrollo, durante la retracción de la banda germinal, se produce un aumento muy considerable en la intensidad de la señal, así como en la cantidad de células implicadas. De hecho, prácticamente todo el mesodermo inicia la transcripción de este gen, y puede seguirse con claridad el proceso de separación entre las fracciones visceral y somática del mesodermo (figura 7-1d y e).

Al igual que ocurre con el patrón de β -galactosidasa de la cepa PP2, la señal ocupa toda la masa de mesodermo por debajo de la epidermis de cada segmento en los estadios posteriores a la retracción de la banda germinal, pero en los que todavía no se ha completado la formación de los músculos (estadios 13-14). Dado que en embriones tardíos toda la musculatura somática se tiñe (ver las figuras 7-1f y g), los embriones se oscurecen bastante y resulta difícil aclarar la expresión del gen en estructuras internas. En concreto, no conocemos si PP2 se expresa en el mesodermo visceral de embriones tardíos, aunque es probable porque se observa una expresión fuerte en embriones más jóvenes (estadio de retracción de banda germinal) y en algunos embriones puede observarse señal que por la posición en el embrión podría ser el mesodermo visceral (figura 7-1g).

VASO DORSAL: No hemos detectado señal clara en el vaso dorsal.

SISTEMA NERVIOSO CENTRAL: Se detecta claramente señal en el SNC según un patrón complicado, aunque menos definido que en el caso de la detección con anticuerpos (ver la figura 7-1h).

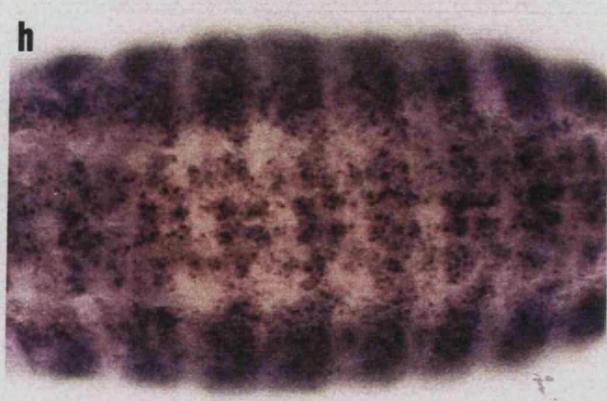
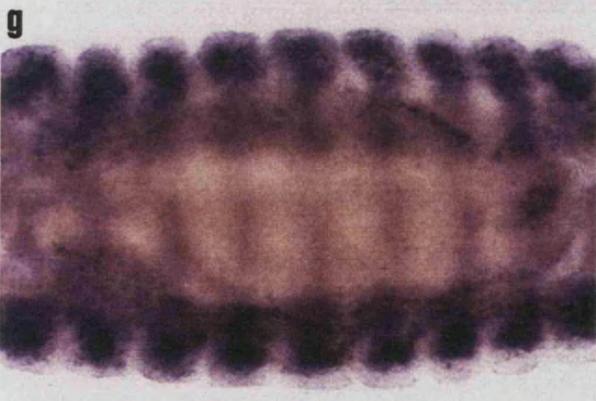
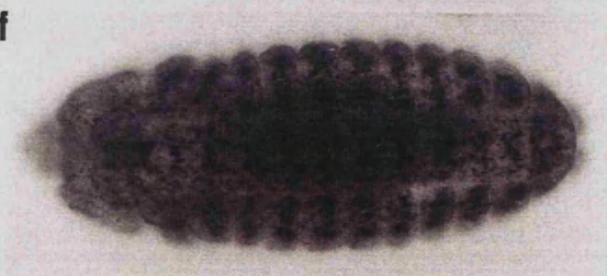
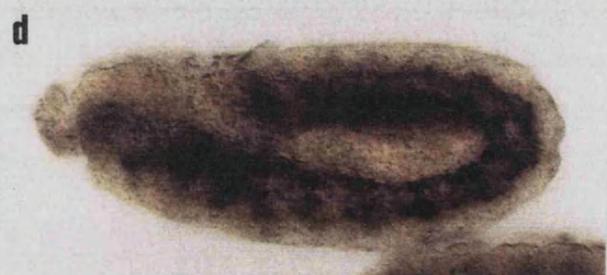
EPIDERMIS: A diferencia del patrón de expresión de β -galactosidasa de la cepa PP2, la transcripción del gen no se inicia (o no es detectable) en la epidermis de embriones en banda germinal extendida.

8. SECUENCIACIÓN DE cDNAs Y ESTRUCTURA DE EXONES

8.1. Análisis de secuencias

Hemos realizado varios alineamientos de secuencias con objeto de aclarar las relaciones existentes entre los distintos cDNAs que hemos caracterizado en la región. Con ello se pretende poner de manifiesto las regiones comunes, si existe corte y empalme alternativo y, en general, cualquier aspecto relevante de la estructura del gen. Además, como veremos posteriormente, también hemos obtenido datos de secuencia de algunos fragmentos de DNA genómico. En uno de estos casos, el fragmento *Hind* III de 0,5 kb de λ Dm.TE1, se ha realizado un alineamiento con λ cDm.D que sugiere que se trata de un cDNA parcial. Finalmente, hemos analizado la posibilidad de que λ cDm.D y λ cDm.B contuvieran alguna pauta de lectura mediante los programas TESTCODE y CODONPREFERENCE.

FIGURA 7-1: Patrón de expresión del gen PP2, en embriones Oregon-R, detectado con la sonda *Hind* III de 2 kb del clon λ Dm.TE1 (marcada con el número 4 en la figura 5-1). A continuación se especifican los estadios aproximados para cada embrión así como el aspecto que se pretende destacar del patrón de expresión. (a) Embrión en estadio 11 en el que se observan los doce grupos de células mesodérmicas típicas así como la señal adyacente a la apertura del estomodeo. Detalle a mayor aumento del mismo embrión (b). En la foto (c) se muestra una visión ventral de un embrión en estadio 11, que en una visión lateral sería como (a). Los embriones (d) y (e) muestran la transcripción del gen PP2 tanto en el mesodermo visceral como en el somático durante la etapa de retracción de la banda germinal, el momento en el que se separan ambas capas mesodérmicas. El embrión en (f) es una visión general de un embrión tardío donde el gen PP2, probablemente, se expresa en todo el mesodermo somático. Asimismo, se observa señal en el SNC. Ambos aspectos del patrón de expresión se muestran con mayor detalle en las fotos (g) y (h). En la primera puede observarse la expresión tanto en el mesodermo visceral como en el somático y en la segunda un detalle de la expresión en el SNC.



8.1.1. Alineamiento de las secuencias de λ cDm.D y dc12.

En primer lugar, el alineamiento con el programa BESTFIT entre λ cDm.D y dc12 muestra que existe una identidad prácticamente absoluta desde el nucleótido 1015 hasta el 1325 de dc12, y que para λ cDm.D esta identidad empieza en su primer nucleótido y se extiende hasta el 310, a partir de donde ambas secuencias divergen completamente (figura 8-1). Estas observaciones son compatibles, en primer lugar, con la existencia de un exón común para dc12 y λ cDm.D (hasta el nucleótido 310 de λ cDm.D) y exones distintos a partir de este punto, es decir corte y empalme alternativo, y en segundo lugar, con que λ cDm.D sea un cDNA parcial. Como veremos posteriormente (ver el apartado 8.2), hemos podido aclarar los límites de un exón para dc12 en esta zona, que λ cDm.D no cubre por completo, y que apoya el hecho de que se trata, en efecto, de un cDNA cuya síntesis ha terminado prematuramente. Además, el alineamiento del extremo 5' de este cDNA con la secuencia del fragmento genómico donde hibrida muestra una región muy poliadenilada que podría haber terminado prematuramente la síntesis del cDNA (ver la figura 8-2).

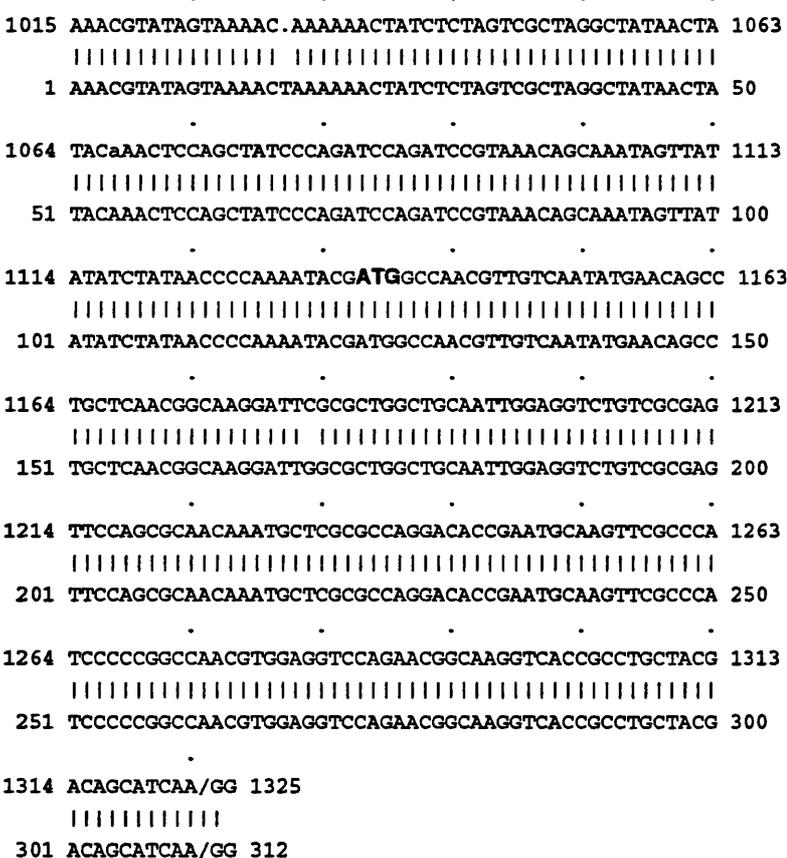


FIGURA 8-1. Alineamiento generado por el programa BESTFIT entre las secuencias de los cDNAs dc12 (línea superior) y λ cDm.D (línea inferior). Obsérvese que la identidad es prácticamente absoluta desde el inicio de λ cDm.D hasta el nucleótido 310, donde existe un límite intrón-exón (señalado con una barra vertical, ver también la figura 8-7). Se ha señalado en negrita el codón ATG donde se inicia la pauta de lectura de dc12. El dinucleótido en común GG en posición 311 procede de exones distintos, pero se conserva entre los cDNAs porque forma parte de las señales para el corte y empalme del mensajero.

Resulta interesante destacar que la pauta abierta de lectura de dc12 se inicia tan sólo 189 nucleótidos (63 codones) antes de llegar al final del exón (ver la figura 8-1), a partir de donde cada tipo de transcrito se une a exones distintos. En el caso de dc12 el nuevo exón mantiene la pauta de lectura y codifica para una proteína de aproximadamente 330 aminoácidos, mientras que en el caso de λ cDm.D la pauta se mantiene tan solo unos 250 nucleótidos y produciría una proteína de tan sólo 84 aminoácidos. Este hecho permite especular algunas hipótesis sobre mecanismos de regulación de la unidad de transcripción (ver Discusión y el apartado 8.1.3).

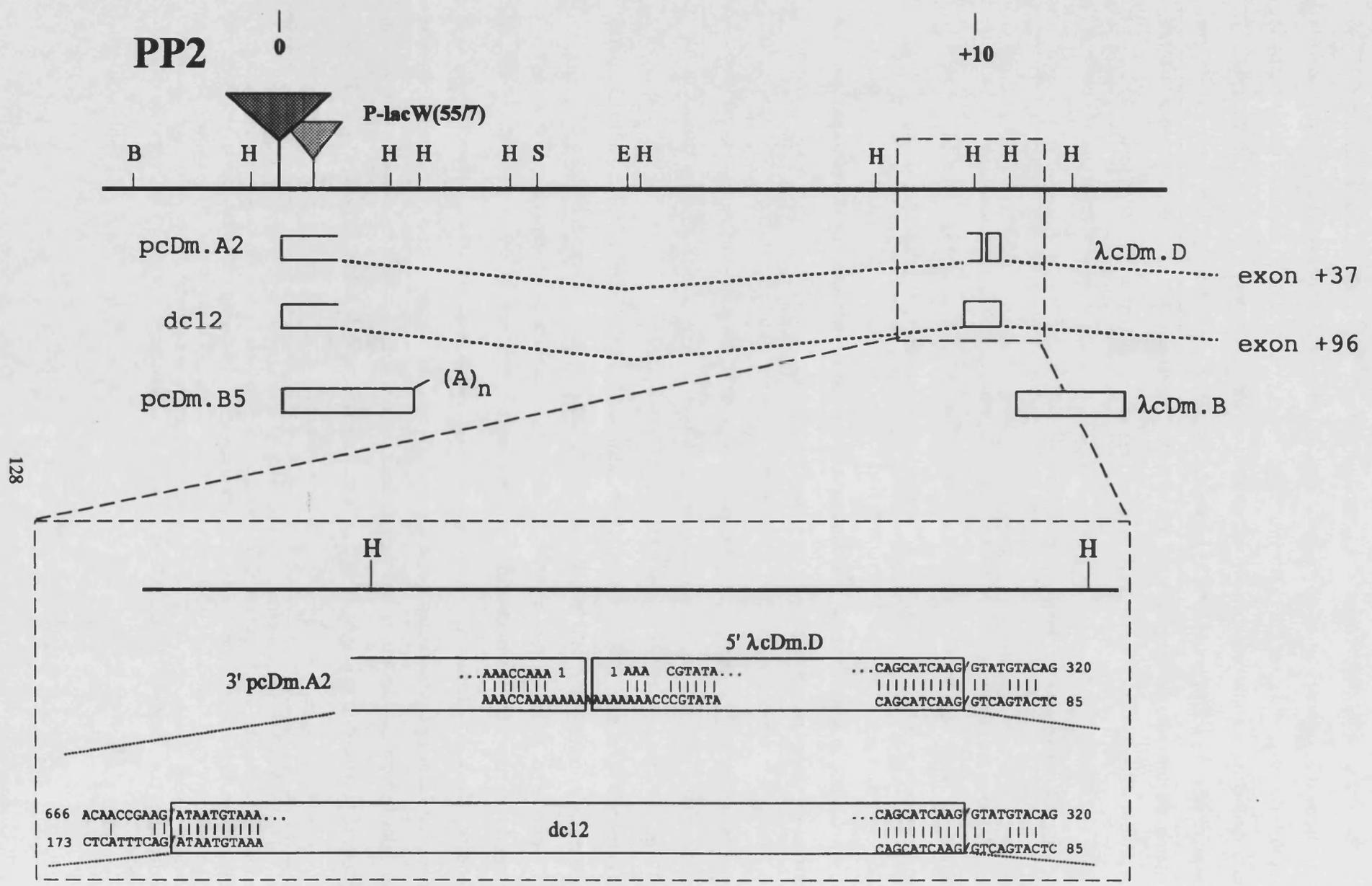
8.1.2. Localización del inicio de la transcripción

Aunque no se han realizado trabajos específicamente orientados a identificar el punto de inicio de la transcripción, sí tenemos datos de secuencia de tres cDNAs cuyos extremos 5' se han localizado en el mismo fragmento de restricción, en concreto, pcDm.A2, pcDm.B5 y dc12. El alineamiento entre ellos puede aclarar si han iniciado su transcripción en un mismo punto (o muy próximo), o por el contrario existen varios inicios de la transcripción (aunque también podrían ser clones parciales en 5' en este caso).

Así pues, hemos realizado un alineamiento múltiple de las secuencias en 5' de los cDNAs antes mencionados, es decir, pcDm.A2, pcDm.B5 y dc12. En todos los casos, los cDNAs son prácticamente idénticos en sus extremos 5'. La diferencia más notable se da entre pcDm.A2 y dc12, que empieza 40 nucleótidos después de pcDm.A2 (ver la figura 8-3). El alineamiento entre los extremos 5' de pcDm.B5 y λ cDm.A2 muestra que también pcDm.B5 inicia su transcripción en la misma posición, tan solo 29 nucleótidos después de pcDm.A2 (ver la figura 8-3).

Por tanto, el hecho de que tres cDNAs independientes presenten su extremo 5' en un intervalo de tan solo 40 nucleótidos sugiere fuertemente que el inicio de esta unidad de transcripción se encuentra en esa región, en concreto, en el fragmento de 2 kb *Hind* III del clon genómico λ Dm.TE1 (ver las figuras 5-1 y 6-2) pues es altamente improbable que tres cDNAs parciales independientes terminen en posiciones tan cercanas. Sin embargo, esto no descarta, en absoluto, que puedan existir otros sitios alternativos de inicio de la transcripción.

FIGURA 8-2. Representación esquemática de la localización de varios cDNAs sobre el DNA genómico. Se muestra ampliada la región recuadrada para aclarar la relación existente entre los cDNAs dc12, pcDm.A2 y λ cDm.D, así como los alineamientos de estos dos últimos con la secuencia del fragmento genómico *Hind* III de 0,5 kb representado. Nótese que la interfase entre pcDm.A2 y λ cDm.D presenta varias adeninas en el DNA genómico y que la separación entre ambos son apenas 10 nucleótidos. Los cDNAs dc12 y λ cDm.D no se han representado en su totalidad. La figura se ha dibujado a escala.



```

299 GTTCTGTGTCAGCGGAAAAGTGAATTATACCAGAGCCTGCCTGAAAACTCA 78 pcDm.A2
    |||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||
11  GTTCTGTGTCAGCGGAAAAGTGAATTATACCAGAGCCTGCCTGAAAACTCA 50 pcDm.B5
    |||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||
    1  GGAAAAGTGAATTATAGCAGAGCCTGCCTGAAAACTCA 39 dc12

79  AGAAAACCCCATCAAAGAAATAGCAGCTCTCAGCTAAATAATAACAAACA 128
    |||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||
511 AGAAAACCCCATCAAAGAAATAGCAGCTCTCAGCTAAATAATAACAAACA 100
    |||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||
400 AGAAAACCCCATCAAAGAAATAGCAGCTCTCAGCTAAATAATAACAAACA 89

1299 CAATACTTTCTGCTCAGTCACCGCAAACAGAAATAATCACAAATTCGCAA 178
    |||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||
1011 CAATACTTTCTGCTCAGTCACCGCAAACAGAAATAATCACAAATTCGCAA 150
    |||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||
900  CAATACTTTCTGCTCAGTCACCGCAAACAGAAATAATCACAAATTCGCAA 139

1799 AACGCCGTCATC.AAAAAAGTTTGTAGCCTACAACCTCTAGAAA 219
    |||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||
1511 AACXCCGTCATCAAAAAAGTTTGTAGCCTACAACCTCTAGAAA 192
    |||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||
1400 AACGCCGTCATC.AAAAAAGTTTGTAGCCTACAACCTCTAGAAA 180
    |||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||

```

FIGURA 8-3.
Alineamiento de los extremos 5' de las secuencias de los cDNA pcDm.A2, pcDm.B5 y dc12 según se indica en la figura. Obsérvese que el alineamiento es prácticamente perfecto y que pcDm.A2 inicia la transcripción 40 nucleotidos antes que dc12, una diferencia que puede no ser significativa.

8.1.3. Identificación y análisis de las pautas abiertas de lectura

Una vez obtenidas las secuencias completas de los clones λ cDm.D y λ cDm.B, procedimos a buscar en los mismos las regiones con capacidad codificante mediante el programa FRAMES, que representa todas las pautas de lectura posibles de un mRNA. En las figuras 8-4a y 8-5a se muestra el resultado de estas búsquedas para λ cDm.D y λ cDm.B, respectivamente.

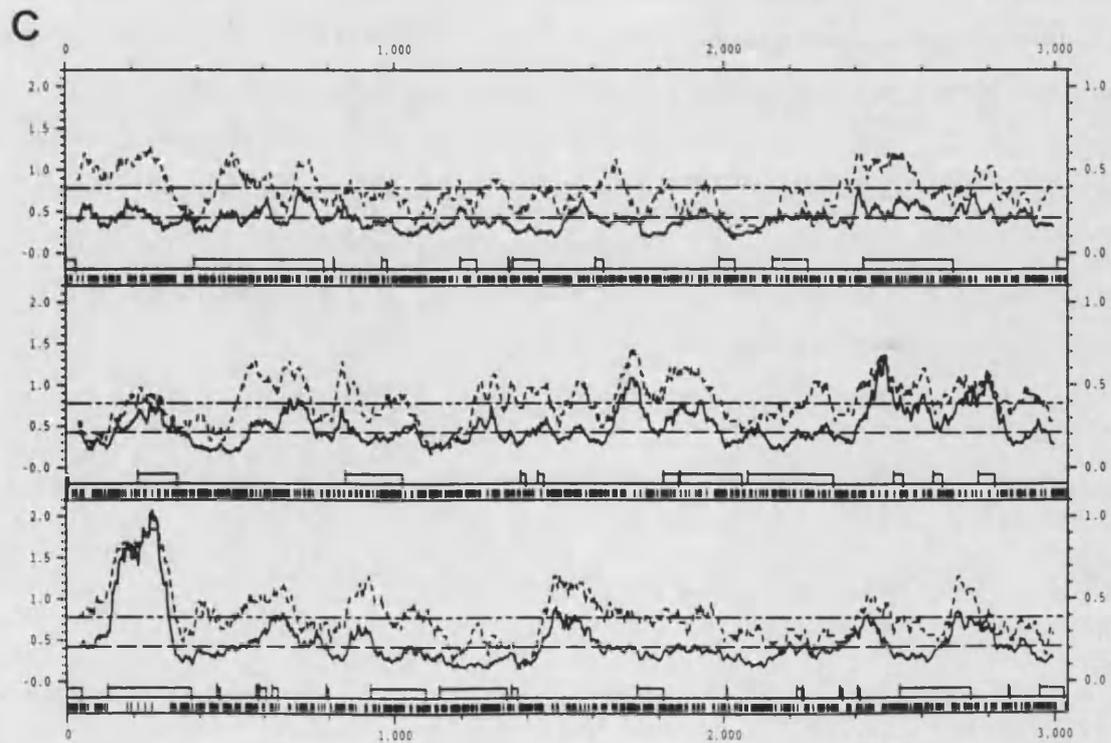
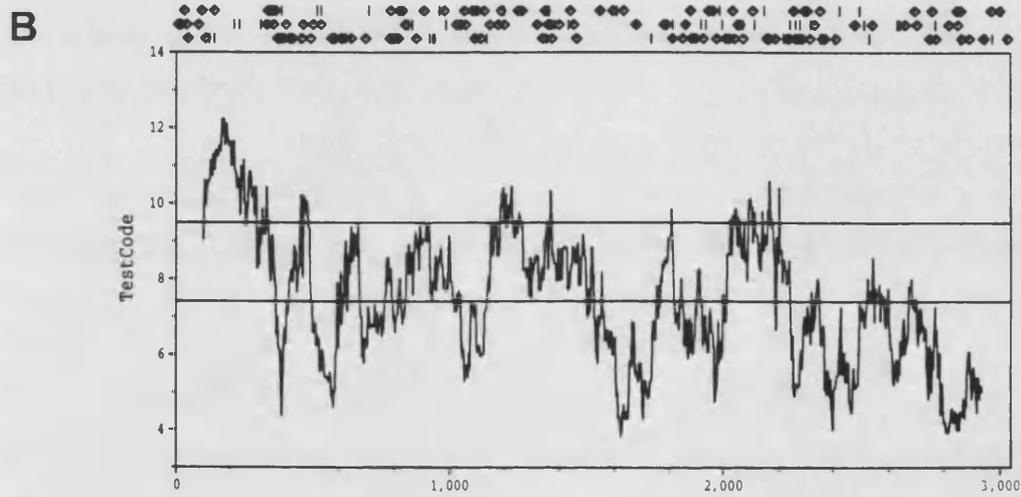
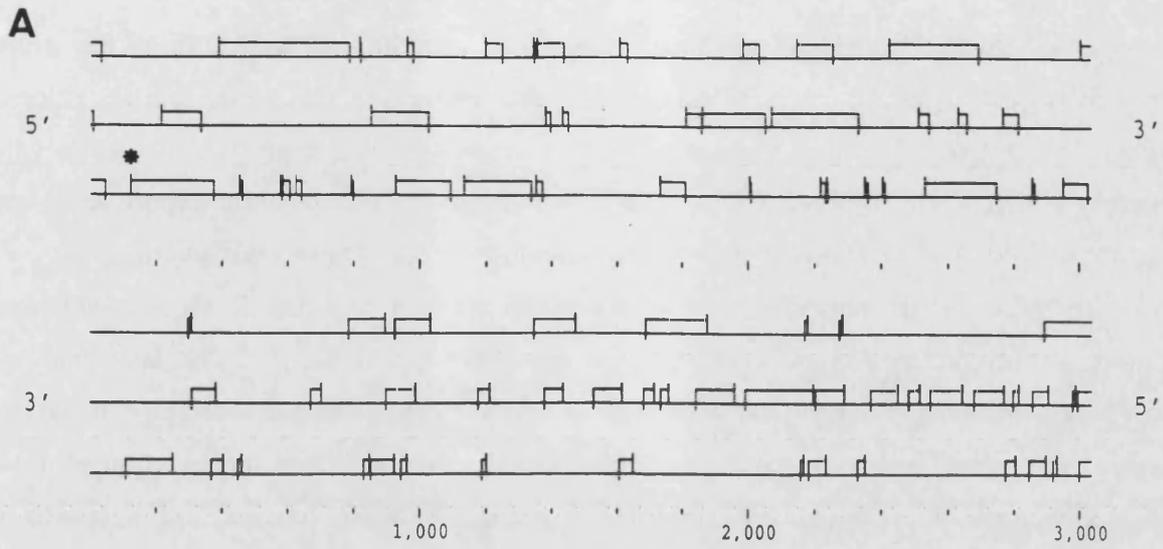
Centrándonos en el clon λ cDm.D destacan dos hechos en esta búsqueda. En primer lugar, la pauta de lectura donde se inicia la proteína del clon dc12 (señalado el codón de inicio en la figura 8-1), no tiene la misma continuidad en el caso del clon λ cDm.D. De hecho, aparece un codón de parada a unos 200 nucleotidos del inicio (ver la figura 8-4a) y, aparentemente, este cDNA no tiene capacidad para codificar una proteína, o bien codificaría para una proteína muy pequeña. En segundo lugar, en otra pauta de lectura, pero inmediatamente a continuación de la anterior, (ver la figura 8-4a) aparece otra región algo mayor con potencialidad codificante. En este caso, los aproximadamente 400 nucleotidos podrían codificar para una proteína ligeramente mayor, de 130 aminoácidos. Nótese que, en ambos casos, las posibles pautas de lectura están en la orientación correcta pues se disponen en el mismo sentido 5'-3' que el cDNA. Una posibilidad es que las dos pautas señaladas anteriormente se debiesen a un error en la secuenciación que hubiera provocado un corrimiento en la pauta y, con ello, una terminación prematura de la primera región con pauta de lectura. Hemos analizado con mayor detalle esta posibilidad mediante los programas TESTCODE y CODONPREFERENCE.

El programa TESTCODE del paquete informático GCG se basa en el método desarrollado por Fickett (1982). Este test estadístico no necesita ninguna tabla de frecuencia de uso de codones y es independiente del marco de lectura. Se basa en la medida de la desviación en la composición de la tercera base respecto de una distribución al azar. Es decir, empezando en cualquier nucleótido de una secuencia, los sucesivos nucleótidos a +3 respecto de él no se distribuirán al azar, sino que se desviarán de una distribución aleatoria. El programa utiliza y representa un estadístico matemático que mide esta desviación.

La figura 8-4b muestra el resultado de este análisis para el clon λ Cm.D. En la representación, una región con valores por encima de 9,5 tiene una probabilidad del 95% de ser codificante según el programa. A una región con valores por debajo de 7,5 el programa le da una probabilidad del 95% de no ser codificante. Los valores intermedios corresponden a regiones donde el programa no puede hacer predicciones significativas. Como puede observarse, tan solo se predice una región claramente codificante, que es el fragmento de secuencia compartido con dc12. A partir del nucleótido 350 aproximadamente, los valores que asigna el programa, bien no dan información significativa (entre las dos líneas horizontales), o caen claramente en valores donde la predicción es de no codificar para proteína alguna. Por lo tanto, el resultado global del test sería que no hay ninguna pauta de lectura más que la que se inicia en el codón AUG en el que empieza dc12, y que λ Cm.D, en caso de producir una proteína, sería probablemente la comprendida entre el inicio de dc12 y su codón de parada a 254 de éste. Esta región podría codificar una proteína de tan solo 84 aminoácidos

El programa CODONPREFERENCE confirma el resultado anterior y descarta en gran medida la posibilidad de un error en la secuenciación. En concreto, este programa trata de reconocer las secuencias codificantes de dos modos: por una frecuencia en el uso de los codones semejante a la encontrada en otros genes, y por una desviación en la composición de la tercera base de los codones hacia GC y no una distribución al azar.

FIGURA 8-4 En esta figura se muestran los inicios y fines de todas las pautas de lectura posibles (A), la predicción de regiones codificantes del programa TESTCODE (B) y la del programa CODONPREFERENCE (C) para el clon λ Cm.D. Obsérvese en la parte (A) que la pauta de lectura más larga son aproximadamente 400 nucleótidos, que podrían codificar para unos 133 aminoácidos. Hemos señalado con un asterisco el codón AUG en el que empieza la región codificante para el cDNA dc12. Como puede observarse, esta pauta de lectura no tiene continuidad en el clon λ Cm.D. En la parte (B) se representa, además de la predicción del programa TESTCODE, todas las posibles pautas de lectura en la parte superior. Una línea vertical indica un codón AUG mientras que un pequeño diamante indica un codón de parada. La parte (C) de esta figura son las representaciones de los valores de uso de codones (en línea continua) y la desviación en la composición de la tercera base de los codones respecto de una distribución al azar (línea discontinua) en cada pauta de lectura, representada en la parte inferior de cada gráfica. Hemos utilizado la tabla de uso de codones para genes de expresión elevada de *Drosophila* del paquete GCG. Ver texto para más detalles.



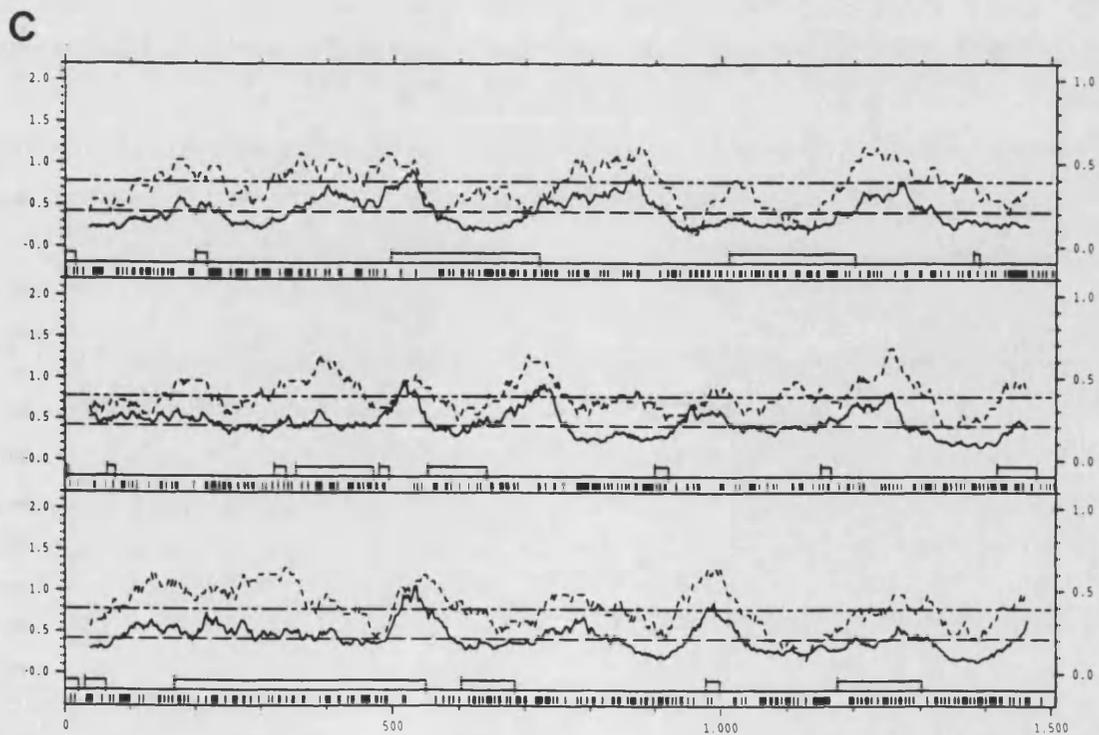
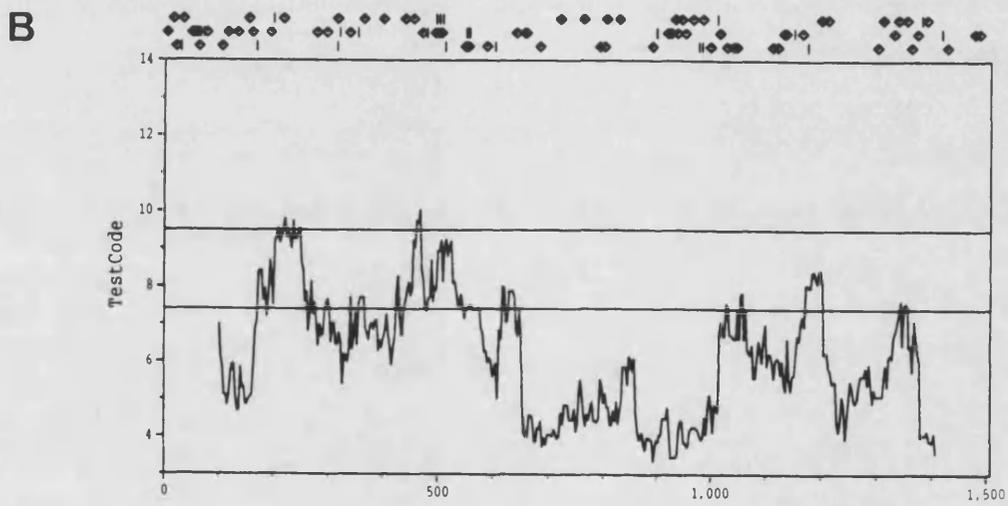
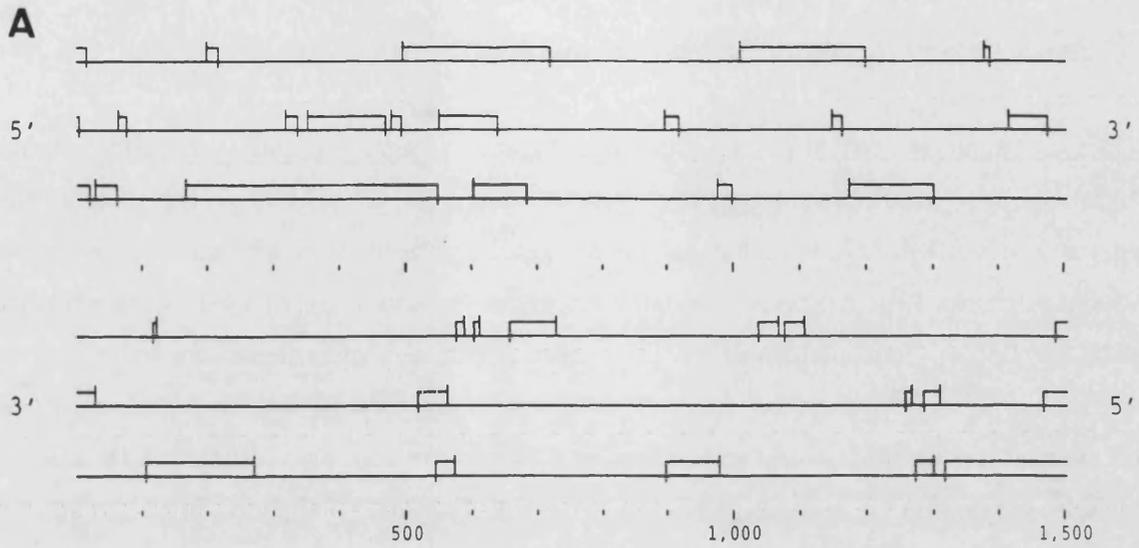
Una de las informaciones más interesantes que puede dar este programa es que un error de secuenciación que provoque un corrimiento en la pauta de lectura hará que los valores de semejanza en el uso de codones en un pauta disminuyan, pero, al mismo tiempo, estos valores pueden subir para otra pauta, y lo mismo para la desviación en la composición de la tercera base de los codones. De este modo se pueden identificar errores de secuenciación.

La figura 8-4c muestra el resultado de este test para el clon λ cDm.D. Obsérvese cómo, de nuevo, la única región con un uso de codones semejante al de otros genes de *Drosophila* y una desviación significativa en la composición de la tercera base de sus codones respecto de una al azar, es la región común con dc12 ya comentada anteriormente. Las demás regiones del clon caen claramente en valores que no predicen ninguna región codificante. Respecto a la posibilidad de un error de secuenciación, la bajada en los valores de preferencia de codones en la pauta 3 no se correlacionan con ninguna subida en otra pauta de lectura. Sólo se observa una ligera subida en los valores de desviación en la tercera posición de los codones en la primera pauta, pero es una subida muy moderada que no parece significativa.

Respecto al clon λ cDm.B el comentario que podemos hacer es muy semejante. En este caso se observa una pauta de lectura también corta, aunque no lo suficientemente corta como para ser desestimada sin más consideración (ver la figura 8-5a). La pauta más larga llega a los 400 nucleótidos, aunque en este caso el cDNA no presenta cola poli(A)*. Un análisis de este cDNA con el programa TESTCODE es muy claro en el sentido de que, aunque existe una región con una pauta de lectura posible porque es relativamente larga, en esa región la predicción del programa es claramente que no se trata de una región codificante.

Del mismo modo, la predicción del programa CODONPREFERENCE en sus dos medidas de uso de codones y desviación en el uso de nucleótidos en la tercera posición de los codones, es en el sentido de que no existen regiones codificantes en este cDNA. Aunque los valores son relativamente altos para la desviación en el uso de nucleótidos en la tercera posición en la región de la pauta de lectura mayor, estos valores son, en general, altos para todo el cDNA y no los consideramos significativos. En conjunto, pues, todo indica que tampoco la pauta más larga encontrada en este cDNA codifica para una proteína.

FIGURA 8-5 Representación de todas las pautas de lectura posibles (A), de la predicción del programa TESTCODE (B) y de CODONPREFERENCE (C) para el clon λ cDm.B. Obsérvese que la pauta de lectura más larga llegaría a los 400 nucleótidos. Sin embargo, las predicciones de los dos programas mencionados indican que no se trata de una región codificante. Se utilizan los mismos símbolos que en la figura 8-5 y la misma tabla de uso de codones. Ver el texto para más detalles.



8.2. Secuenciación parcial de fragmentos genómicos

Con objeto de determinar la estructura del gen PP2, hemos secuenciado varios fragmentos genómicos, en los que conocíamos la presencia de exones por señales de hibridación (ver los apartados 6.1, 6.2 y 6.3), en busca de las secuencias consenso para el corte y empalme del mRNA primario. Nos basamos, fundamentalmente, en dos observaciones para proponer la existencia de un límite intrón-exón. En primer lugar, el alineamiento entre las secuencias genómicas y del cDNA debe mostrar claramente una región donde el alineamiento es prácticamente perfecto (las incertidumbres se deben a que sólo se ha secuenciado una cadena del DNA genómico) y que corresponderá a la porción exónica. En segundo lugar, en el inicio de la región alineada con el cDNA deben aparecer las secuencias consenso para la maduración del mensajero primario. Hemos tomado las secuencias consenso publicadas para *Drosophila* (Mount y col. 1992) y que comentamos a continuación.

Secuencia consenso para el sitio dador (5´):

M A G / G T R A G T A

Donde M=A,C; R=A,G. Los nucleótidos subrayados se conservan siempre y la barra indica el límite intrón-exón.

Secuencia consenso para el sitio aceptor (3´):

T T T Y Y Y T Y Y T N C A G / R T

Donde Y=C,T. De nuevo aparecen subrayados los nucleótidos más conservados.

Secuencia consenso para el punto de ramificación ("branchpoint sequence"):

W C T A A T Y

Donde W= A, T. Esta secuencia aparece normalmente a más de 15 nucleótidos del sitio aceptor.

Además, los sitios aceptores se caracterizan por un enriquecimiento en Timinas entre las posiciones -10 y -30 respecto del sitio aceptor, que normalmente suponen un 50% o más.

Con este planteamiento hemos detectado los siguientes límites intrón-exón:

1. Sitio aceptor en el fragmento *Hind* III de 1,4 kb del clon λ Dm.TE1 (marcado con el número 7 en la figura 5-1). En un fragmento adyacente hibridan los cDNAs pcDm.A2 y dc12, por lo que esperamos que en este fragmento se encuentre el sitio aceptor de un intrón. La figura 8-6 presenta el alineamiento del programa GAP de las secuencias del fragmento genómico y el cDNA. Se muestra subrayada la secuencia que mejor se ajusta a la consenso para un sitio aceptor y con una barra vertical el límite intrón-exón.

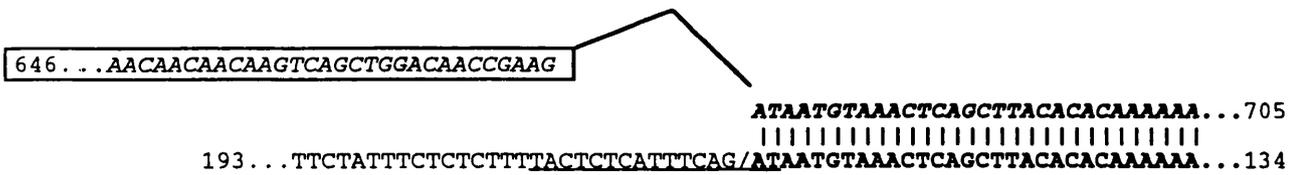


FIGURA 8-6 Alineamiento entre las secuencias del cDNA dc12 (parte superior y en cursiva) y del fragmento genómico *Hind* III de 1,4 kb del clon λ Dm.TE1 (línea inferior). Subrayado se muestra el sitio aceptor y con una barra vertical se separa el límite entre el exón (en el lado derecho y en negrita) y el intrón (lado izquierdo). Se muestra recuadrada la secuencia del clon dc12 del exón anterior.

2. Un sitio dador en el fragmento *Hind* III de 0,5 kb del clon λ Dm.TE1, en el que hibridan tanto pcDm.A2 como λ cDm.D (ver el apartado 6.2). En la figura 8-7 se presenta el alineamiento generado con el programa GAP entre la secuencia de λ cDm.D y la secuencia del fragmento genómico. En él hemos subrayado la secuencia que mejor se ajusta a la consenso para un sitio dador y con una barra vertical señalamos el límite intrón-exón.

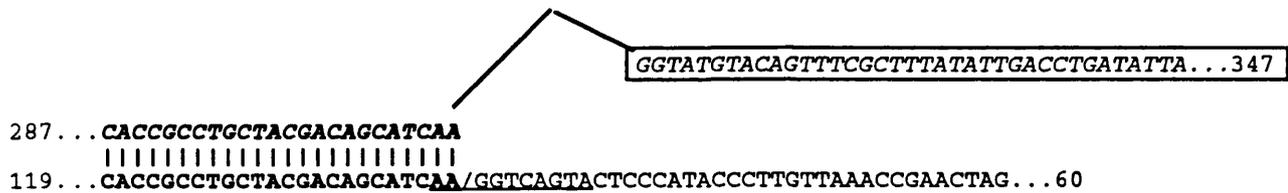


FIGURA 8-7. Alineamiento de las secuencias λ cDm.D y fragmento genómico *Hind* III de 0,5 kb del clon λ Dm.TE1 con el programa GAP. En la parte superior (y en cursiva) se muestra la secuencia del cDNA y en la parte inferior la secuencia del DNA genómico. Hemos subrayado la secuencia que mejor se ajusta al consenso para un sitio dador y con una barra vertical se señala el límite propuesto entre el exón (lado izquierdo, en negrita) y el intrón (lado derecho). Se muestra recuadrada la secuencia del siguiente exón.

3. Un sitio aceptor en el fragmento *Sal*/*Sac* del extremo del clon λ Dm.H, con el cual hibrida λ cDm.D y en el que esperamos encontrar, por tanto, un límite intrón/exón. El alineamiento entre las secuencias genómica y del cDNA se muestra en la figura 8-8. Se emplean los mismos símbolos que en los casos anteriores.



FIGURA 8-8. Alineamiento de las secuencias de λ cDm.D y del fragmento genómico *Sal* I/*Sac* I del extremo del clon λ Dm.H con el programa GAP. En la parte superior y en cursiva se muestra el cDNA. Se emplean los mismos símbolos que en el caso anterior para indicar el exón y el intrón. Recuadrada se presenta la secuencia del exón anterior del clon λ cDm.D.

9. ESTUDIO DE INSERCIONES LETALES DE LA REGIÓN 54A

9.1. Localización de las inserciones en la región clonada

Dado que no se conoce ninguna mutación que afecte al gen que estamos caracterizando (ver el apartado 2 de Discusión), nos planteamos iniciar el aislamiento de mutaciones del mismo que aclarasen su función en el desarrollo de *Drosophila*, y en especial su participación en la diferenciación muscular. Una posibilidad, aprovechando un programa de la Universidad de Berkeley (*Drosophila* Genome Project) para generar alelos recesivos letales de todos los genes de *Drosophila* (ver el apartado 1.1.1 de Material y Métodos), es la localización en la región que hemos clonado de inserciones letales que hayan sido localizadas citogenéticamente en 54A. Las inserciones identificadas en la región genómica donde se encuentra el gen PP2 pueden ser ellas mismas alelos del gen o, al menos, pueden servir para generar mutantes del gen por movilización mediante transposasa. Así pues, para localizar las 9 inserciones enumeradas en el apartado 1.1.1 de Material y Métodos, hemos seguido dos estrategias distintas:

En primer lugar, hemos obtenido los fragmentos de DNA genómico adyacentes a cada inserción mediante un rescate plasmídico idéntico al realizado con la inserción PP2, aunque en este caso el transposón es distinto (ver la figura 7-2 de Material y Métodos). Esta aproximación ha conducido a la clonación de DNAs adyacentes a P976, P1367, P2372, P1480 y P2373, pero no ha sido posible clonar nada en el resto de inserciones. Como paso previo al rescate realizamos un Southern Blot con tres digestiones distintas de DNA genómico total, *Xba* I, *Xba* I/*Spe* I y *Xba* I/*Nhe* I (ver Material y Métodos, figura 7.2.), empleando como sonda el plásmido pUR290. El objeto de este Southern Blot era comprobar el tamaño de los fragmentos híbridos plásmido-DNA genómico, así como confirmar la presencia de una única inserción en la cepa. En todos los casos identificamos alguna digestión en la cual el tamaño del fragmento híbrido DNA genómico-plásmido era asequible para la clonación en plásmido. Así pues, de cada una de las inserciones anteriores hemos rescatado los siguientes fragmentos (insertos obtenidos por digestión doble *Nhe* I/*Xba* I):

Cepa rescatada	DNA genómico recuperado
P976	1,6 kb
P2372	2,1 kb
P1480	4,7 kb
P1367	3,1 kb
P2373	9 kb

En estos casos, el DNA obtenido fue marcado y empleado como sonda en un Southern Blot frente a distintas digestiones de los clones de DNA genómico del paseo cromosómico realizado (ver el apartado 4). De este modo hemos podido situar la inserción P976 a unas +43 kb de PP2, en un fragmento *Hind* III/*Bam* HI de aproximadamente 2,3 kb, tanto en los clones lambda λ Dm.D2 (y los solapantes con él) como en el cósmido 85D4 (ver la figura 9-1 y 6-2). En los demás casos las inserciones están situadas, aparentemente, fuera de la región clonada, pues no hibridan con ningún fragmento genómico.

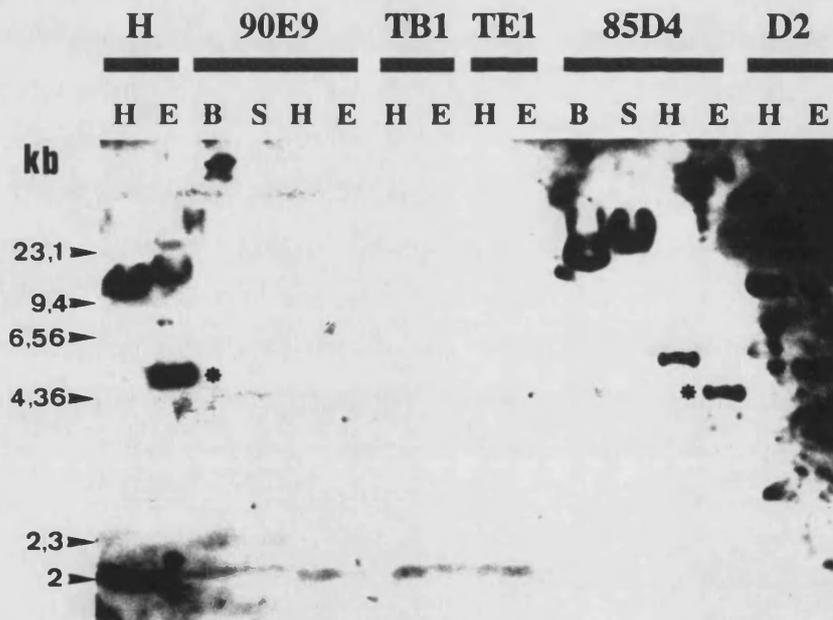


FIGURA 9-1. Southern Blot del DNA adyacente a la inserción P976 frente a las digestiones de los clones genómicos indicadas en la figura. Nuestra interpretación de este resultado localiza la inserción P976 del modo indicado en la figura 6-2. Las bandas con señal débil proceden de hibridación cruzada con el vector del cósmido. Nótese que los fragmentos detectados en la digestión *Eco* RI del cósmido 85D4 y de los clones λ Dm.H y λ Dm.D2 tienen distinto tamaño (bandas señaladas con un asterisco), lo cual indica la presencia de un sitio polimórfico, que se señala también en la figura 6-2. Se emplean las siguientes abreviaciones para los enzimas de restricción: E, *Eco* RI; H, *Hind* III; B, *Bam* HI; S, *Sal* I. Los nombres de los clones lambda se han abreviado a lo siguiente: TE1, λ Dm.TE1; TB1, λ Dm.TB1; H, λ Dm.H y D2, λ Dm.D2.

En el caso de las inserciones en las que no hemos podido rescar el DNA genómico adyacente a la inserción, la estrategia seguida es más complicada. Para ellas hemos tratado de identificar un fragmento de los clones genómicos que aumentara de tamaño en un Southern Blot frente a DNA genómico total de la cepa en cuestión. Sin embargo, esta aproximación exige emplear un elevado número de sondas de la región clonada y, dado que las inserciones se mantienen frente a un cromosoma equilibrado, en la hibridación se espera que en la región de la inserción aparezcan dos bandas, una correspondiente al cromosoma equilibrado y otra correspondiente al cromosoma portador de la inserción (que normalmente tendrá un tamaño superior).

De este modo hemos identificado dos inserciones más en la región 54A. Se trata de P2336, una inserción que se comporta como letal embrionaria y P1393, que es viable en homocigosis. Ambas se localizan en dos fragmentos *Hind* III pequeños, aproximadamente a +10 kb de la inserción PP2 (ver la figura 6-2).

Por último, según datos de Gerrit Begemann (EMBL, Heidelberg), la inserción P-lacW(55/7) se encuentra a sólo 0,5 kb de la inserción PP2, en dirección 3' en la unidad de transcripción (ver la figura 6-2). La dirección de la transcripción del gen *lacZ* en P-lacW(55/7) es la contraria a la que presenta la inserción PP2 (se muestra el caso de PP2 en la figura 5-1). Resulta interesante destacar que, en ambos casos, los datos genéticos y los moleculares están en perfecta concordancia. Es decir, PP2 se localiza inmediatamente antes del inicio de la transcripción de tres de los cDNAs caracterizados (λ CdM.A2, pcDm.B5 y dc12) y no produce ningún fenotipo visible y es viable en homocigosis. En cambio, la inserción P-lacW(55/7) provoca un fenotipo de letalidad y se encuentra situada 0,5 kb dentro del primer exón identificado. La inserción, probablemente, interrumpe la transcripción y/o el procesado del mRNA, y esto explicaría el diferente comportamiento de ambas inserciones.

9.2. Patrones de expresión de las inserciones

Hemos estudiado el patrón de expresión embrionario de las inserciones localizadas en la región 54A y adyacentes (ver el apartado 1.1.1 para un listado completo), con el objetivo de identificar aquéllas que presentasen un patrón de expresión mesodérmico semejante al de la inserción PP2 o, al menos, con algún elemento en común. Una inserción con un patrón de expresión como el indicado, es probable que se haya insertado dentro del gen PP2 o muy cerca de él, pues queda bajo el efecto de su/sus enhancer. Sin embargo, el razonamiento contrario puede no ser cierto, pues la expresión del elemento insertado va a depender también de las

condiciones locales que le rodeen y, aún estando cerca de un enhancer, no expresarse fuertemente. Hemos realizado este análisis detectando la producción de β -galactosidasa tanto directamente con el sustrato X-gal, como mediante un anticuerpo anti β -galactosidasa (ver el apartado 6 de Material y Métodos).

En primer lugar, de la serie de 9 cepas de trampa de los enhancer, hemos encontrado que 4 de ellas no producen β -galactosidasa en el mesodermo (ni posteriormente en la musculatura somática o visceral), al menos de forma apreciable con claridad. Se trata de las cepas P976; P1367; P1393 y P2372.

En segundo lugar, otro grupo de inserciones presentan, al menos, una cierta señal en la musculatura somática. Se trata de las inserciones P1369; P1480; P2336; P2034 y P2373. De ellas, la que presenta un patrón más claramente semejante al de PP2 es la inserción P1480. En los embriones de esta cepa se inicia la expresión del gen *lacZ* en el estadio 11 en forma de pequeños grupos de células en la epidermis que, posteriormente, abarcan la porción posterior de los segmentos, en forma de bandas. Finalmente, es posible observar señal débil en la musculatura somática. En conjunto, este patrón de expresión presenta varios elementos en común con el de la cepa PP2. En primer lugar se inicia en el mismo momento y de la misma forma, el estadio 11 en grupos de células epidérmicas. En segundo lugar, evoluciona de forma semejante, pues termina afectando a la musculatura somática. Así pues, la inserción P1480 podría estar bajo la influencia del mismo enhancer que controla la expresión del gen PP2, pues tiene un patrón de expresión con elementos en común. Esta observación, dado que la inserción P1480 se ha localizado citogenéticamente en el intervalo 53F1-5, indicaría que al menos un enhancer del gen PP2 se encuentra en 5' respecto de la unidad de transcripción.

10. ANÁLISIS GENÉTICO

La caracterización completa de un nuevo gen exige su descripción tanto a nivel molecular como genético, es decir, averiguar su estructura y las funciones que ejerce en el organismo. Esta segunda etapa es, normalmente, la más larga y compleja.

El análisis genético clásico se ha basado en el estudio del fenotipo de mutantes del gen, obtenidos bien de modo espontáneo o inducido. En este sentido, en la actualidad, se pueden emplear estrategias más directas. En concreto, una inserción cercana a un gen de interés de un elemento P modificado y portador de un marcador fenotípico (como las inserciones que hemos utilizado en este estudio), puede ser movilizadas mediante una fuente de transposasa y, de entre los cromosomas revertientes (aquellos que han perdido el gen marcador de la inserción), buscar

alguno que, en la excisión del transposón, haya generado un pequeño daño genético en sus cercanías. Estos cromosomas revertientes pueden ser alelos del gen de interés, y el estudio de su fenotipo puede aclarar la función del mismo.

En esencia, esta ha sido nuestra estrategia con las inserciones localizadas dentro de la región genómica en que se encuentra PP2. Sin embargo, dado que todavía no sabemos el tamaño real del gen, y en especial su extremo 3', también hemos analizado en cierta medida el comportamiento de otras inserciones.

Por último, la información genética recopilada en la base de datos de *Drosophila* "Flybase" indica que en la región en la que estamos interesados (54A) no existen deleciones descritas que puedan facilitar el análisis genético.

10.1. Test de letalidad de las inserciones de la región 54A.

Como primera aproximación al estudio genético de las distintas inserciones de la región 54A nos planteamos determinar si eran viables en homocigosis o no y, en caso de letalidad, acotar en qué momento del desarrollo se produce la muerte. Para ello hemos seguido el procedimiento detallado en el apartado 15.1 de Material y Métodos y los resultados se reflejan en la siguiente tabla:

	P976	P1367	P1369	P1393	P1480	P2034	P2336	P2372	P2373
VIABILIDAD	letal	letal	letal	viable	viable	letal	letal	viable	letal
FASE	embrión	larvaria	larva 1			larva 1	larvaria		larva 1
LETALIDAD									

TABLA 10-1. Viabilidad en homocigosis y fases de letalidad observadas en las nueve inserciones de la región 54A y adyacentes.

Sin embargo, estos datos deben tomarse con precaución pues al mantener los cromosomas portadores de la inserción equilibrados frente a *CyO* durante mucho tiempo, éste puede acumular letales que enmascaren el fenotipo real de la inserción, o incluso modificadores o supresores del fenotipo producido por ésta. De hecho, hemos podido identificar un problema de este tipo en la inserción P976 pues, tal como se indica en el apartado 10.3, la movilización de la inserción no conduce a revertientes que recuperen la viabilidad y, por tanto, debemos concluir que existe un letal en el cromosoma portador de la inserción.

Por otro lado, la inserción P2373 produce un fenotipo muy interesante en el que los embriones llegan a eclosionar pero las larvas presentan problemas de motilidad. Esto puede indicar un problema bien en la inervación de la musculatura de estas larvas o bien en la musculatura misma.

10.2. Test de complementación de la letalidad entre las distintas inserciones.

Como hemos visto, las inserciones P976, P1367, P1369, P2034, P2336 y P2373 se comportan como letales y esta letalidad, en principio, puede ser debida a que la inserción ha interrumpido un gen vital. Para conocer si varias de ellas estaban afectando a un mismo gen, realizamos un ensayo de complementación de la letalidad entre las distintas cepas. Se espera, de dos inserciones que estén afectando a la misma función génica que no complementen y que, por tanto, en un cruzamiento entre dos de estas cepas, todas las moscas de la F1 lleven el marcador fenotípico del cromosoma con letales equilibrados.

En todos los cruces ensayados entre las inserciones siempre ha habido complementación. Este resultado significa, pues, que las inserciones afectan a funciones genéticas distintas. Sin embargo, de nuevo estos resultados deben tomarse con reservas, pues los cromosomas portadores de la inserción pueden llevar en otro punto del cromosoma un letal que sea la verdadera causa de la letalidad y no la inserción. Un cromosoma con este problema ha sido el de la inserción P976 (ver siguiente apartado). En esta cepa, si la inserción no provoca ningún efecto sobre un gen vital, va a haber complementación frente a cualquier inserción cercana a la suya porque la causa de su letalidad no es la inserción.

10.3. Estudio de revertientes

En el curso de la caracterización genética del gen PP2, hemos estudiado dos tipos de revertientes de inserciones en la región 54A o cercanas a ella (ver lista en apartado 1.1.1 de Material y Métodos). Se trata de tres revertientes espontáneos aislados por la Dra Mar Ruiz Gómez (Departamento de Zoología, Universidad de Cambridge), rev2373, rev¹ 2336 y rev²⁺³ 2336, y de 19 revertientes independientes generados en nuestro laboratorio por movilización de la inserción P976 mediante una fuente de transposasa (ver el apartado 15.2 de Material y Métodos). A continuación enumeramos estos últimos. Su genotipo general es *cn, P(ry)CyOSbw; ry⁵⁰⁶/ry⁵⁰⁶*

9.3	9.6	9.10	9.21	9.24	9.30	9.41	9.42	9.43	9.46
9.52	9.53	9.55	9.56	9.57	9.60	9.61	9.62	9.64	

El aspecto más notable de esta movilización ha sido que, en contra de lo esperado, la pérdida de la inserción del transposón PZ de la cepa P976 no conduce al rescate de la viabilidad. Por el contrario, todos los stock de revertientes establecidos se comportan como letales. La única interpretación de este resultado es que, en el curso del mantenimiento de la cepa, y debido a que este cromosoma se mantiene en heterocigosis con un cromosoma portador de letales equilibrados, ha aparecido una mutación letal que enmascara el fenotipo que pueda producir la inserción PZ de P976. Este mismo resultado ha sido obtenido, independientemente, por Gerrit Begeman (com. pers.).

Por otro lado, también hemos llevado a cabo el experimento de movilización para la inserción P2336, siguiendo el mismo esquema de cruzamientos que en el caso de P976. Sin embargo, no hemos obtenido ningún revertiente y debemos concluir que, por alguna razón (tal vez una pequeña deleción en los extremos del vector P-1ArB) esta inserción no es movilizable por transposasa. Esta interpretación se ve apoyada por el hecho de que tras varios intentos no se ha podido rescatar el plásmido del transposón PZ de esta inserción.

Respecto a los tres revertientes espontáneos rev2373, rev¹ 2336 y rev²⁺³ 2336, presentan un fenotipo de letalidad, aunque no hemos estudiado en qué fase del desarrollo se produce la muerte del individuo. Por otra parte, ante la posibilidad de que estos revertientes espontáneos hubiesen generado una deleción visible citológicamente procedimos a estudiar el bandeo de sus cromosomas politénicos. Dado que estos cromosomas son letales en homocigosis, la cepa debe cruzarse previamente por una cepa salvaje (Or-R en este caso) y preparar cromosomas de los descendientes. En las preparaciones seleccionamos aquellas que no portaban el cromosoma CyO, y en ningún caso se pudo observar indicio alguno de deleción con el nivel de resolución del microscopio óptico.

10.3.1. Test de complementación entre revertientes espontáneos

Se han realizado distintos cruzamientos entre los revertientes espontáneos, con el fin de aclarar si todos ellos afectan a la misma función génica o no. Asimismo, hemos analizado el comportamiento de estos revertientes frente a varias inserciones letales de la región. En todos los casos, el ensayo ha consistido en observar la aparición de moscas de alas normales, o bien con el marcador Cy. Dado que todas las cepas ensayadas son letales en homocigosis, y están equilibradas frente a CyO, sólo si los dos cromosomas portadores de las mutaciones afectan a funciones genéticas distintas podrán aparecer moscas de alas normales, indicando que ha habido complementación. Una de las inserciones utilizadas es la P-lacW(55/7), la cepa inicial

utilizada en la caracterización emprendida por el grupo de Marek Mlodzik (EMBL, Heidelberg) en esta región (ver apartado 1.1.2 de Material y Métodos). Los resultados de estos cruzamientos se resumen en la tabla 10-2.

	rev ²³⁷³	rev ²³³⁶	rev ²³³⁶	P-lacW(55/7)	P2336	P2373	P976
rev ²³⁷³		NO	NO	SI	SI	NO	SI
rev ²³³⁶	NO		NO	"SI"	NO		SI
rev ²³³⁶	NO	NO			NO		

TABLA 10-2: Resultado de los test de complementación entre revertientes, y de revertientes con distintas inserciones de la región 54A. En las celdas con la palabra NO el resultado del cruzamiento entre las cepas correspondientes fue que ninguna mosca de la F1 fue de alas normales y, por lo tanto, que no hubo complementación. En las celdas con un SI aparecieron moscas con alas normales y asumimos que hubo complementación entre los cromosomas portadores de las mutaciones. Un "SI" indica aparición de moscas de alas normales, pero en una proporción significativamente menor de la esperada. Una celda vacía es un cruzamiento del que no se dispone de datos o que no tiene sentido.

A la vista de estos resultados parece claro que los tres revertientes están afectando a la misma función génica pues en ningún caso hemos observado complementación entre ellos. Una hipótesis alternativa, la de que los cromosomas que han perdido la inserción portaran también otro alelo letal, común a los tres, que explicara la ausencia de complementación, no parece probable pues el rev²³⁷³ sí que complementa con los cromosomas P976 y P2336, y no con los revertientes derivados de la cepa P2336, que deberían portar el mismo letal, en caso de existir.

Un caso especial es el del rev²³³⁶ frente a la inserción P-lacW(55/7). En este cruce hemos observado la aparición de individuos de alas normales, pero con una frecuencia significativamente menor a la esperada. En concreto, de tres cruces individuales entre estas cepas el recuento total son 150 moscas de alas Cy frente a sólo 6 de alas normales. Este mismo resultado ha sido obtenido, independientemente, en Heidelberg por el grupo de Marek Mlodzik (Gerrit Begemann, com. pers.).

Nuestra hipótesis de trabajo para explicar este resultado es que ambas mutaciones podrían estar afectando a funciones génicas distintas, aunque estrechamente relacionadas, y que cuando ambas están afectadas reducen severamente la viabilidad del individuo.

10.3.2. Test de complementación entre revertientes de P976 y P-lacW(55/7)

Aunque el hecho de no recuperar moscas viables después de la movilización de la inserción P976 indica la existencia de un letal en este mismo cromosoma, esto no descarta que alguno de los revertientes generados sí haya provocado alguna mutación sobre el gen

adyacente. Un modo de probar este extremo es realizar un ensayo de complementación con un alelo del gen en cuestión, en nuestro caso la inserción letal P-lacW(55/7). Se espera de un revertiente que haya provocado una mutación importante en el mismo gen que el alelo que utilizamos, que no complemente con esa inserción y que, por tanto, no aparezcan moscas de alas normales (no *CyO*) o si aparecen, que presenten algún fenotipo.

Hemos realizado este ensayo para los revertientes 9.10; 9.21; 9.30; 9.3; 9.61; 9.52; 9.64 y 9.62 y en todos los casos los revertientes complementan la inserción P-lacW(55/7).

DISCUSIÓN

1. EL GEN PP2 ABARCA, PROBABLEMENTE, UNA REGIÓN GENÓMICA MAYOR QUE LA CLONADA

Aunque son muchos los aspectos de la caracterización molecular que hemos llevado a cabo de este gen que no están aclarados, en determinados aspectos es posible prever su desarrollo futuro.

En primer lugar, creemos que la unidad de transcripción debe ser bastante mayor de las aproximadamente 100 kb que separan el punto de la inserción inicial (PP2), y uno de los últimos exones (o el último) de *dc12* (ver la figura 6-2 de Resultados). Nos basamos para ello en tres evidencias indirectas:

1. Un fragmento *Pvu* II de 2,2 kb de *dc12* hibrida tan solo en un fragmento *Hind* III de 1,6 kb del cósmido 12E7 y en ningún otro clon genómico. Esto parece indicar que el extremo 3' de *dc12* no está ni siquiera incluido en el cósmido 12E7 (Gerrit Begemann, com. pers.). Una extensión posterior del paseo cromosómico permitirá localizar este fragmento de exón.
2. Hemos obtenido DNA adyacente a la inserción P2373 y, al utilizar este DNA como sonda frente a los clones genómicos presentados en este trabajo, no se detecta ninguna señal de hibridación, indicando que en los clones genómicos no se encuentra esa región. Esta inserción se ha localizado citológicamente en la banda 54C11-12 (ver la figura 2.1). Sin embargo, existen evidencias de que P2373 podría estar afectando a transcritos del gen PP2. Por un lado, un revertiente espontáneo de esta inserción no complementa con otros revertientes de inserciones localizadas dentro de la región clonada, (los revertientes *rev*¹⁺² 2336 y *rev*¹ 2336; ver tabla 10-2 de resultados). Este resultado indica que, en ambos casos, se ha visto afectada la misma función genética (un mismo transcrito). Por otro lado, el revertiente *rev*2373 indicado anteriormente, actúa como un potente supresor del fenotipo que se obtiene por la expresión ectópica del gen *seven-up* (Begemann y col. 1995; Begemann com. pers.). Este dato parece indicar que el *rev*2373 tiene una mutación en el mismo gen que estamos caracterizando, pues la inserción P-lacW(55/7), adyacente a PP2, también actúa como supresora en el mismo ensayo.
3. Por último, el fragmento *Hind* III de 2 kb marcado con el número 4 en la figura 5-1, detecta en un Northern Blot transcritos de 3, 4,6 y 7 kb mientras que los cDNAs más grandes que se han aislado de este gen son de 3 kb (λ cDm.D) y 3,8 kb (*dc12*). Este dato apunta a que la complejidad de la unidad de transcripción puede ser considerable, y a que los transcritos de mayor tamaño pueden incluso ocupar una región genómica mayor de la que hemos clonado en este trabajo. A este respecto es notable el paralelismo con el gen *dunce*, que se extiende en unas 148 kb de región genómica, y en el que se detectan mRNAs entre 4,2 y 9,6 kb (Qiu y

Davis, 1993). Se hace necesario, pues, continuar caracterizando nuevos clones de cDNA de la región, y aclarar si el gen se extiende en una región genómica mayor o no.

2. MAPA CITOGÉNÉTICO EN LAS INMEDIACIONES DE LA REGIÓN 54A

Hemos realizado una recopilación de toda la información genética y molecular en las inmediaciones de la posición citogenética 54A con objeto de conocer qué genes caracterizados a nivel molecular son los más próximos por cada lado, así como para conocer qué mutaciones se han localizado en esta zona, dado que alguna de ellas podría estar afectando al mismo gen que estamos caracterizando. Los datos se han obtenido de la base de datos para *Drosophila* "Flybase", actualizada para los datos de esta región con fecha 24 de febrero de 1995. En la figura 2-1 se resume esta información.

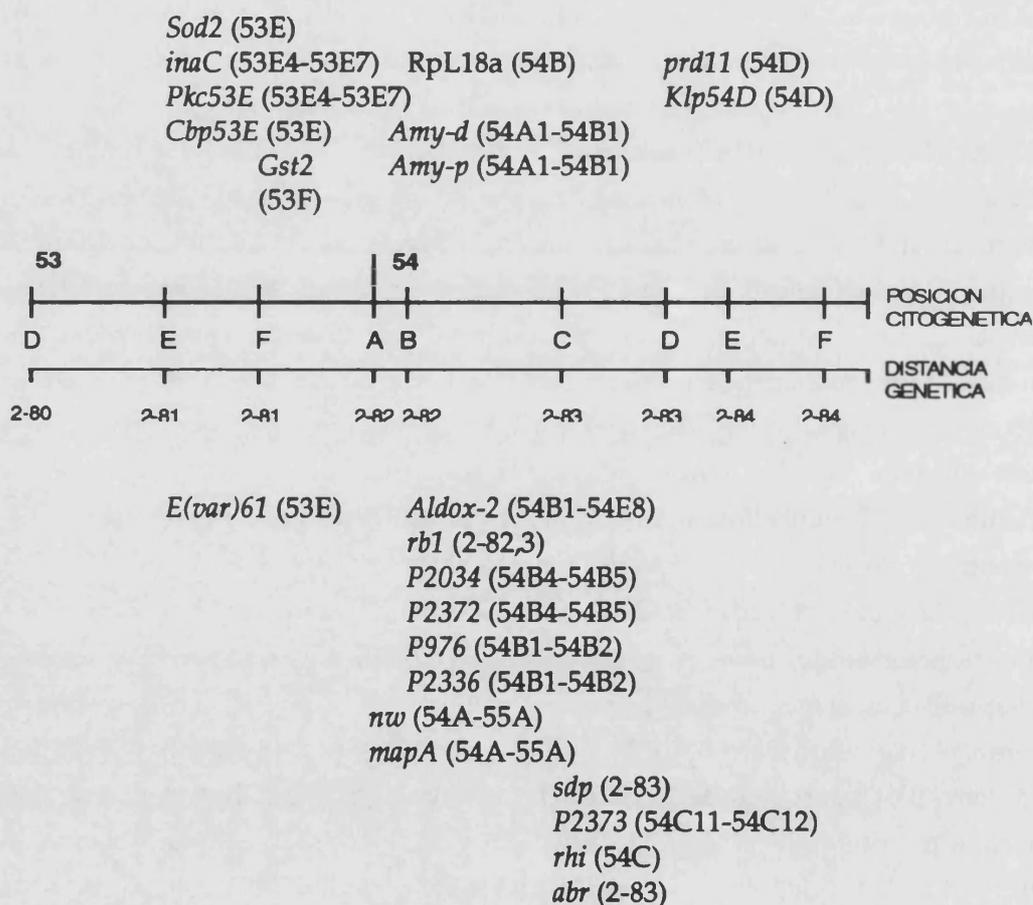


FIGURA 2.1. Recopilación de genes caracterizados molecularmente, y mutaciones localizadas en la región 54A o adyacentes. Se representan las posiciones citogenéticas (línea superior) y las distancias genéticas (línea inferior) desde la subsección 53D a la 54F. En la parte superior se han colocado los genes que han sido localizados en esta zona mediante hibridación *in situ* y de los que se ha clonado DNA genómico y/o cDNA. En la parte inferior están las mutaciones que, por un método u otro, se han

localizado en este intervalo. Entre paréntesis se muestra el dato de la posición citogenética o distancia genética. Se utilizan las siguientes abreviaciones: *Sod-2*, Superóxido dismutasa 2 (Mn); *inaC*, inactivation no afterpotential C; *Gst2*, glutatión S transferasa 2; *E(var)61*, enhancer de *w(m4h)*; *Pkc53E*, Proteína quinasa C en 53E; *Cbp53E*, Calbindin 32; *Aldox-2*, Aldehído oxidasa 2; *nw*, narrow; *mapA*, midgut amylase pattern AMG; *RpL18a*, Proteína ribosómica L18a; *rbl*, reduced bristles; *abr*, abero; *sdp*, sandpaper, *rhi*, rhino; *prd11*, paired-like11; *Klp54D*, kinesin-like protein at 54D; *Amy-d*, Amilasa distal, *Amy-p*, Amilasa proximal.

En primer lugar, tal como indicábamos en el apartado 2 de Resultados, el gen detectado en la cepa PP2 no es *Amy-d* ni *Amy-p*. Nuestro primer argumento es que su patrón de expresión no coincide con el de PP2 y, por otra parte, tampoco la estructura molecular del mismo. Dado el pequeño tamaño de los genes *Amy-d* y *Amy-p*, estos podrían localizarse fuera del gen que estamos caracterizando, o incluso dentro de alguno de sus intrones, como ocurre en otros casos en *Drosophila* (ver más abajo). En segundo lugar, el gen *RpL18a*, que codifica para la proteína ribosómica L18a, está localizada en 54B y podría también situarse dentro de alguno de los intrones del gen que hemos identificado. Una disposición de genes como esta no es nueva. Una situación semejante se da en el gen *dunce*, el más grande descrito en *Drosophila* hasta la actualidad, donde se han encontrado siete genes imbricados en dos grandes intrones del gen. Seis de ellos han sido estudiados con mayor detalle y parecen no tener nada que ver con la función de *dunce*, aparte de estar en la misma región genómica (Qiu y Davis, 1993).

Por otra parte, existen muchas mutaciones que, por el intervalo amplio en que se han localizado, y por la imprecisión de las técnicas utilizadas para su localización, podrían afectar al gen que estamos caracterizando. En esencia, se trata de inserciones de elementos P (P976, P2336, P2372 y P2373, las dos primeras localizadas en la región que hemos clonado según nuestros resultados) o mutaciones inducidas o espontáneas (*Aldox-2*, *mapA*, *rbl*, *nw*, *sdp*, *rhi* y *abr*). En este último grupo, las dos primeras son mutaciones que afectan bien a un gen estructural, *Aldox-2*, o a la regulación espacial y temporal del enzima α -amilasa (*mapA*), y no parecen tener nada que ver con el gen PP2, presuntamente implicado en un proceso de desarrollo. Los demás genes tienen fenotipos, aparentemente, sin relación con el gen de nuestro interés, y los resumimos a continuación:

nw: alas largas, estrechas y algo puntiagudas. Baja viabilidad y fertilidad en ambos sexos.

rbl: quetas dorsales reducidas, ambos sexos fértiles pero desarrollo retrasado 1,5 días.

abr: bandeado abdominal y márgenes del ala irregulares. Ojos "rough". Quetas y pelos dispersos y desorganizados.

sdp: letal en homocigosis. En clones produce células despigmentadas y con cambios en el patrón de tricomas de los terguitos.

rhi: polaridad dorso-ventral en el embrión alterada, así como la estructura de los apéndices de la cubierta del huevo, que sólo forman uno, en la línea media dorsal. Hembras

estériles. Se ha clasificado como una mutación implicada en la oogénesis de *Drosophila* (Spradling, 1993).

En el caso de la mutación *rhi*, tenemos un argumento adicional para pensar que, probablemente, no afecta al gen PP2. Como indicábamos en el apartado 1.1 de Resultados, un gen con efecto materno, como sería el caso de *rhi* pues se ha relacionado con la oogénesis, debería expresarse en las células foliculares durante la formación del embrión. Hemos comprobado específicamente esta posibilidad detectando la producción de β -galactosidasa en ovarios diseccionados de moscas PP2. En ningún caso se han observado trazas de expresión, por lo que, preliminarmente, pensamos que PP2 no tiene efecto materno, y la mutación *rhi* no parece afectar al gen PP2.

3. EL GEN PP2 PUEDE TENER VARIAS FUNCIONES DURANTE EL DESARROLLO DE *DROSOPHILA*

Existen muchos ejemplos de genes que participan en el desarrollo de un animal y que se expresan reiteradamente a lo largo de éste, ejerciendo funciones en unos casos completamente distintas, y en otros tan sólo aparentemente diferentes. En este sentido, y sin pretender citar todas las posibilidades descritas, hemos encontrado al menos tres tipos de genes de los que se sabe que son necesarios en distintos momentos en el desarrollo de *Drosophila*.

En primer lugar están los genes que participan en la toma de decisiones celulares en distintas condiciones y bajo diferentes señales. Un ejemplo de este tipo es el gen *Notch*, que codifica para una proteína transmembrana, implicada en comunicación intercelular y adhesión celular. De este gen se sabe, o se propone, que participa en el desarrollo del SNC y del SNP, en la formación del ojo compuesto, en la morfogénesis del intestino, de las glándulas salivares y los túbulos de Malpigio, en la oogénesis, en la formación del patrón de músculos somáticos, en el desarrollo del extremo posterior del embrión, en la formación del sistema de tráqueas y en el desarrollo del lóbulo óptico (varios autores en *The Development of Drosophila melanogaster*, Bate y Martínez Arias editores, 1993).

Por otro lado tenemos los genes con algún papel en las rutas centrales para la toma de decisiones celulares, por ejemplo, las rutas de transducción de señales desde la membrana plasmática al núcleo celular. Un ejemplo es el caso del gen *rolled*. Recientemente se ha descrito un mutante por ganancia de función de este gen, *rl^{sevenmaker}* (Brunner y col. 1994), en el cual se activan las rutas de transducción de señales de *sevenless*, de *torso* y del homólogo en *Drosophila* del receptor para el factor de crecimiento epidérmico. En este caso, el hecho de afectar a

procesos aparentemente no relacionados se debe a que la mutación interfiere un proceso fundamental, que se emplea reiteradamente en el desarrollo del animal.

Por último, puede verse afectado un proceso fundamental en la fisiología celular. Un ejemplo de este tipo lo constituye el gen *Drac1* (Luo y col. 1994; ver el apartado 3.4), el cual codifica para un GTPasa pequeña que probablemente está implicada en la regulación del citoesqueleto de actina. Esta participación podría explicar que sus mutantes tengan afectada la fusión de mioblastos durante la diferenciación muscular, así como el inicio y elongación de los axones.

Así pues, existen muchos ejemplos de genes que muestran pleiotropía durante el desarrollo de un animal. Por otra parte, una serie de observaciones apuntan a que el gen PP2 podría participar también, al menos, en dos procesos durante el desarrollo de *Drosophila*: para la determinación/especificación de la musculatura embrionaria, y para la determinación de los fotoreceptores del ojo compuesto. Estas observaciones, resumidamente, son las siguientes: (1) el gen PP2 se expresa en distintos tejidos a lo largo del desarrollo de *Drosophila*; (2) por el momento y lugar de su expresión embrionaria podría estar implicado en la diferenciación muscular; (3) existen evidencias genéticas de que participa en la determinación de los fotoreceptores del ojo y, finalmente, (4) existe un cierto parecido entre la expresión de PP2 y el gen *Drac1*, un gen que, como hemos visto, presenta una función dual, en la diferenciación de los mioblastos y en el inicio y elongación de los axones.

3.1. El gen PP2 se expresa reiteradamente durante el desarrollo de *Drosophila*

Como hemos visto en el apartado de Resultados, el patrón de expresión embrionario del gen PP2 es complejo y dinámico. A grandes rasgos, se expresa en el mesodermo, tanto visceral como somático, y en el SNC (ver la figura 7-1 de Resultados). En este último tejido, la expresión es notablemente complicada pues aparecen muchas células con señal y en posiciones difíciles de asignar, debido a la falta de marcadores morfológicos dentro del SNC y a la resolución limitada de las hibridaciones *in situ*. Para estas células no conocemos, por el momento, si expresan PP2 por la posición que ocupan dentro del SNC o si esta expresión es por linaje celular, es decir, la heredan de sus antecesoras. Por otro lado, en la cepa PP2 se detecta β -galactosidasa también en el disco imaginal de ojo-antena durante la formación de los omatidios, esto es, tras el paso del surco morfogenético, así como en el cerebro y ganglio ventral de larvas de tercer estadio (ver la figura 1-1 de Resultados).

Sin embargo, se ha demostrado en varias ocasiones que los patrones de expresión de los genes pueden ser leídos por otros genes tan sólo en un determinado momento del desarrollo y en parte, es decir, aunque un gen se exprese en lugares diversos, puede ser necesario tan solo en algún tejido, y su expresión en los demás ser superflua. Por lo tanto, un patrón de expresión complejo no significa, necesariamente, que un gen tenga una función en cada momento y en cada tejido en los que se detecta. Por ejemplo, el producto del gen *patched* sufre complejos cambios en su distribución embrionaria. Sin embargo, la expresión bajo un promotor de choque térmico de este gen, que da una expresión generalizada y uniforme, puede rescatar un mutante *patched* (Lawrence, 1992). Este resultado indica claramente que *patched* sólo se necesita en un lugar y en un momento en el desarrollo, sin que el resto de su patrón de expresión sea de la menor importancia. Otro ejemplo lo constituye la expresión materna del gen *hunchback*, la cual se ha demostrado que es completamente innecesaria (Lawrence, 1992).

No obstante, esta situación tampoco es la normal y, en general, los genes se expresan allí donde tienen alguna función. Así pues, asumiendo el hecho de que si un gen se expresa en un tejido, esto significa que tiene una función en él, no existe una relación obvia entre la especificación de fotoreceptores en el disco imaginal de ojo, la especificación/diferenciación de musculatura y una posible función en el SNC, las tres funciones que puede tener PP2 cuando se expresa en esos tejidos. Se espera, por tanto, que un mutante del gen presente una cierta pleiotropía, afectando a diversos procesos del desarrollo.

3.2. Posible implicación del gen detectado en la cepa PP2 en la miogénesis embrionaria

Hasta el momento, no se ha podido realizar un estudio detallado del fenotipo embrionario de ningún alelo del gen que estamos describiendo y, por lo tanto, su participación en algún proceso relacionado con la miogénesis, o con la especificación muscular, no es más que una hipótesis de trabajo. Nuestros datos sobre el patrón de expresión de este gen sugieren, sin embargo, que puede estar relacionado con alguno de los procesos mencionados anteriormente.

La diferenciación de los derivados mesodérmicos, y más claramente de la musculatura somática, puede entenderse, a grandes rasgos, como un proceso en dos etapas. En primer lugar, existen mecanismos genéticos concretos que determinan un destino celular muscular y especifican la posición de cada músculo, dando un patrón reproducible de musculatura (se trata, por ejemplo, de los genes *S59*, *ap* y *nau* así como los homeóticos *Ubx* y *abdA*). En segundo lugar, existen genes aparentemente implicados en la diferenciación terminal de los músculos una vez estos ya han sido determinados (por ejemplo los genes *MLP*, *D-MEF2* y *Drac1*).

Resulta difícil asignar el gen que hemos identificado en este trabajo a alguna de las dos categorías anteriores basándonos, tan sólo, en su patrón de expresión. Por una parte, su patrón de transcripción temprano sugiere que podría estar implicado en la especificación de algún músculo en particular, pues aparece en grupos de células mesodérmicas en el momento y en el lugar en el que está ocurriendo la especificación muscular (ver la figura 7-1). Sin embargo, el patrón tardío abarca, aparentemente, a toda la musculatura somática, siendo más congruente con una función, no en la especificación, sino en los aspectos propiamente de diferenciación muscular.

En apoyo a esta última interpretación está el hecho de que existe cierta semejanza entre los patrones de expresión de los genes *D-MEF2*, *MLP* (Arber y col. 1994; Lilly y col. 1995) y el gen *PP2*. Por ejemplo, la señal que se detecta en el estadio 13 es muy parecida, pues en los tres casos se marca el mesodermo somático y el visceral completamente. Además, la expresión de *PP2* es especialmente intensa durante la retracción de la banda germinal. Precisamente durante la retracción de la banda germinal, y especialmente a partir del estadio 13, es cuando tiene lugar la diferenciación muscular (Bate 1993a). Debe tenerse en cuenta, además, que aunque el gen que estamos describiendo inicia su transcripción antes de que se produzca la diferenciación terminal de la musculatura, su gran tamaño podría retrasar la aparición efectiva de un producto proteico activo hasta el momento en que fuera necesario para la diferenciación muscular (ver también el apartado 4). Por último, en estadios más tardíos, *D-MEF2*, *MLP* y *PP2* terminan expresándose en toda la musculatura somática, así como en otros tejidos específicos para cada gen.

Otra observación interesante es que el gen *Drac1* (Luo y col. 1994) comparte con el gen *PP2* su doble especificidad de tejido. Por una parte se expresa fuertemente en el sistema nervioso, pero también en el mesodermo embrionario. Para el gen *Drac1* se ha podido demostrar una función en la fusión de los mioblastos y en el inicio y extensión de los axones de las neuronas. *PP2* podría ejercer una función similar, o incluso participar junto con *Drac1* en estos procesos (ver también el apartado 3.4).

Por último, se ha propuesto que los dos genes de vertebrados (en concreto en el pez "zebrafish") homólogos a *seven-up* pueden participar en la diferenciación del mesodermo (Fjose y col. 1993). Teniendo en cuenta que se ha demostrado una interacción genética entre el gen *PP2* y gen *seven-up* en la determinación de los fotoreceptores de los omatidios (Gerrit Begemann, com. pers.; ver siguiente apartado) si *seven-up* también participara en la diferenciación del mesodermo de *Drosophila*, es probable que *PP2* estuviera implicado en el mismo proceso.

3.3. Función de PP2 en el desarrollo del ojo

Además de su posible función en la especificación/determinación de la musculatura larvaria, el gen PP2 está probablemente implicado en la especificación de los fotorreceptores de los omatidios. Estas conclusiones se basan en los datos de Gerrit Begemann (com. pers., EMBL, Heidelberg) y se trata de las siguientes evidencias.

En primer lugar, el gen PP2 se expresa en el disco imaginal de ojo-antena tras el paso del surco morfogenético, en el momento en el que se está produciendo la especificación de los fotorreceptores. Esta expresión se detecta tanto en la cepa de trampa de los enhancer como en la cepa estándar Oregon-R con una sonda genómica.

En segundo lugar, la cepa P-lacW(55/7) es un fuerte supresor del fenotipo que se produce en el ojo compuesto cuando se expresa el gen *seven-up* bajo el control de un enhancer de *sevenless*. Este enhancer lleva a expresar el gen *seven-up* en los precursores de las células cono, R3/R4 y R1/R6, y las células misterio. La expresión ectópica en las células cono provoca que estas se diferencien como fotorreceptores R7. La inserción P-lacW(55/7), localizada sólo 0,5 kb en 3' de la inserción PP2, es un supresor de este fenotipo por expresión ectópica, y ello apunta a que existe una interacción genética entre el gen PP2 y *seven-up*. Utilizando el mismo tipo de ensayo genético se ha podido demostrar que los componentes de la ruta de transducción de señales *ras* también interaccionan con *seven-up* (Begemann y col. 1995).

3.4. El patrón de expresión embrionario de PP2 presenta elementos en común con el patrón del gen *Drac1*

El gen *Drac1* es el homólogo en *Drosophila* de la proteína Rac, una GTPasa perteneciente a la superfamilia Ras de GTPasas monoméricas (Luo y col. 1994; Harden y col. 1995). Esta superfamilia está formada, además de por la subfamilia Ras, por otras dos: las proteínas Rac y Rho, implicadas en transmitir señales desde los receptores de la superficie celular hasta el citoesqueleto de actina (microfilamentos), y las proteínas Rab, implicadas en regular el tráfico intracelular de vesículas (Alberts y col. 1994). Actualmente se piensa que las GTPasas relacionadas con Ras e implicadas en la regulación del citoesqueleto (Rac y Rho principalmente), forman cascadas en las que una GTPasa regula a la siguiente, consiguiendo de este modo propiedades nuevas, como por ejemplo, que una de estas cascadas se utilice de modo distinto bajo distintas circunstancias (Chant y Stowers, 1995).

El patrón de expresión embrionario de *Drac1* presenta similitudes interesantes con el de IPP2. La primera señal de transcripción de *Drac1* se detecta en los estadios de blastodermis sincitial y celular y, tras la gastrulación, se expresa fuertemente en el mesodermo entre los estadios 10 y 12. En el estadio 13 inicia su expresión en el sistema nervioso y en el intestino. Posteriormente, la señal mesodérmica disminuye, y se mantiene la expresión en el sistema nervioso y en el intestino (Luo y col. 1994). Comparando con el gen que nos ocupa, en primer lugar, en ambos casos se detecta señal fuerte en el mesodermo en el estadio 12 y en el sistema nervioso a partir del estadio 13. En segundo lugar, esta expresión se produce precisamente cuando está ocurriendo la diferenciación neuronal (en el estadio 13 se inicia el proceso de axonogénesis en el sistema nervioso, Campos Ortega y Hartenstein, 1985) y muscular (estadio 11-13 y en adelante, Bate 1993a).

Se ha conseguido obtener información de la función de *Drac1* mediante la expresión de varias versiones mutantes de la proteína bien controladas con el sistema Gal4 (Brand y Perrimon, 1993) o bien bajo el control de un promotor inducible por choque térmico. Se llegan a las siguientes conclusiones en cada experimento:

Cuando se expresan versiones mutantes de la proteína bajo el control del factor Gal4, la conclusión es que el gen parece estar implicado en controlar el inicio y el crecimiento de los axones de las neuronas, y en controlar la fusión de los mioblastos (Luo y col. 1994). En concreto, cuando se expresa una proteína *Drac1* mutante en neuronas, en etapas tempranas durante la diferenciación del sistema nervioso (estadios 10/11), provoca problemas en el inicio y crecimiento de los axones en las neuronas periféricas, sin afectar a las dendritas. Sin embargo, cuando se expresan estas versiones mutantes de *Drac1* más tarde en el desarrollo, (estadio 13) no se detectan problemas en los axones, aunque se produce letalidad embrionaria. Este hecho indica que *Drac1* podría tener otras funciones, además de controlar el inicio y crecimiento de los axones. Por otra parte, cuando se expresa en los precursores musculares, provoca anomalías o ausencia total de fusión entre mioblastos. Este fenotipo nervioso y muscular se ha interpretado en el sentido de que *Drac1* podría participar en ejecutar los procesos morfogénicos después de que se hayan recibido e interpretado las señales para la diferenciación (Luo y col. 1994).

Mediante la expresión controlada por un promotor de choque térmico, las proteínas *Drac1* mutantes provocan en embrión una elevada frecuencia de problemas en el cierre dorsal, la retracción de la banda germinal y la involución de la cabeza. De nuevo, estos problemas se deben, probablemente, a la participación de *Drac1* en la regulación del citoesqueleto de actina (Harden y col. 1995).

El fenotipo de *Drac1* es bastante congruente con la función propuesta para este tipo de proteínas. En primer lugar, *Drac1* parece implicado en el establecimiento de la asimetría neuronal (iniciación y crecimiento de los axones), algo en lo que participa el citoesqueleto de actina. La subfamilia de GTPasas Rac se cree que tiene que ver con la interacción de las membranas con el citoesqueleto de actina. En segundo lugar, *Drac1* parece implicado en regular la fusión de mioblastos, y la adhesión celular celular es importante para esta fusión (Rosen y col. 1992), con lo cual existe una cierta relación entre ambos fenómenos (Luo y col. 1994). Por último, en los problemas relativos al cierre dorsal, se ha podido observar que no ocurre la acumulación de actina y miosina en las células epidérmicas más dorsales, que se cree dirigen el proceso de cambio en la forma de estas células epidérmicas, y que controlan el proceso del cierre dorsal (Harden y col. 1995).

Nuestra hipótesis de trabajo es que el gen PP2 puede compartir la lógica que subyace en el ejemplo de *Drac1*. Es decir, el gen *Drac1* participa en un proceso muy básico en la fisiología celular, como es controlar en citoesqueleto de actina, y esto explica una cierta pleiotropía (la mutación afecta a los músculos, a la diferenciación de las neuronas y a otros procesos donde el cambio de forma celular es importante). Un efecto semejante puede esperarse de PP2 ya que se expresa en el sistema nervioso y en la musculatura siguiendo un patrón semejante a *Drac1*, y reiteradamente durante el desarrollo.

Aunque existe una relación evidente entre el sistema nervioso y la musculatura a través de las neuronas motoras, no es evidente encontrar una función genética que sea necesaria, simultáneamente, en la diferenciación terminal de las neuronas y de los mioblastos. La opción más verosímil es esperar que PP2 comparta la lógica del gen *Drac1* o, incluso, que participe junto con *Drac1* en el mismo proceso.

4. SIGNIFICADO BIOLÓGICO DEL GRAN TAMAÑO DEL GEN PP2.

Uno de los aspectos más sorprendentes del análisis molecular realizado en el gen detectado en la cepa PP2 es su gran tamaño (ver la figura 6-2 de Resultados). No existen muchos ejemplos de genes con tamaños en torno a las 100 kb en el genoma de *Drosophila*. De hecho, hasta el momento, *dunce* es el gen descrito de mayor tamaño, extendiéndose en más de 148 kb de región genómica (Qiu y Davis, 1993) con al menos 7 genes imbricados en dos intrones del gen. Otros ejemplos notorios los constituyen los genes homeóticos, como *Antennapedia* (Bermingham y col. 1988), de unas 105 kb, y *Ultrabithorax* (Kornfeld y col, 1989) de unas 77 kb.

Unido al hecho del gran tamaño de estos genes está el que presenten intrones gigantes. En el caso de *Ultrabithorax (Ubx)* existe un intrón de unas 51 kb (Kornfeld y col. 1989), *dunce* presenta uno ligeramente mayor (55 kb; Qiu y Davis, 1993) y en *Antennapedia* uno de más de 55 kb (Bermingham y col. 1988). A este respecto, el gen que hemos detectado con la cepa PP2 establece una nueva marca al presentar un intrón de unas 85 kb para el cDNA dc12 (ver la figura 6-2 de Resultados). Esta observación contrasta con las estimas realizadas mediante datos de secuencia (Mount y col, 1992) que dan una longitud media para los intrones de *Drosophila* de tan sólo 79 nucleótidos. No obstante, este dato está algo desviado porque se obtiene a partir únicamente de intrones secuenciados en su totalidad.

El posible significado biológico de los tamaños exageradamente grandes de algunos genes, especialmente los implicados en procesos de desarrollo, no está aclarado en absoluto pero se han lanzado varias hipótesis interesantes. En primer lugar, se ha propuesto que este gran tamaño de algunos genes (por ejemplo los homeóticos) tendría que ver con su mecanismo de regulación. Dado que la RNA polimerasa requiere un tiempo considerable para transcribir el gen completo, esto permitiría desacoplar en el tiempo el momento en el que se reciben señales para la activación de la transcripción y el momento en el que se necesita en efecto ese producto génico. Este retraso se ha demostrado, por ejemplo, en el caso del gen homeótico *Ubx*, aunque la estima de este retraso es distinto según la técnica empleada. Es decir, *Ubx* recibe señales reguladoras de los genes de segmentación, que se expresan esencialmente en los estadios 4 (de 1:20 a 2:10 h) y 5 (de 2:10 a 2:50 h), mientras que la primera señal de proteína no se detecta hasta el estadio 9 temprano según Irvine y col. (1991), entre 3:40 y 4:20 horas después de la fertilización. Sin embargo, recientemente se han identificado varios genes diana de *Ubx*, entre ellos uno que se expresa ya en el estadio 6 (entre 2:50 y 3 horas tras la fertilización) y que demuestra la presencia de proteína *Ubx* funcional (Feinstein y col. 1995). En todo caso, el retraso entre la activación del gen y la presencia del producto final existe y, por tanto, introducir intrones enormes que demoren la transcripción podría ser un mecanismo para conseguir este retardo de aproximadamente 1 hora entre los momentos en que se reciben las primeras señales reguladoras y en que aparece la proteína funcional.

En segundo lugar, se ha demostrado que la entrada en mitosis de las células aborta los mensajeros en transcripción (Shermoen y O'Farrell, 1991), y este hecho podría ser usado para la regulación de determinados genes. Es decir, si la transcripción se ve afectada por la entrada en mitosis, este fenómeno impide que ningún gen mayor de un tamaño determinado produzca su proteína, aunque esté activado en su promotor, hasta que los ciclos celulares no alcancen una duración apropiada. Por ejemplo, los 13 primeros ciclos celulares de *Drosophila*, que son

extraordinariamente cortos (un ciclo cada 8 min, con un periodo de interfase de unos 3,5 min) deben restringir en gran medida el tamaño máximo de los genes que pueden transcribirse en ese tiempo. En este ejemplo se ha calculado en un tamaño máximo de 5 kb (Shermoen y O'Farrell, 1991).

En el caso del gen identificado en la cepa PP2 los tiempos requeridos para la transcripción de los transcritos grandes es realmente considerable (ver tabla 4-1). Los tiempos estimados para la transcripción se han calculado tomando como dato una tasa de polimerización de 1,4 kb/min que es la estima realizada para la velocidad a la que se transcribe el gen *Ubx in vivo* (Shermoen y O'Farrell, 1991). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que a estos tiempos hay que sumar lo que dure la maduración definitiva del mensajero, su transporte al citoplasma y la traducción de la proteína.

<i>λcDm.B</i>	<i>pcDm.B5</i>	<i>cDm.A2+D</i>	<i>dc12</i>
1,5 kb	1,8 kb	39 kb	≅ 100 kb
1,1min	1,3 min	28 min	70 min

TABLA 4-1. Tiempos estimados para la transcripción de cuatro de los cDNA caracterizados del gen identificado mediante la inserción PP2. En este caso hemos asumido que *pcDm.A2* y *λcDm.D* son cDNAs parciales de un mismo mensajero porque respectivamente terminan y empiezan en un exón presente en otro cDNA (*dc12*), pero no tenemos evidencias directas de que esto sea así (ver también la figura 8-2 de Resultados).

Como hemos comentado en el apartado 3.2 de esta Discusión, el gen detectado en la cepa PP2 podría participar en la diferenciación terminal de la musculatura en la larva. Sin embargo, al igual que en el caso de los genes homeóticos, surge el problema de que este gen inicia su transcripción en el estadio 11 tardío (unas 7 horas después de la puesta del huevo; ver la figura 5-1 de Resultados), mientras que la diferenciación terminal de la musculatura, donde podría participar, no empieza hasta el estadio 13 (9:20 a 10:20). Esto significa un desfase de al menos 2 horas entre los momentos en que el gen tiene regulada su transcripción y cuando realmente es necesario que participe en una decisión celular. Como hemos visto en la tabla anterior, este desfase se podría conseguir siguiendo una estrategia semejante a la de los genes homeóticos, es decir, mediante unidades de transcripción de gran tamaño. De hecho, asumiendo que los cDNAs embrionarios vayan a ser como *dc12*, que abarca unas 100 kb, esto ya significa 70 min de retraso sólo en la transcripción. Además, el extremo 3' de *dc12* no se ha determinado con exactitud y, en realidad, tenemos indicios de que la unidad de transcripción podría ser incluso más grande (ver el apartado 1).

Por último señalar que, aunque no conocemos con exactitud la función del gen PP2, el mero hecho de que presente una unidad de transcripción tan grande ya sugiere fuertemente que no se trata de un gen estructural, pues ningún gen de tamaño semejante en *Drosophila* lo es ((ver más arriba en este apartado).

5. SIGNIFICADO BIOLÓGICO DE LA PRESENCIA DE TRANSCRITOS NO CODIFICANTES

5.1. Existen ejemplos de genes complejos que transcriben RNAs no codificantes

Resulta difícil atribuir una función a un RNA maduro pero no codificante (como λ cDm.D). En principio, este RNA puede proceder de un corte y empalme alternativo que, por ejemplo, regula la presencia/ausencia de una proteína funcional (ver siguiente apartado). Por otro lado, puede no aparecer por corte y empalme alternativo, y entonces su función es oscura. El ejemplo más típico de transcritos maduros, pero de función desconocida, es *bithoraxoid* (Lipshitz y col. 1987; Duncan, 1987). En esta unidad de transcripción se han identificado dos tipos de transcritos poliadenilados, unos tempranos (expresados durante la embriogénesis) entre 1,1 y 1,3 kb y otros tardíos (durante tercer estadio larvario y adulto), de 0,8 kb de longitud. Sin embargo, los transcritos tempranos no presentan ninguna pauta de lectura con capacidad codificante y su función no está aclarada.

A este respecto, se han propuesto varias hipótesis en el caso de *bithoraxoid* (Lipshitz y col. 1987). En primer lugar que estos transcritos, aparentemente no codificantes, sí lo son, aunque con un uso de codones distintos al estándar, lo cual puede tener consecuencias en su regulación. En segundo lugar, que los transcritos no codificantes pueden interactuar de algún modo con los codificantes y regular bien su corte y empalme alternativo, su traducción, etc. Por último, que no tienen función y reflejan más bien un cambio en la estructura de la cromatina debido a la actividad de regiones reguladoras cercanas (Lipshitz y col.)

En todo caso, nótese que formalmente la situación en el caso de *bithoraxoid* y de PP2 es semejante: *bithoraxoid* se encuentra en 5' respecto de la unidad de transcripción de *Ubx* (ver figura 1 Duncan, 1987), mientras que en el caso de PP2, un cDNA codificante, dc12, presenta su/sus exon/es en 3' de la unidad de transcripción, y en 5' se han identificado hasta el momento 3 cDNAs no codificantes (λ cDm.B, pcDm.A2+ λ cDm.D y pcDm.B5, asumiendo que los cDNAs pcDm.A2 y λ cDm.D son clones parciales de un mismo mRNA).

5.2. Posible regulación de la maduración por corte y empalme alternativo en los cDNAs λ cDm.D y dc12

Aunque no tenemos evidencias directas de la existencia de corte y empalme alternativo en el gen que estamos describiendo, la estructura de dos de los cDNAs caracterizados sugiere fuertemente que, en efecto, puede darse este fenómeno. Se trata de λ cDm.D y dc12. Ambos cDNAs presentan la misma secuencia hasta el nucleótido 310 de λ cDm.D, donde divergen por emplear exones diferentes en cada caso a partir de este punto (ver la figura 8-1 de Resultados y 5-1 de Discusión). Sin embargo, ambos cDNAs proceden de momentos distintos del desarrollo del animal (un cDNA es embrionario y el otro de disco imaginal) y no existen evidencias, hasta el momento, de que procedan realmente de un corte y empalme regulado diferencialmente o con algún significado biológico.

En este caso es notable que la pauta de lectura identificada en dc12 se inicia tan solo unos pocos nucleótidos antes de la divergencia de los dos cDNAs (ver la figura 5-1 de Discusión y 8-1 de Resultados) dando una proteína de 317 aminoácidos. En cambio, en el clon λ cDm.D esta misma pauta de lectura termina mucho antes, a 254 nucleótidos del inicio, lo que significa una proteína claramente pequeña (84 aminoácidos). De todos modos, se han descrito proteínas de tamaños próximos, por ejemplo, la proteína MLP de *Drosophila* tan sólo presenta 92 aminoácidos y está implicada en la activación de los genes específicos para la diferenciación terminal de músculo (Arber y col. 1995).

No obstante, si asumimos que este cDNA no codifica para proteína alguna en la misma pauta que dc12, resulta tentador especular con la posibilidad de que este supuesto corte y empalme alternativo esté regulado espacial y/o temporalmente conduciendo, bien a la producción de una proteína activa (dc12), o bien un mensajero no codificante (λ cDm.D), con lo cual adquiriría sentido la presencia de este último cDNA no codificante.

Entre los ejemplos más estudiados donde el corte y empalme alternativo está regulado y presenta una función biológica importante figura la determinación del sexo en *Drosophila*.

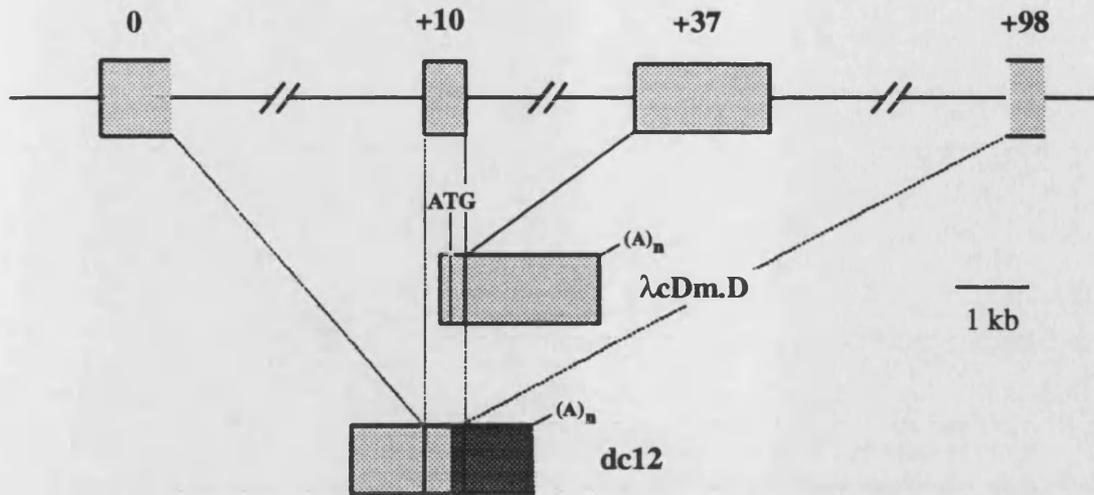


FIGURA 5-1. Representación, aproximadamente a escala, de los cuatro exones identificados en la región clonada, y su relación con dos de los cDNA caracterizados. Los números encima de cada exón son la coordenada (en kb) donde empieza éste, según las coordenadas con origen en la inserción original de la figura 6-2 de resultados. Se han dibujado como un rectángulo abierto aquellos exones donde existe alguna incertidumbre. Por ejemplo, para el exón 0 no hemos identificado las secuencias dadoras para el corte y empalme y en el exón 98 no sabemos si existen más exones a partir de este punto ni tampoco los lugares de inicio ni final de este exón. En gris más oscuro se representa la región codificante del cDNA dc12.

Esta determinación se lleva a cabo mediante una cascada de procesados alternativos de mensajeros (revisado en Maniatis, 1991). *Sex lethal*, uno de los primeros genes de la cascada, codifica para una proteína que regula el corte y empalme alternativo de sus propios pre-mRNAs y de *transformer*, el siguiente gen en la cascada. El corte y empalme alternativo en ambos casos implica la competencia entre dos sitios 3' por un único sitio 5'. Aparentemente, la proteína *Sex lethal* regula la elección del sitio 3' uniéndose específicamente al primero de los dos sitios aceptores. En los machos, donde no se produce proteína *Sex lethal*, se utiliza preferentemente el primer sitio aceptor. Esto conduce a la producción de un mRNA no codificante. En contraste, las hembras producen proteína *Sex lethal*, que se une al primer sitio aceptor y obliga al uso del segundo sitio y con ello a generar un mensajero codificante para proteína. Salvando todas las incertidumbres que todavía tenemos en nuestro caso, un mecanismo de regulación de este tipo sería posible en el gen detectado en la cepa PP2.

Del mismo modo, aún en el caso de que el cDNA λcDm.D realmente codificase para una proteína con inicio en el mismo codón ATG que dc12, un suceso de corte y empalme alternativo podría generar igualmente dos proteínas con propiedades distintas por la porción específica de cada una de ellas.

CONCLUSIONES

Del estudio realizado en la cepa de trampa de los enhancer PP2 podemos extraer las siguientes conclusiones principales.

1. Se ha descrito el patrón de expresión que confiere un enhancer genómico al gen informador ("reporter") *lacZ* en la cepa PP2. Esta expresión se concentra en el mesodermo y en el sistema nervioso en los estadios embrionarios, mientras que en larva de tercer estadio se marca el cerebro, el ganglio ventral y el disco imaginal de ojo-antena.
2. Hemos clonado, en colaboración con el grupo de Marek Mlodzik (EMBL, Heidelberg), toda la región genómica (o al menos gran parte) del gen detectado en la cepa de trampa de los enhancer PP2. Este trabajo ha supuesto la clonación de, aproximadamente, 120 kb de DNA genómico en clones lambda y en cósmidos, así como la construcción de un mapa de restricción integrado de todos ellos para cuatro enzimas de restricción, *Eco* RI, *Sal* I, *Bam* HI y *Hind* III. El punto cero de este mapa es la posición en la que se insertó el elemento P-lArB de la cepa PP2.
3. Se ha localizado y orientado la región clonada en el cromosoma politénico de *Drosophila* mediante hibridación *in situ* en cromosomas. El primer DNA genómico rescatado de la cepa PP2 se encuentra en la posición 54A, mientras que las sondas de la extensión realizada en la región clonada hibridan en posiciones más distales del cromosoma, es decir, en el sentido hacia el telómero.
4. Mediante hibridación *in situ* en embriones completos de *Drosophila* hemos identificado tres fragmentos de restricción en los clones genómicos que contienen exones. Se trata de los fragmentos *Hind* III de 2, 0,5 y 0,9 kb del clon λ Dm.TE1.
5. Mediante diversas aproximaciones, hemos purificado y caracterizado cuatro cDNAs embrionarios, λ cDm.D, λ cDm.B, pcDm.A2 y pcDm.B5. El análisis de sus secuencias revela que algunos no son codificantes, mientras que el λ cDm.D, inicia una proteína que termina a tan solo 84 aminoácidos del inicio. La hibridación posterior de los clones de cDNA frente a los clones de DNA genómico ha permitido localizar precisamente tres límites intrón-exón.
6. En un ensayo de Northern Blot, el fragmento *Hind* III de 2 kb de λ Dm.TE1 detecta tres bandas principales de aproximadamente 7, 4,6 y 3 kb. En un ensayo similar el cDNA

λ Cm.D detecta mensajeros de hasta 9 kb. Esto indica que nos hallamos ante una unidad de transcripción muy grande. Por último, ambas sondas muestran que el perfil temporal de expresión de los distintos transcritos varía en los estadios del desarrollo estudiados.

7. Hemos descrito el patrón de transcripción embrionario del gen identificado en la cepa PP2. Este patrón se inicia como 12 grupos de células mesodérmicas en el estadio 11, posteriormente afecta al mesodermo visceral y al somático y, finalmente, se detecta en toda la musculatura somática. También se detecta en el sistema nervioso central, a partir del estadio 13, en un patrón complejo. En base al momento de inicio de la transcripción y a su patrón de expresión, este gen podría estar implicado en la especificación/diferenciación de la musculatura embrionaria, así como en la diferenciación neuronal.
8. El estudio de nueve inserciones del elemento PZ en la región 54A y adyacentes ha llevado a la caracterización molecular y genética de tres de estas inserciones localizadas en la región genómica clonada. Hemos demostrado que la inserción P976 no es la causa de la letalidad en esa cepa y que la inserción P2336 no se puede movilizar mediante transposasa.

REFERENCIAS

- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. y WATSON, J.D. (1994). *Molecular Biology of the cell* (third edition). Garland Publishing, Inc.
- ANDERSON, K. V. (1989). *Drosophila: the maternal contribution*. En *Genes and embryos*. Editores D.M. Glover y B.D. Hames. IRL Press.
- ARBER, S., HALDER, G. y CARONI, P. (1994). Muscle LIM protein, a novel essential regulator of myogenesis, promotes myogenic differentiation. *Cell* 79: 221-231.
- ARTERO, R.D., AKAM, M. y PEREZ-ALONSO, M. (1992). Oligonucleotide probes detect splicing variants *in situ* in *Drosophila* embryos. *Nucleic Acids Research* 20: 5687-5690.
- ASHBURNER, M. (1989). *Drosophila. A Laboratory Handbook*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- ATHERTON, D. y GALL, J. (1972). Salivary gland squashes for *in situ* nucleic acids hybridization studies. *DIS* 49: 131-133.
- AUSUBEL, F.M., BRENT, R., KINGSTON, R.E., MOORE, D.D., SEIDMAN, J.G., SMITH, J.A. y STRUHL, K. (1988). *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley-Interscience.
- AZPIAZU, N. y FRASCH, M. (1993). *tinman* and *bagpipe*: two homeobox genes that determine cell fates in the dorsal mesoderm of *Drosophila*. *Genes and Development* 7: 1325-1340.
- BATE, M. (1990). The embryonic development of larval muscles in *Drosophila*. *Development* 110: 791-804.
- BATE, M. (1993a). The mesoderm and its derivatives. En *The Development of Drosophila melanogaster*. M. Bate y A. Martínez-Arias editores. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- BATE, M., RUSHTON, E. y FRASCH, M. (1993b). A dual requirement for neurogenic genes in *Drosophila* myogenesis. *Development Supplement* 149-161.
- BATE, M., RUSHTON, E. y CURRIE, D. A. (1991). Cells with persistent *twist* expression are the embryonic precursors of adult muscles in *Drosophila*. *Development* 113: 79-89.
- BEIER, J., TECHNAU, G. y CAMPOS-ORTEGA, J. (1987). Lineage analysis of transplanted individual cell in embryos of *Drosophila melanogaster*. IV. Commitment and proliferative capabilities of individual mesodermal cells. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 196: 222-230.
- BEGEMANN, G., MICHON, A.M., VOORN, L. WEPF, R. y MLODZIK, M. (1995). The *Drosophila* orphan nuclear receptor Seven-up requires the Ras pathway for its function in photoreceptor determination. *Development* 121: 225-235.
- BELLEN, H.J., O'KANE, C.J., WILSON, C., GROSSNIKLAUS, U., PEARSON, R.K. y GEHRING, W.J. (1989). P-element-mediated enhancer detection: a versatile method to study development in *Drosophila*. *Genes and Development* 3: 1288-1300.
- BERMINGHAM, J.R. y SCOTT, M.P. (1988). Developmentally regulated alternative splicing of transcripts from the *Drosophila* homeotic gene *Antennapedia* can produce four different proteins. *EMBO J.* 7: 3211-3222.
- BIENZ, M., SAARI, G., TREMML, G., MÜLLER, J., ZÜST, B. y LAWRENCE, P.A. (1988). Differential regulation of *Ultrabithorax* in two germ layers of *Drosophila*. *Cell* 53: 567-576.
- BLAIR, S.S., BROWER, D.L., THOMAS, J.B. y ZAVORTINK, M. (1994). The role of *apterous* in the control of dorsoventral compartmentalization and PS integrin gene expression in the developing wing of *Drosophila*. *Development* 120: 1805-1815.
- BOCK, E. (1939). Bildung und Differenzierung der Keimblätter bei *Chrysopa perla*. *Z. Morphol. Okol. Tiere.* 35: 615-702
- BOCK, E. (1941). Wechselbeziehungen zwischen den Keimblättern bei der Organbildung von *Chrysopa perla* L. Die Entwicklung des Ektoderms in mesodermdefekten Keimteilen. *Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org.* 141: 159-247.
- BOIDMER, R. (1993). The gene *tinman* is required for specification of the heart and visceral muscles in *Drosophila*. *Development* 118: 719-729.
- BOEHRINGER MANNHEIM GmbH, BIOCHEMICA (1993). *The DIG system user's guide for filter hybridization*.
- BOUR, B.A., O'BRIEN, M.A., LOCKWOOD, W.L., GOLDSTEIN, E.S., BODMER, R., TAGHERT, P.H., ABMAYR, S.M. y NGUYEN, H.T. (1995). *Drosophila* MEF2, a transcription factor that is essential for myogenesis. *Genes and Development* 9: 730-741.
- BOURGOUIN, C., LUNDGREN, S. E. y THOMAS, J. B. (1992). *apterous* is a *Drosophila* LIM domain gene required for the development of a subset of embryonic muscles. *Neuron* 9: 549-561.

- BRAND, A. H. y PERRIMON, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118: 401-415.
- BROADIE, K. S. y BATE, M. (1991). Development of adult muscles in *Drosophila*: Ablation of identified muscle precursor cells. *Development* 113: 103-118.
- BROADIE, K. y BATE, M. (1993). Muscle development is independent of innervation during *Drosophila* embryogenesis. *Development* 119: 533-543.
- BROWN, N.H. y KAFATOS, F.C. (1988). Functional cDNA libraries from *Drosophila* embryos. *J. Mol. Biol.* 203: 425-437.
- BROWN, T.A. (1991). *Molecular Biology. Lab Fax Series.* Bios Scientific Publishers Limited.
- BRUNNER, D., OELLERS, N., SZABAD, J., BIGGS III, W.H., ZIPURSKY, S.L. y HAFEN, E. (1994). A gain-of-function mutation in *Drosophila* MAP kinase activates multiple receptor tyrosine kinase signaling pathways. *Cell* 76: 875-888.
- BUCKINGHAM, M. (1994). Molecular biology of muscle development. *Cell* 78: 15-21.
- CAMPOS-ORTEGA, J. A. y HARTENSTEIN, V. (1985). The embryonic development of *Drosophila melanogaster*. Springer-Verlag, Berlin. a
- CAMPUZANO, S. y MODOLELL, J. (1992). Patterning of the *Drosophila* nervous system: the *achaete-scute* gene complex. *Trends in Genetics* 8: 202-207.
- CHANT, J. y STOWERS, L. (1995). GTPase cascades choreographing cellular behavior: movement, morphogenesis, and more. *Cell* 81: 1-4.
- COHEN, B., MCGUFFIN, M. E., PFEIFLE, C., SEGAL, D. y COHEN, S. M. (1992). *apterous*, a gene required for imaginal disc development in *Drosophila* encodes a member of the LIM family of developmental regulatory proteins. *Genes and Development* 6: 715-729.
- CORBIN, V., MICHELSON, A. M., ABMAYR, S. M., NEEL, V. ALCAMO, E., MANIATIS, T. y YOUNG M. W. (1991). A role for the *Drosophila* neurogenic genes in mesoderm differentiation. *Cell* 67: 311-323.
- COSTA, M., SWEETON, D. y WIESCHAUS, E. (1993). Gastrulation in *Drosophila*: cellular mechanisms of morphogenetic movements. En *The development of Drosophila melanogaster*. M. Bate y A. Martínez-Arias editores. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- COSTA, M., WILSON, E. T. y WIESCHAUS, E. (1994). A putative cell signal encoded by the folded gastrulation gene coordinates cell shape changes during *Drosophila* gastrulation. *Cell* 76: 1075-1089.
- CROSS, D. P. y SANG, J. H. (1978). Cell culture of individual *Drosophila* embryos. II. Culture of X-linked embryonic lethals. *J. Embryol. Exp. Morph.* 45: 173-187.
- CROSSLEY, A. C. (1978). The morphology and development of the *Drosophila* muscular system. En *The genetics and biology of Drosophila*, vol 2b. M. Ashburner y T. Wright editores. Academic Press.
- CHASAN, R. y ANDERSON, K. V. (1993). Maternal control of dorsal-ventral polarity and pattern in the embryo. En *The development of Drosophila melanogaster*. M. Bate y A. Martínez-Arias editores. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- DE FRUTOS, R., KIMURA K., PETERSON, K. (1990). In situ hybridisation of *Drosophila* polytene chromosomes with digoxigenin-dUTP labelled probes. *Methods Mol Cell Biol* 2: 32-36.
- DICKSON, B. y HAFEN, E. (1993). Genetic dissection of eye development in *Drosophila*. En *The Development of Drosophila melanogaster*. M. Bate y A. Martínez-Arias editores. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- DICKSON, B. y HAFEN, E. (1994). Genetics of signal transduction in invertebrates. *Current opinion in Genetics and Development* 4: 64-70.
- DOHRMANN, C., AZPIAZU, N. y FRASCH, M. (1990). A new *Drosophila* homeobox gene is expressed in mesodermal precursor cells of distinct muscles during embryogenesis. *Genes and Development* 4: 2098-2111.
- DRIEVER, W. (1993). Maternal control of anterior development in the *Drosophila* embryo. En *The Development of Drosophila melanogaster*. M. Bate y A. Martínez-Arias editores. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- DRIEVER, W. y NÜSSLEIN-VOLHARD, C. (1988a). A gradient of *bicoid* protein In *Drosophila* embryos. *Cell* 54: 83-93.
- DRIEVER, W. y NÜSSLEIN-VOLHARD, C. (1988b). The *bicoid* protein determines position in the *Drosophila* embryo in a concentration-dependent manner. *Cell* 54: 95-104.

- DRYSDALE, R. RUSHTON, E. y BATE, M. (1993). Genes required for embryonic muscle development in *Drosophila melanogaster*. A survey of the X chromosome. *Roux's Arch Dev Biol* 202: 276-295.
- DUNCAN, I. (1987). The bithorax complex. *Ann. Rev. Genet.* 21: 285-319.
- FASANO, L., RÖDER, L., CORÉ, N., ALEXANDRE, E., VOLA, C., JACQ, B. y KERRIDGE, S. (1991). The gene *teashirt* is required for the development of *Drosophila* embryonic trunk segments and encodes a protein with widely spaced zinc finger motifs. *Cell* 64: 63-79.
- FEINBERG, A. y VOLGESTEIN, B. (1983). A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132: 6-13.
- FEINSTEIN, P.G., KORNFELD, K., HOGNESS, D.S. y MANN, R.S. (1995). Identification of homeotic target genes in *Drosophila melanogaster* including *nervy*, a proto-oncogene homologue. *Genetics* 140: 573-586.
- FICKETT, J. (1982). *Nucl. Acids Res.* 10: 5303-5318.
- FJOSE, A., NORNES, S., WEBER, U. y MLODZIK, M. (1993). Functional conservation of vertebrate *seven-up* related genes in neurogenesis and eye development. *EMBO J.* 12: 1403-1414.
- FORTINI, M. E., LAI, Z. y RUBIN, G. M. (1991). *Mech. Dev.* 34: 113-122.
- FRASCH, M. (1995). Induction of visceral and cardiac mesoderm by ectodermal Dpp in the early *Drosophila* embryo. *Nature* 374: 464-467.
- FRASCH, M., HOEY, T., RUSHLOW, C., DOYLE, H. y LEVINE, M. (1987). Characterization and localization of the *even-skipped* protein of *Drosophila*. *EMBO J.* 6: 749-759.
- FREEMAN, M. (1994). The spitz gene is required for photoreceptor determination in the *Drosophila* eye where it interacts with the EGF receptor. *Mech. Development.*
- GAUL, U., SEIFERT, E., SCHUH, R. y JÄCKLE, H. (1987). Analysis of *Krüppel* protein distribution during early *Drosophila* development reveals posttranscriptional regulation. *Cell* 50: 639-647.
- GEMMILL, R.M., LEVY, J.N. y DOANE, W.W. (1985). Molecular cloning of α -amylase genes from *Drosophila melanogaster*. 1. Clone isolation by use of a mouse probe.
- GHYSEN, A. y O'KANE, C. (1989). Neural enhancer-like elements as specific cell markers in *Drosophila*. *Development* 105: 35-52.
- GREIG, S. y AKAM, M. E. (1993). Homeotic genes autonomously specify one aspect of pattern in the *Drosophila* mesoderm. *Nature* 362: 630-632.
- GURDON, J. B. (1992). The generation of diversity and pattern in animal development. *Cell* 68: 185-199.
- GUTJAHR, T., PATEL, N. H., LI, X., GOODMAN, C. S. y NOLL, M. (1993). Analysis of the *gooseberry* locus in *Drosophila* embryos: *gooseberry* determines the cuticular pattern and activates *gooseberry neuro*. *Development* 118: 21-31.
- HAGET, A. (1953). Analyse expérimentale des facteurs de la morphogenese embryonnaire chez le Coleoptere *Leptinotarsa*. *Bull. Biol. Fr. Belg.* 87: 123-217.
- HARDEN, N., LOH, H.Y., CHIA, W. y LIM, L. (1995). A dominant inhibitory version of the small GTP-binding protein Rac disrupts cytoskeletal structures and inhibits developmental cell shape changes in *Drosophila*. *Development* 121: 903-914.
- HARRISON, D. A. y PERRIMON, N. (1993). Simple and efficient generation of marked clones in *Drosophila*. *Current Biology* 3: 424-433.
- HARTENSTEIN, V. y JAN, Y. N. (1992). Studying *Drosophila* embryogenesis with P-lacZ enhancer trap lines. *Roux's Arch Dev Biol* 201: 194-220.
- HARTENSTEIN, V., TECHNAU, G. M. y CAMPOS-ORTEGA, J. A. (1985). Fate-mapping in wild type *Drosophila melanogaster*. III. A fate map of the blastoderm. *Wilhelm Roux's Arch. Dev. Biol.* 194: 213-216.
- HOHEISEL, J.D., LENNON, G.G., ZEHETNER, G. y LEHRACH, H. (1991). Use of high coverage reference libraries of *Drosophila melanogaster* for relational data analysis. A step towards mapping and sequencing of the genome. *J. Mol. Biol.* 220: 903-914.
- HOOVER, J. (1986). Homeotic gene expression in the muscles of *Drosophila* larvae. *EMBO J.* 5: 2321-2329.
- HOOVER, J. y SCOTT, M. P. (1989). The *Drosophila patched* gene encodes a putative membrane protein required for segmental patterning. *Cell* 59: 751-765.
- HOOVER, J. y SCOTT, M. P. (1992). The molecular genetic basis of positional information in insect segments. Results and problems in cell differentiation 18. Editor W. Hennig. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

- HOSHIZAKI, D.K., BLACKBURN, T., PRICE, C., GHOSH, M., MILES, K., RAGUCCI, M. y SWEIS, R. (1994). Embryonic fat-cell lineage in *Drosophila melanogaster*. *Development* 120: 2489-2499.
- HOU, X.S., CHOU, T.B., MELNICK, M.B. y PERRIMON, N. (1995). The torso receptor tyrosine kinase can activate raf in a ras-independent pathway. *Cell* 81: 63-71.
- IP, Y.T., MAGGERT, K. y LEVINE, M. (1994). Uncoupling gastrulation and mesoderm differentiation in the *Drosophila* embryo. *EMBO J.* 13: 5826-5834.
- IRVINE, K.D., HELFAND, S.L. y HOGNESS, D.S. (1991). The large upstream control region of the *Drosophila* homeotic gene *Ultrabithorax*. *Development* 111: 407-424.
- JELLIES, J. (1990). *Trends Neurosci.* 13: 126-131.
- JESSELL, T. M. y MELTON, D. A. (1992). Diffusible factors in vertebrate embryonic induction. *Cell* 68: 257-270.
- JOHANSEN, J., HALPERN, M. y KESHISHIAN, H. (1989). Axonal guidance and development of muscle fiber-specific innervation in *Drosophila* embryos. *J. Neurosci.* 9: 4318-4332.
- JOHNSTON, D. (1993). Pole plasm and the posterior group genes. En *The development of Drosophila melanogaster*. M. Bate y A. Martínez-Arias editores. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- JUNAKOVIC, N., CANEVA, R. y BALLARIO, P. (1984). Genomic distribution of *copia*-like elements in laboratory stocks of *D. melanogaster*. *Chromosoma* 90: 378-382.
- KANIA, M.A., BONNER, A.S., DUFFY, J.B. y GERGEN, J.P. (1990). The *Drosophila* segmentation gene *runt* encodes a novel nuclear regulatory protein that is also required in the development of the nervous system. *Genes and Development.* 4: 1701-1713.
- KAISER, K. y MURRAY, N.E. (1985). The use of phage λ replacement vectors in the construction of representative genomic libraries. *DNA Cloning: a practical approach* 1, 1-47, Ed. D.M. Glover, IRL Press.
- KIDWELL, M.G. (1986). P-M mutagenesis. In *Drosophila. A practical approach*. Editor D.B. Roberts. Páginas 59-81. IRL Press, Oxford.
- KOPAN, R., NYE, J.S. y WEINTRAUB, H. (1994). The intracellular domain of mouse Notch: a constitutively activated repressor of myogenesis directed at the basic helix-loop-helix region of MyoD. *Development* 120: 2385-2396.
- KRAMER, S., WEST, S.R. y HIROMI, Y. (1995). Cell fate control in the *Drosophila* retina by the orphan receptor *seven-up*: its role in the decisions mediated by the ras signaling pathway. *Development* 121: 1361-1372.
- KUROIWA, A., HAFEN, E. y GEHRING, W.J. (1985). Cloning and transcriptional analysis of the segmentation gene *fushi tarazu* of *Drosophila*. *Cell* 37: 25.
- KLEIN, P. S. y MELTON, D. A. (1994). Induction of mesoderm in *Xenopus laevis* embryos by translation initiation factor 4E. *Science* 265: 803-806.
- KORNFELD, K., SAINT, R.B., BEACHY, P.A., HARTE, P.J., PEATTIE, D.A. y HOGNESS, D.S.: (1989). Structure and expression of a family of *Ultrabithorax* mRNAs generated by alternative splicing and polyadenylation in *Drosophila*. *Genes and Development* 3: 243-258.
- LAI, Z., RUSHTON, M., BATE, M. y RUBIN, G.M. (1993). Loss of function of the *Drosophila* *zfh-1* gene results in abnormal development of mesodermal derived tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 4122-4126.
- LATCHMAN, D.S. (1991). *Eukaryotic transcription factors*. Academic Press
- LAWRENCE, P.A. (1982). Cell lineage of the thoracic muscles of *Drosophila*. *Cell* 29: 493-503.
- LAWRENCE, P.A., (1992). *The making of a fly*. Blackwell Scientific Publications.
- LAWRENCE, P.A. y JOHNSTON, P. (1984). On the role of the *engrailed*⁺ gene in the internal organs of *Drosophila*. *EMBO J.* 3: 2839-2844.
- LAWRENCE, P.A. y JOHNSTON, P. (1986). The muscle pattern of a segment of *Drosophila* may be determined by neurons and not by contributing myoblasts. *Cell* 45: 505-513.
- LAWRENCE, P.A., JOHNSTON, P., MORATA, G. (1986). Methods of marking cells. En *Drosophila: a practical approach*. Editor, Roberts D.B. Oxford/Washington DC: IRL Press 229-242.
- LAWRENCE, P.A., JOHNSTON, P. y VINCENT, J.P. (1994). Wingless can bring about a mesoderm-to-ectoderm induction in *Drosophila* embryos. *Development* 120: 3355-3359.
- LEPTIN, M. (1991). *twist* and *snail* as positive and negative regulators during *Drosophila* mesoderm development. *Genes and Development* 5: 1568-1576.
- LEVINE, M.S. y HARDING, K.W. (1989). *Drosophila: the zygotic contribution*. En *Genes and Embryos*. D. M. Glover y B. D. Hames editores. IRL Press.

- LINDSLEY, D.L. y ZIMM, G.G. (1992). The genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press.
- LILLY, B., GALEWSKY, S., FIRULLI, A.B., SCHULZ, R.A. y OLSON, E.N. (1994). D-MEF2: A MADS box transcription factor expressed in differentiating mesoderm and muscle cell lineages during *Drosophila* embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 5662-5666.
- LILLY, B., ZHAO, B., RANGANAYAKULU, G., PATERSON, B.M., SCHULZ, R.A. y OLSON, E.N. (1995). Requirement of MADS domain transcription factor D-MEF2 for muscle formation in *Drosophila*. *Science* 267: 688-693.
- LIPSHITZ, H.D., PEATTIE, D.A. y HOGNESS, D.S. (1987). Novel transcripts from the *Ultrabithorax* domain of the bithorax complex. *Genes and Development* 1: 307-322.
- LUO, L., LIAO, Y.J., JAN, L.Y. y JAN, Y.N. (1994). Distinct morphogenetic functions of similar small GTPases: *Drosophila Drac1* is involved in axonal outgrowth and myoblast fusion. *Genes and Development* 8: 1787-1802.
- MANIATIS, T. (1991). Mechanisms of alternative pre-mRNA splicing. *Science* 252: 33-34
- MARTÍNEZ-ARIAS, A. (1993). Development and patterning of the larval epidermis of *Drosophila*. En The development of *Drosophila melanogaster*. M. Bate y A. Martínez-Arias editores. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- MCGINNIS, W., LEVINE, M.S., HAFEN, E., KUROIWA, A. y GEHRING, W.J. (1984). A conserved DNA sequence in homeotic genes of *Drosophila Antennapedia*, and bithorax complexes. *Nature* 308: 428
- MICHELSON, A.M. (1994). Muscle pattern diversification in *Drosophila* is determined by the autonomous function of homeotic genes in the embryonic mesoderm. *Development* 120: 755-768.
- MICHELSON, A., ABMAYR, S., BATE, M., MARTÍNEZ-ARIAS, A. y MANIATIS, T. (1990). Expression of a *MyoD* family member prefigures muscle pattern in *Drosophila* embryos. *Genes and Development* 4: 2086-2097.
- MLODZIK, M. y HIROMI, Y. (1992). Enhancer trap method in *Drosophila*. Its application to neurobiology. *Methods in Neurosciences* 9: 397-414.
- MLODZIK, M., HIROMI, Y., WEBER, U., GOODMAN, C.S. y RUBIN, G.M. (1990). The *Drosophila seven-up* gene, a member of the steroid receptor gene superfamily, controls photoreceptor cell fates. *Cell* 60: 211-224.
- MOSES, K. (1991). The role of transcription factors in the developing *Drosophila* eye. *Trends in Genetics* 7: 250-255.
- MOUNT, S.M., BURKS, C., HERTZ, G., STORMO, G.D., WHITE, O. y FIELDS, C. (1992). Splicing signals in *Drosophila*: intron size, information content, and consensus sequences. *Nucleic Acids Research* 20: 4255-4262.
- MURUGASU-OEI, B., RODRIGUES, V., YANG, X. y CHIA, W. (1995). Masquerade: a novel secreted serine protease-like molecule is required for somatic muscle attachment in the *Drosophila* embryo. *Genes and Development* 9: 139-154.
- NIEHRS, C., STEINBEISSER, H. y DE ROBERTIS, E.M. (1994). Mesodermal patterning by a gradient of the vertebrate homeobox gene *gooseoid*. *Science* 263: 817-820.
- NISHIMURA, A., MORITA, M., NISHIMURA, Y. y SUGINO, Y. (1990). A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acids Research* 18: 20.
- NÜESCH, H. (1985). Control of muscle development. En Comparative insect physiology, biochemistry and pharmacology. G.A. Kerkut y L.I. Gilbert editores. Pergamon.
- NÜSSLEIN-VOLHARD, C. y WIESCHAUS, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287: 795.
- O'KANE, C. J. y GEHRING, W. J. (1987). Detection *in situ* of genomic regulatory elements in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 9123-9127.
- PANKRATZ, M. y JÄCKLE, H. (1993). Blastoderm segmentation. En The development of *Drosophila melanogaster*. M. Bate y A. Martínez-Arias editores. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- PARICIO, N. (1993). Caracterización molecular del elemento transponible P de *D.subobscura*. Tesis Doctoral, Universidad de Valencia.
- PATERSON, B. M., WALLDORF, U., ELDRIDGE, J., DUBENDORFER, A., FRASCH, M. y GEHRING, W. (1991). The *Drosophila* homologue of vertebrate myogenic determination genes encodes a transiently expressed nuclear protein marking primary myogenic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 3782-3786.

- PEREZ ALONSO, M. (1989). Aislamiento y caracterización molecular del gen *Antennapedia* de *D.subobscura*. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia.
- PERRIMON, N. (1994). The genetic basis of patterned baldness in *Drosophila*. *Cell* 76: 781-784.
- POOLE, S.J., KAUVAR, L.M., DREES, B. y KORNBERG, T. (1985) The *engrailed* locus of *Drosophila*: structural analysis of an embryonic transcript. *Cell* 40: 37.
- QIU, Y. y DAVIS, R.L. (1993). Genetic dissection of the learning/memory gene *dunce* of *Drosophila melanogaster*. *Genes and Development* 7: 1447-1458.
- RAFF, R. A., KAUFMAN, T. C. (1983). Embryos, genes, and evolution. Macmillan Publishing Co.
- RING, J.M. y MARTÍNEZ ARIAS, A. (1993). *puckered*, a gene involved in position-specific cell differentiation in the dorsal epidermis of the *Drosophila* larva. *Development* 1993 Suplemento, 251-259.
- ROBERTSON, H.M., PRESTON, C.R., PHILLIS, R.W., JOHNSON-SCHLITZ, D.M., BENZ, W.K. y ENGELS, W.R. (1988). A stable genomic source of P element transposase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 118: 461-470.
- ROSEN, G.D., SANES, J.R., LACHANCE, R., CUNNINGHAM, J.M., ROMAN, J. y DEAN, D.C. (1992). Roles for the integrin VLA-4 and its counter receptor VCAM-1 in myogenesis. *Cell* 69: 1107-1119.
- RUBERTE, E., MARTY, T., NELLEN, D., AFFOLTER, M. y BASIER, K. (1995). An absolute requirement for both the type II and type I receptors, Punt and Thick Veins, for Dpp signaling in vivo. *Cell* 80: 889-897.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. y MANIATIS, T. (1989). Molecular Cloning: A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press. New York.
- SANGER, F., NICKLEN, S. y COULSON, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- SHERMOEN, A.W. y O'FARREL, P.H. (1991). Progression of the cell cycle through mitosis leads to abortion of nascent transcripts. *Cell* 67: 303-310.
- SIMON, M.A., BOWTELL, D.D.L., DODSON, G.S., LAVERTY, T.R. y RUBIN, G.M. (1991). RasI and a putative guanine nucleotide exchange factor perform crucial steps in the signaling by the sevenless protein tyrosine kinase. *Cell* 67: 701-716.
- SPRADLING, A.C. (1993). Developmental genetics of oogenesis. En *The development of Drosophila melanogaster*. M. Bate y A. Martínez-Arias editores. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SPRENGER, F. y NÜSSLEIN-VOLHARD, C. (1993). The terminal system of axis determination in the *Drosophila* embryo. En *The development of Drosophila melanogaster*. M. Bate y A. Martínez-Arias editores. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- STAEHLING-HAMPTON, K., HOFFMANN, F.M., BAYLIES, M.K., RUSHTON, E. y BATE, M. (1994). *dpp* induces mesodermal gene expression in *Drosophila*. *Nature* 372: 783-786.
- TAUTZ, D. y PFEIFLE, C. (1989). A non-radioactive method for the localization of RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene *hunchback*. *Chromosoma* 98: 81-85.
- TECHNAU, G. M. y CAMPOS-ORTEGA, J. A. (1986). Lineage analysis of transplanted individual cells in embryos of *Drosophila melanogaster*. II. Commitment and proliferative capabilities of neural and epidermal cell progenitors. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 195: 445-454.
- TEROL, J., PEREZ ALONSO, M. y DE FRUTOS, R. (1991). *In situ* localization of the *Antennapedia* gene on the chromosomes of the nine species of the *obscura* group. *Hereditas* 114: 131-139.
- THISSE, B., STOETZEL, C., EL MESSAL, M. y PERRIN-SCHMITT, F. (1987). Genes of the *Drosophila* dorsal group control the specific expression of the zygotic gene *twist* in presumptive mesodermal cells. *Genes and Development* 1: 709-715.
- THISSE, C., PERRIN-SCHMITT, F., STOETZEL, C. y THISSE, B. (1991). Sequence-specific transactivation of the *Drosophila twist* gene by the *dorsal* gene product. *Cell* 65: 1191-1201.
- TOMLINSON, A., KIMMEL, B.E. y RUBIN, G.M. (1988). *rough*, a *Drosophila* homeobox gene required in photoreceptors R2 and R5 for inductive interactions in the developing eye. *Cell* 55: 771-784.
- TÖRÖK, T., TICK, G., ALVARADO, M. y KISS, Y. (1993). P-*lacW* insertional mutagenesis on the second chromosome of *Drosophila melanogaster*: Isolation of lethals with different overgrowth phenotypes. *Genetics* 135: 71-80.

- TRUMAN, J.W., TAYLOR, B.J. y AWAD, T.A. (1993). Formation of the adult nervous system. En The development of *Drosophila melanogaster*. M. Bate y A. Martínez-Arias editores. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- VAN VACTOR, D., SINK, H., FAMBROUGH, D., TSOO, R. y GOODMAN, C.S. (1993). Genes that control neuromuscular specificity in *Drosophila*. *Cell* 73: 1137-1153.
- VOLK, T. y VIJAYRAGHAVAN, K. (1994). A central role for epidermal segment border cells in the induction of muscle patterning in the *Drosophila* embryo. *Development* 120: 59-70.
- WASSARMAN, D.A., THERRIEN, M. y RUBIN, G.M. (1995). The Ras signaling pathway in *Drosophila*. *Current opinion in Genetics and Development* 5: 44-50.
- WEINTRAUB, H. (1993). The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks and thresholds. *Cell* 75: 1241-1244.
- WILKINSON, D.G. Ed. (1992). *In situ hybridization. A practical approach*. IRL Press.
- WILLIAMS, J.A., BELL, J.B. y CARROLL, S.B. (1991). Control of *Drosophila* wing and haltere development by the nuclear *vestigial* gene product. *Genes and Development* 5: 2481-2495.
- WILSON, C., PEARSON, R. K., BELLEN, H. J., O'KANE, C. J., GROSSNIKLAUS, U. y GEHRING, W. J. (1989). P-element-mediated enhancer detection: an efficient method for isolating and characterizing developmentally regulated genes in *Drosophila*. *Genes and Development* 3: 1301-1313.
- XU, T. y RUBIN, G.M. (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* 117: 1223-1237.
- ZIPURSKY, S.L. y RUBIN, G.M. (1994). Determination of neuronal cell fate: lessons from the R7 neuron of *Drosophila*. *Annu. Rev. Neurosci.* 17: 373-397.



Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha, acordó otorgar, por unanimidad, a esta Tesis doctoral de D. RUBEN DARIO ARTERO ALLEPUZ la calificación de APTO CUM LAUDE

Valencia, a 20 de OCTUBRE de 1995

El Secretario,

Doce de Tria

Juan Coux



SHITMOEN, A.W. y O'RAHIL, P.H. (1991). Progression of the cell cycle through mitosis leads to abolition of nascent transcripts. *Cell* 67: 303-310.

SIMON, M.A., BOWTELL, D.D.L., DODSON, G.S., LAVERTY, T.R. y RUBIN, G.M. (1991). Ras and a guanine nucleotide exchange factor perform crucial steps in the signaling by the sevenless protein tyrosine kinase. *Cell* 67: 701-716.

SPRADLING, A.C. (1991). Developmental genetics of oogenesis. In *The development of Drosophila melanogaster*. M. Bate y A. Martinez-Arias editores. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SPRENGER, F. y NUSSLIN-VOLHARD, C. (1993). The terminal system of axis determination in the *Drosophila* embryo. In *The development of Drosophila melanogaster*. M. Bate y A. Martinez-Arias editores. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

STABLING-HAMPTON, K., HOEFMANN, F.M., MAYLIS, M.K., KUSHTON, E. y BATE, M. (1994). *ap* induces mesodermal gene expression in *Drosophila*. *Nature* 372: 759-761.

TAUTZ, D. y PFIFLE, C. (1989). A non-radioactive method for the localization of RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene *hunchback*. *Chromosoma* 98: 81-85.

TECHNAU, G. M. y CAMPOS-ORTEGA, J. A. (1986). Image analysis of transcribed individual cells in embryos of *Drosophila melanogaster*. II. Commitment and proliferative capabilities of neural and epidermal cell progenitors. *Revue's Arch. Dev. Biol.* 195: 443-451.

TEROL, J., PEREZ ALONSO, M. y DE PRUOTOS, E. (1991). In situ localization of the *Antennapedia* gene on the chromosomes of the nine species of the *obscura* group. *Hereditas* 114: 131-139.

THESS, B., STORTZEL, C., EL MESSAL, M. y PERMIN-SCHMITT, F. (1987). Genes of the *Drosophila* dorsal group control the specific expression of the zygotic gene *tritor* in presumptive mesodermal cells. *Genes and Development* 1: 709-715.

THESS, C., PERMIN-SCHMITT, F., STORTZEL, C. y THESS, B. (1991). Segment-specific transactivation of the *Drosophila* *tritor* gene by the dorsal gene product. *Cell* 65: 1191-1201.

TOMLINSON, A., LIMMEL, B.E. y RUBIN, G.M. (1986). *rough*, a *Drosophila* homeobox gene required in photoreceptors R1 and R8 for inductive interactions in the developing eye. *Cell* 45: 771-784.

TOROK, T., TUCK, G., ALVARADO, M. y KISS, Y. (1993). P-lacW transposon insertions on the second chromosome of *Drosophila melanogaster*: isolation of lethals with differential *Drosophila* phenotypes. *Genetics* 135: 71-80.