



UNIVERSITAT DE BARCELONA



**Estudio de mutantes del cromosoma III de
Drosophila melanogaster: el gen *ash-2* como
regulador de diferenciación celular**

Memoria presentada por

MONTSERRAT AMORÓS GIBAJA

para optar al grado de

Doctora en Biología

Tesis Doctoral realizada bajo la dirección del Dr. Florenci Serras y de la Dra.

Montserrat Corominas

en el Departamento de Genética de la Facultad de Biología

Universidad de Barcelona

Programa de Genética 1996-1998

Florenci Serras

Montserrat Corominas

Montserrat Amorós

Barcelona, Abril 2001

Departamento de Genética
Facultad de Biología
Universidad de Barcelona

Tesis Doctoral

Estudio de mutantes del cromosoma III de *Drosophila melanogaster*: el gen *ash-2* como regulador de diferenciación celular

Montserrat Amorós Gibaja

Abril 2001

A los dos hombres de mi vida, Javier y Jaime

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Fue en el verano de 1977 cuando descubrí cuan diferentes podemos llegar a ser. Ese mes de julio nacia mi hermano pequeño Jaime. Y desde entonces mi vida cambio para siempre. A veces me pregunto que hubiera sido de nuestras vidas si Jaime no hubiera nacido con Síndrome de Down. Ahora él podría estar a punto de acabar una carrera, o a lo mejor lo suyo hubiera sido la música, o quizás fuera mecánico. La verdad es que se hace difícil imaginar lo imposible. Sin embargo, lo que sí tengo muy claro es en lo que cambió mi vida desde entonces. Jamás hubiera aprendido que cuando no encuentras las llaves o la cartera, el primer sitio donde debes mirar es en el congelador porque normalmente acostumbran a estar allí. Que nunca debes dejar la fiambrrera con comida en la nevera, porque hay ratones que aparecen por las noches y se lo comen todo. Que se pueden escuchar villancicos en pleno mes de agosto. Que la manera más fácil para que te hagan la merienda es repetir con insistencia que 1x8 es 8 que rico está el bizcocho. Que desgraciadamente las gafas no resisten unos minutos en el microondas.... Pero sobretodo he aprendido que hay personas que dan todo su amor sin pedir casi nada a cambio. Y aunque mi hermano tiene en estos momentos 23 años, siempre será eso, mi hermano pequeño.

Fue él quien despertó mi interés por la ciencia. Y aunque siempre tuve claro que lo mío iba a ser la genética humana, desde el momento en que el desarrollo se cruzó en mi camino, la verdad es que no pude dejarlo. Espero que mi hermano sepa entenderlo. ¡Sobretodo teniendo en cuenta que las moscas son su peor pesadilla!

Desde aquí deseo agradecerle a mis padres todo lo que han hecho durante estos años, permitiéndome seguir siempre el camino que consideraba más correcto en cada momento. Sin su esfuerzo y sacrificio, mi vida no hubiera sido tan fácil.

Y que voy a decir de Natalia, mi mejor amiga. Quien sepa lo que es la verdadera amistad, entenderá que no hace falta decir nada más. Y estas palabras también van dedicadas a Raúl, simplemente por hacerla feliz.

Creo que una de mis mayores virtudes o quizás el mayor de mis defectos, es la sinceridad, fuente de la mayoría de mis problemas. Y supongo que debido a eso, será fácil de entender porque estos agradecimientos no serán una lista interminable de toda la gente que he conocido estos últimos cinco años de mi vida. Primero, porque seguro que me olvidaría a alguien, y segundo, pero mucho más importante, porque no me gusta la hipocresía. Por eso, los agradecimientos por toda la ayuda prestada (que he de reconocer que ha sido mucha, teniendo en cuenta lo que me cuesta entender las cosas) serán de viva voz. Estoy segura que sabreis entenderlo.

De cualquier modo, no puedo dejar de nombrar a dos amigos que han sido muy importantes para mi durante este tiempo. Son Jovita Font y Francesc Cebrià. Jovita es una de las mejores personas que he conocido en mi vida, y aunque ella no sea consciente, me ha hecho ser mejor persona. Y que decir de Francesc, la persona que mejor se ha portado conmigo. Me ha escuchado siempre que lo he necesitado, me ha dado buenos consejos y siempre me ha prestado su hombro. Sin su ayuda, nunca hubierais leído estas palabras.

Por último deseo dedicar esta tesis a Javier, sin su amor, apoyo, comprensión y esas clases de informática, nunca hubiera sido posible.

ÍNDICE

ESTRUCTURA DE LA TESIS	1
INTRODUCCIÓN	5
PARTE 1. LA BIOLOGÍA DEL SISTEMA	7
1.1. Importancia de la Biología y la Genética del Desarrollo	7
1.2. <i>Drosophila melanogaster</i> como organismo modelo	7
1.3. El ciclo vital de <i>Drosophila melanogaster</i>	8
1.4. Los discos imaginales de <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo de estudio	10
1.4.1. El disco imaginal de ala	11
1.4.2. El disco imaginal de pata	14
1.4.3. El disco imaginal de halterio	15
1.5. Estructuras a las que dan lugar los discos imaginales de <i>Drosophila melanogaster</i>	16
1.5.1. El ala de <i>Drosophila melanogaster</i>	16
1.5.2. La pata de <i>Drosophila melanogaster</i>	25
1.5.3. El halterio de <i>Drosophila melanogaster</i>	26
1.6. Técnicas y estrategias para el estudio de colecciones de mutantes	27
1.6.1. Colección de mutantes generada por inserción de un elemento <i>P-lacW</i> en el cromosoma III de <i>Drosophila melanogaster</i>	27
1.6.2. La técnica del análisis clonal	28
PARTE 2. LOS GENES HOMEÓTICOS	32
2.1. Función de los genes homeóticos a lo largo del desarrollo	32
2.2. Regulación de los genes homeóticos	33
2.2.1. Grupo <i>Polycomb</i>	34
2.2.2. Grupo <i>trithorax</i>	36
OBJETIVOS	41
MATERIALES Y MÉTODOS	45
1. Estirpes utilizadas	47

2. Análisis clonal	48
3. El transposón <i>P-lacW</i>	48
4. Esquema de la escisión del elemento <i>P-lacW</i>	49
5. Montaje de las alas	50
6. Extracción de ADN genómico	50
7. Técnica de rescate del plasmidio	51
8. Análisis de PCR y secuenciación	52
9. Tinción β -Galactosidasa	54
10. Inmunohistoquímica sobre discos imaginales	54
10.1. Listado de anticuerpos utilizados	54
RESULTADOS	57
<u>CAPÍTULO 1.</u> Estudio de la colección de mutantes generados por la inserción de un elemento <i>P-lacW</i> en el cromosoma III de <i>Drosophila melanogaster</i>	59
1.1. Líneas letales en larva III	59
1.2. Líneas letales en pupa	63
1.3. Líneas semiletal y viables en adulto	65
<u>CAPÍTULO 2.</u> Caracterización fenotípica y molecular del mutante I(3)112411	69
2.1. Fenotipo del mutante I(3)112411	69
2.1.1. Fenotipo en el ala del mutante I(3)112411	69
2.1.2. Fenotipo en el halterio y la pata del mutante I(3)112411	73
2.2. El elemento <i>P-lacW</i> como responsable del fenotipo observado en el mutante I(3)112411. Generación de nuevos alelos	74
2.3. Identificación del gen mutado en la línea I(3)112411	74
2.3.1. Caracterización fenotípica de los alelos <i>ash-2^{l1}</i> , <i>ash-2^{l2}</i> y <i>ash-2^{l3}</i>	75
2.3.2. Estudios de interacción entre los alelos I(3)112411, <i>ash-2^{l1}</i> , <i>ash-2^{l2}</i> y <i>ash-2^{l3}</i>	76
2.3.3. Estudios de interacción con alelos de ganancia de función de <i>Antennapedia</i>	77

2.4. Generación de mosaicos genéticos	78
2.4.1. Mosaicos genéticos en el ala	78
2.4.2. Mosaicos genéticos en la pata	85
2.5. Estudio funcional del gen <i>ash-2</i>	87
2.5.1. Patrón de expresión del gen <i>ash-2</i>	87
2.5.2. Estudios de expresión en discos imaginales	87
2.5.3. Estudios de expresión en alas pupales	90
2.5.4. Estudios de expresión en mosaicos genéticos	91
2.6. Interacciones génicas	93
2.6.1. Interacción con el gen <i>crossveinless-2</i>	93
2.6.2. Interacción con el gen <i>plexus</i>	94
<u>APÉNDICE</u>	97
A.1. Caracterización molecular del alelo <i>ash-2^{l1}</i>	97
A.2. Estudios de complementación con genes que mapan en la región 96A	100
DISCUSIÓN	103
PARTE 1. ESTUDIO DE UNA COLECCIÓN DE MUTANTES GENERADOS POR LA INSERCIÓN DE UN ELEMENTO <i>P-lacW</i> EN EL CROMOSOMA III DE <i>Drosophila melanogaster</i>	105
1.1. Mutagénesis con elementos transponibles	105
1.2. Estudio de una colección de líneas mutantes generadas por inserción de un elemento <i>P-lacW</i> en su genoma	106
PARTE 2. <i>ash-2</i> EN EL CONTEXTO DE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR Y LOS GENES HOMEÓTICOS	108
2.1. Implicación de <i>ash-2</i> en la diferenciación celular	108
2.2. Papel del gen <i>ash-2</i> en la formación y especificación de los segmentos distales de la pata	112
2.3. <i>ash-2</i> como regulador de los genes homeóticos	113
2.4. Organización genómica del gen <i>ash-2</i> y caracterización molecular del alelo <i>ash-2^{l1}</i>	114

PARTE 3. PERSPECTIVAS DE FUTURO	116
CONCLUSIONES	119
BIBLIOGRAFÍA	123
ABREVIATURAS	147

ESTRUCTURA DE LA TESIS

Esta tesis consta de: introducción, objetivos del trabajo, materiales y métodos, resultados, discusión, conclusiones y bibliografía.

La introducción está dividida en dos grandes bloques. En una primera parte se hace una pequeña introducción sobre *Drosophila*, el organismo modelo con el que trabajamos. Se presenta un resumen sobre su ciclo vital, los discos imaginales como modelo de estudio y las estructuras a las que darán lugar en el adulto, centrándonos fundamentalmente en el ala. La segunda parte de la introducción constituye un resumen de los genes homeóticos y la regulación de su expresión a través de los genes del grupo *Polycomb* y del grupo *trithorax*.

Los resultados de esta tesis se dividen en 2 capítulos. En el Capítulo 1 se presentan los resultados del estudio de una colección de mutantes generados por la inserción de un elemento *P-lacW* en el cromosoma III de *Drosophila melanogaster*. En el Capítulo 2 se realiza la descripción fenotípica y molecular del mutante I(3)112411, se caracterizan fenotípicamente 3 nuevos alelos generados a partir de la línea original, estudiando el comportamiento de dos de ellos en mosaicos genéticos y finalmente se realiza un estudio funcional del gen mutado en estas líneas (*ash-2*) mediante interacciones génicas y patrones de expresión.

En la discusión en primer lugar se hace una reflexión sobre la utilidad de las colecciones de mutaciones generadas por inserciones de elementos *P* en el genoma. A continuación se valora la implicación del gen *ash-2* en los procesos de proliferación y diferenciación celular. A su vez, se discuten los resultados obtenidos a partir del estudio de la línea I(3)112411 y sus alelos dentro del contexto homeótico.

Para finalizar esta tesis, se incluyen varias propuestas sobre posibles perspectivas de futuro para continuar con el estudio funcional del gen.

INTRODUCCIÓN

PARTE 1. LA BIOLOGÍA DEL SISTEMA

1.1. Importancia de la Biología y la Genética del Desarrollo

La Biología y la Genética del Desarrollo se centran en entender los mecanismos por los cuales una célula acaba convirtiéndose en un organismo multicelular. Este proceso morfogénico requiere la determinación de múltiples tipos celulares y la organización de estas células siguiendo patrones elaborados.

Los biólogos del desarrollo han concentrado sus esfuerzos en sistemas modelo cuyo desarrollo embrionario es *a priori* más fácil de estudiar que el de los mamíferos. La esperanza era que los principios que se pudieran deducir del estudio de organismos como peces, moscas, ranas y gusanos pudieran ser también aplicados de manera análoga al desarrollo de los mamíferos. Los análisis genéticos combinados con técnicas bioquímicas y moleculares realizados en estos sistemas, han permitido comprobar que esta aproximación era correcta. Así, muchos de los mecanismos y moléculas estudiados, constituyen la base fundamental del desarrollo en todos los animales.

Gracias a los avances que se han producido en este campo de la Biología sobretodo en los últimos años, se ha incrementado aún más si cabe, el interés por esta rama de la ciencia. Sin embargo, en el estudio del desarrollo aún son muchas las preguntas que no tienen una respuesta clara.

1.2. *Drosophila melanogaster* como organismo modelo

Por muchas razones, *Drosophila melanogaster* es uno de los organismos superiores más extensamente estudiados, particularmente a nivel genético y a nivel genómico. Las principales ventajas como organismo modelo se centran fundamentalmente en un tiempo de generación corto, una abundante descendencia y un fácil mantenimiento debido a sus reducidas dimensiones.

Debido al exhaustivo estudio de *Drosophila* durante el último siglo, ha sido posible la acumulación de gran cantidad de información. Uno de los avances más importantes se produjo en el año 2000 cuando la secuencia completa del genoma de *Drosophila* fue publicada (Adams y col. 2000). Este hecho, junto con la disponibilidad

de multitud de técnicas y herramientas moleculares para su análisis, ha permitido consolidar a *Drosophila* como organismo modelo en los estudios de la Genética del Desarrollo.

Otra de las grandes ventajas de *Drosophila* se basa en la facilidad para introducir y combinar mutaciones en su genoma. De esta forma, el fenotipo mutante nos permite inferir la posible función del gen durante el desarrollo. El genoma de *Drosophila* contiene poco ADN repetitivo y la mayoría de los genes son de copia única, evitándose así los inconvenientes de la redundancia funcional. Esta particularidad, junto con la posibilidad de insertar nuevo material genético en el genoma de *Drosophila* ha permitido la generación de diversas colecciones de mutantes, que constituyen un poderoso medio para analizar procesos biológicos complejos (Török y col. 1993; Rørth 1996; Deák y col. 1997). Además, el conocimiento de la práctica totalidad de la secuencia nucleotídica del genoma de *Drosophila*, junto con la técnica de recombinación homóloga en *Drosophila* puesta a punto por Rong y Golic en el año 2000 nos permitirán acercarnos cada vez más a una de las metas fundamentales de la Genética, la posibilidad de mutar e identificar cada uno de los genes de un organismo modelo como *Drosophila melanogaster*.

Este gran acúmulo de información sobre la Genética y la Biología de *Drosophila* ha propiciado la aparición de varias bases de datos accesibles a través de la Web. Entre ellas destacan:

FlyBase (<http://flybase.bio.indiana.edu/>): Que incluye datos genéticos y moleculares sobre *Drosophila*.

Interactive Fly (<http://sdb.bio.purdue.edu/fly/aimain/1aahome.htm>): Una guía de los genes de *Drosophila* y sus funciones durante el desarrollo.

FlyBrain (<http://www.flybrain.org>): Una base de datos y atlas en tiempo real sobre el sistema nervioso de *Drosophila*.

FlyView (<http://flyview.uni-muenster.de/>). Una colección de patrones de expresión de genes que se expresan durante el desarrollo (Janning 1997).

1.3. El ciclo vital de *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster es un insecto holometábolo, es decir, presenta unas etapas larvarias y una etapa adulta separadas por una etapa pupal, durante la cual

tiene lugar una metamorfosis completa (Figura 1). El ciclo vital de *Drosophila* dura unos 10 días a 25°C. El huevo de *Drosophila* se forma durante un período de aproximadamente 3 días y medio. Una vez fecundado, la madre lo deposita en el exterior, iniciándose la embriogénesis. Y es durante esta etapa cuando se determina la polaridad antero-posterior y más tardíamente la dorso-ventral (para una revisión, Ingham 1988; Johnston y Nüsslein-Volhard 1992). Después de unas 24 horas, el embrión eclosiona dando lugar a una larva de vida libre que pasará por 3 etapas larvarias (LI, LII y LIII). Durante este período las células larvarias básicamente no proliferan; sin embargo, crecen en volumen debido a la endoreduplicación de su material genético. A los 5 días la larva entra en pupación y se inicia la metamorfosis. Durante esta etapa, la mayoría de tejidos larvarios son histolizados. Las estructuras adultas se formarán principalmente a partir de la reorganización de los discos imaginales (que darán lugar a las estructuras epidérmicas de la cabeza, tórax y genitales externos del adulto) y los histoblastos (que formarán la epidermis abdominal del adulto). A las pocas horas de vida, la mosca adulta es fértil y se inicia de nuevo el ciclo vital.

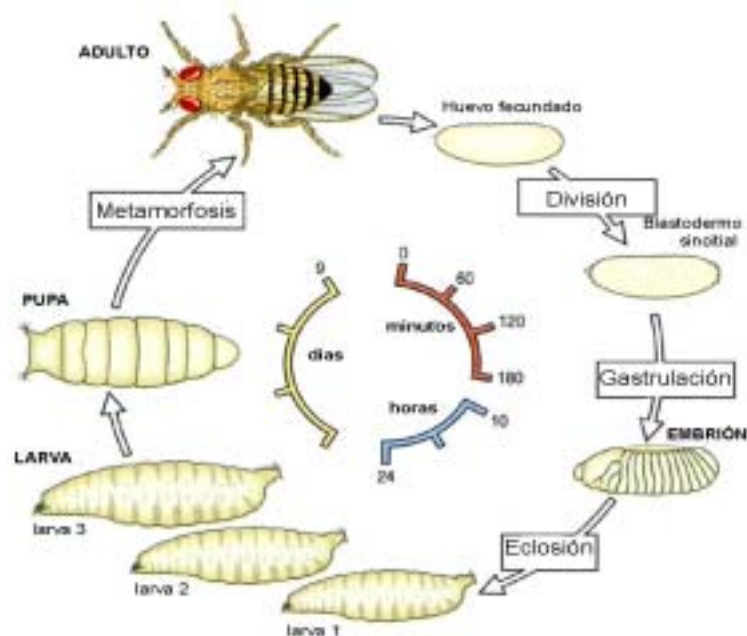


Figura 1. Ciclo vital de *Drosophila melanogaster* a 25°C. Adaptado de Wolpert (1998).

1.4. Los discos imaginales de *Drosophila melanogaster* como modelo de estudio

Los discos imaginales son las estructuras larvarias que darán lugar a la epidermis del adulto de *Drosophila melanogaster* (Figura 2). Los precursores de estos discos son unos conjuntos de células (cuyo número oscila entre 10 y 40 dependiendo del disco imaginal) que se segregan como invaginaciones de la epidermis embrionaria y que crecen por mitosis justo hasta antes de la metamorfosis, incrementando su número de células por un factor de 1000 aproximadamente (Bate y Martínez-Arias 1991; Cohen 1993). Las células de los discos son histológicamente similares, pero difieren enormemente en sus patrones de expresión génica.

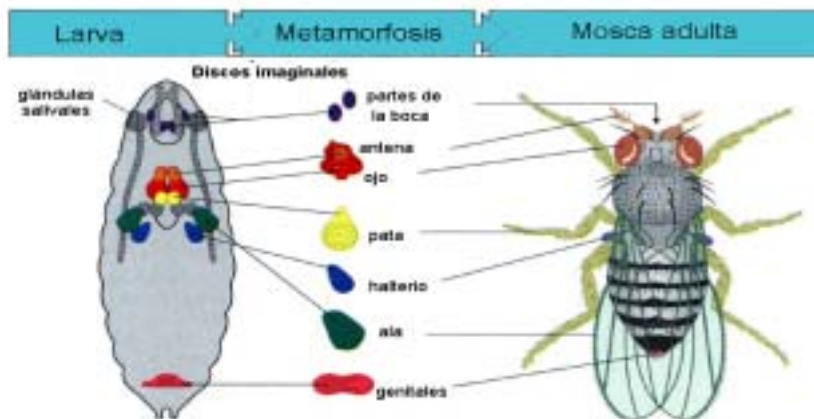


Figura 2. Morfología, localización y estructuras del adulto a las que darán lugar los discos imaginales de *Drosophila*. Adaptado de Wolpert (1998).

Existen muchas ventajas por las que se utilizan los discos imaginales como modelo de estudio. Se pueden aislar fácilmente, los estudios bioquímicos son posibles debido a que se puede acumular gran cantidad de discos en un período relativamente corto de tiempo y además se pueden mantener *in vitro* en cultivos celulares (Fristrom y Fristrom 1975).

La integración dinámica de 4 cascadas de señalización: Hedgehog (Hh), Decapentaplegic (Dpp), Wingless (Wg) y Notch (N) es la responsable del desarrollo y la elaboración del patrón de los discos imaginales (para una revisión, Williams y Carrol 1993; Blair 1995; Lawrence y Struhl 1996). Estas cascadas de señalización no

actúan independientemente las unas de las otras, sino que están relacionadas por mecanismos reguladores. Hh es una proteína de secreción sintetizada por las células del compartimento posterior (para una revisión, Chuang y Kornberg 2000). Esta expresión localizada es debida al gen selector *engrailed* (*en*) (Morata y Lawrence 1975). En se localiza en todo el compartimento posterior, donde reprimiendo la expresión de la proteína Cubitus interruptus (Ci) permite la expresión de Hh. A su vez, Hh activa su cascada de señalización exclusivamente en una estrecha franja de células adyacentes del compartimento anterior. En estas células anteriores se produce la activación transcripcional de *dpp* y *wg* (para una revisión, Serrano y O'Farrell 1997).

La distribución de Hh, Wg y Dpp es constante durante todos los estadios del desarrollo de los discos imaginales de pata, sin embargo en el desarrollo de los discos imaginales de ala y ojo su distribución sufre alteraciones debido a la presencia de reguladores adicionales. A pesar de las diferencias en la distribución espacial, todas estas moléculas reguladoras están presentes en todos los discos, controlando la expresión de diferentes factores de transcripción específicos de cada disco. De esta forma, a partir de unas cascadas de señalización comunes, se generan patrones de expresión génica diferentes (para una revisión, Neumann y Cohen 1997; Carroll 1998).

1.4.1. El disco imaginal de ala

Durante la embriogénesis, el disco imaginal de ala está formado por un conjunto de unas 40 células, que empiezan a dividirse en la primera etapa larvaria (LI). La proliferación celular continuará durante los sucesivos estadios larvarios, con una división cada 8.5 horas en promedio, hasta obtener un epitelio monocapa formado por unas 50000 células aproximadamente (Figura 3). Sin embargo, la proliferación celular no ocurre a la misma velocidad en todo el disco, existiendo heterogeneidades en los patrones de división celular. Y estos patrones de proliferación celular están relacionados con la generación de la forma y el tamaño del ala adulta y sus dos histotipos: zonas de vena y zonas de intervena (García-Bellido y Merriam 1971; González-Gaitán y col. 1994; Milán y col. 1996a). El disco imaginal de ala dará lugar

al segundo segmento torácico del adulto, incluyendo la parte dorsal del tórax (conocido como *notum*) y al ala (Figura 4).

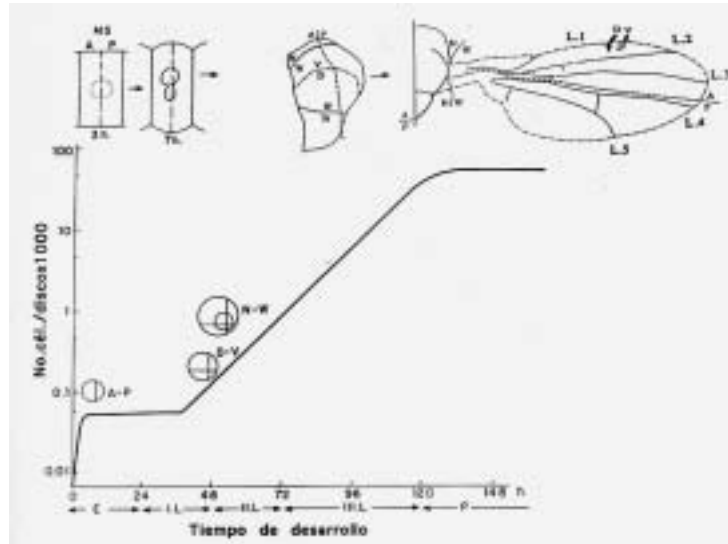


Figura 3. Curva de crecimiento del disco imaginal de ala. A-P: antero-posterior; D-V: dorso-ventral; N-W: notum-wing (ala); P-D: proximo-distal; E: embrión; I.L, II.L y III.L: LI, LII y LIII respectivamente. Adaptado de García-Bellido y Ripoll (1978).

En el disco de ala, la identidad como célula anterior o posterior es debida a la expresión (posterior) o no-expresión (anterior) del gen selector *en*. Hh solo se expresa en el compartimento posterior (células que expresan *en*) (para una revisión, Vervoort 2000). Hh difunde y actúa sobre las células anteriores adyacentes, en un diámetro aproximado de 10 células que se corresponde con lo que será la parte central del ala, induciendo la expresión de *dpp*. Dpp a su vez, actuando como morfógeno, controlará el crecimiento, la formación del patrón y la viabilidad celular en todo el ala (Basler y Struhl 1994; para una revisión, Podos y Ferguson 1999).

Durante la segunda etapa larvaria se inicia la expresión del gen *apterous* (*ap*) en las células dorsales y esto especificará la distinción entre dorsal y ventral. Además la yuxtaposición entre células dorsales y ventrales inducirá la formación del margen del ala (Díaz-Benjumea y Cohen 1993; Blair y col. 1994; Williams y col. 1994; Milán y Cohen 2000a). El límite del dominio de expresión de *ap* es pues el primer indicador conocido que determina la localización del margen del ala. Posteriormente, los genes

vestigial (vg), *scalloped (sd)*, *wingless (wg)* y *cut (cut)* serán requeridos para una correcta formación de esta estructura.

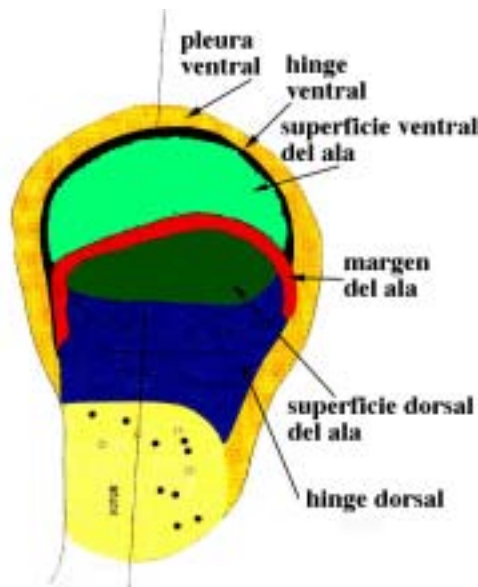


Figura 4. Disco imaginal de ala en el estadio de larva III. Adaptado de Cohen (1993).

Tras la evaginación del disco, el ala pupal sufre 2 rondas más de división celular que empiezan cerca de las venas y progresan hacia las regiones de intervena (Schubiger y Palka 1987; García-Bellido y col. 1994; Milán y col. 1996b). La primera ocurre a las 18 horas tras la formación del pupario (Schubiger y Palka 1987; Hartenstein y Posakony 1989) y se forman extensiones basales entre las caras dorsal y ventral. Aproximadamente a las 22 horas tras la formación del pupario tiene lugar la segunda división mitótica, que afecta a un número menor de células. En este momento las 2 capas celulares que conformarán el ala empiezan a unirse por sus superficies basales. Esta aposición empieza por la parte más distal y se mueve proximalmente. Conforme va progresando, las venas se hacen aparentes como regiones donde las 2 capas permanecen separadas. Mediante microscopía electrónica se observa que las 2 superficies basales no están completamente apuestas hasta las 36 horas tras la formación del pupario (Fristom y col. 1993).

En el vértice distal de cada célula del ala pupal, se inicia la formación de un pre-tricoma, configurándose de este modo la polaridad tisular del ala. La formación de este pre-tricoma progresa desde la zona distal del ala a la proximal (Wong y Alder

1993). Este proceso ocurre rápidamente y a las 38 horas tras la formación del pupario todas las células del ala tienen un pre-tricoma detectable.

A las 40 horas tras la formación del pupario las alas pupales tienen ya la forma general del ala adulta, y a las 46 horas las alas están plegadas longitudinal y distalmente dentro de la cutícula de la pupa.

1.4.2. El disco imaginal de pata

Durante la embriogénesis, el disco imaginal de pata está formado por un conjunto de unas 20 células que proliferarán durante las 3 etapas larvarias hasta obtener un epitelio monocapa formado por unas 15000 células. El disco imaginal de pata dará lugar a las patas y al tórax ventral.

El primordio de extremidad de pata se subdivide en compartimentos por la expresión localizada de factores de transcripción. La interacción entre células de compartimentos adyacentes establece centros organizadores responsables de generar un patrón espacial y promover la proliferación celular en las extremidades en desarrollo (para una revisión, Milán y Cohen 2000b). La expresión localizada de *hh* en el compartimento posterior del disco imaginal de pata dirige la expresión de *wg* en células ventrales anteriores y *dpp* en células dorsales anteriores. La activación transcripcional de *wg* y *dpp* en esta franja de células anteriores cercanas al límite del compartimento antero-posterior se confina en dominios complementarios debido a que *wg* y *dpp* antagonizan su expresión mutuamente (Basler y Struhl 1994), regulando la expresión de diversos genes implicados en generar diferencias a lo largo del eje proximo-distal (Lecuit y Cohen 1997). La acción combinada de las células que expresan *wg* y *dpp* activa la expresión de *Distal-less (Dll)*, un gen requerido en los discos imaginales para promover la formación del eje proximo-distal en las extremidades (Cohen y col. 1989). A su vez, *wg* y *dpp* reprimen la expresión de *homothorax (hth)* y *teashirt (tsh)* (Díaz-Benjumea y col. 1994; Abu-Shaar y Mann 1998; González-Crespo y col. 1998; Wu y Cohen 1999). La proteína Hth es requerida para la localización nuclear de Extradenticle (Exd), que es imprescindible para la correcta diferenciación de la región proximal de la pata. Un poco más tarde, Wg y Dpp inducen la expresión de Dachshund (Dac) en un anillo que incluye los presuntivos fémur, tibia y tarsos proximales (Lecuit y Cohen 1997). Cada uno de

estos genes es requerido para la formación de regiones específicas de la pata, pero su dominio de expresión no se corresponde de manera precisa con el futuro segmento de la pata del adulto.

A pesar que no existe una restricción de linaje celular que subdivida el eje proximo-distal en territorios proximal y distal, la separación de estos territorios es mantenida por expresión génica diferencial. Sin embargo, los mecanismos por los cuales las poblaciones celulares permanecen separadas no son conocidos (para una revisión, Couso y Bishop 1998).

La metamorfosis de la pata puede dividirse en 2 fases, un período prepupal corto (unas 12 horas) y un período pupal (que dura aproximadamente 4 días). Durante el período prepupal tienen lugar las transformaciones más evidentes en la forma de la pata, pasando de un disco plegado concéntricamente, a una estructura tubular que recuerda a la extremidad adulta, correspondiéndose la zona central del disco imaginal con la futura parte distal de la pata. Y es durante la fase pupal cuando tienen lugar los refinamientos en la forma y la diferenciación de pelos y quetas (para una revisión, Held 1995; von Kalm y col. 1995).

1.4.3. El disco imaginal de halterio

Durante la embriogénesis, el disco imaginal de halterio está formado por un conjunto de unas 10 células que proliferarán durante las 3 etapas larvarias hasta obtener un epitelio monocapa formado por unas 5000 células.

En el disco de halterio, la expresión de *en*, *dpp* y *ap* se corresponde con el patrón que encontramos en el disco imaginal del ala. Sin embargo, *wg* que se expresaba a lo largo del límite dorso-ventral del disco del ala, no se expresa en el compartimento posterior del halterio. Esta ausencia de *Wg* probablemente contribuye al desequilibrio que existe entre el compartimento anterior y el posterior del halterio, siendo este último mucho más pequeño. Además, genes diana de la cascada de transducción de señal de *Dpp* no son activados en el halterio por esta proteína (Weatherbee y col. 1998).

Ultrabithorax (Ubx) es el gen homeótico responsable del desarrollo diferencial que se produce entre alas y halterios. Mientras que ningún gen *Hox* se expresa en el ala, *Ubx* se expresa en el halterio durante todo el desarrollo (Struhl 1982; White y Wilcox

1984; Beachy y col. 1985). *Ubx* es responsable de las diferencias existentes entre los dos pares de alas en Dípteros, mariposas, escarabajos y seguramente en el resto de insectos con alas (Weatherbee y col. 1999; para una revisión, Denell y col. 1996). Mutaciones que impiden la expresión de *Ubx* en el halterio en desarrollo generan una transformación homeótica completa del halterio en ala dando lugar a la aparición de una mosca con 4 alas (Lewis 1963, 1978; Morata y García-Bellido 1976). De manera equivalente, las mutaciones que generan una expresión ectópica de *Ubx* en el ala en desarrollo generan transformaciones del ala en halterio (Lewis 1955, 1978; González-Gaitán y col. 1990).

El requerimiento de *Ubx* en el halterio finaliza a las pocas horas tras la formación del pupario, siendo la diferenciación celular independiente de los efectos directos de *Ubx* en muchos aspectos. Al finalizar el período pupal, las diferencias entre las células del ala y del halterio son evidentes: Las células del ala secretan 8 veces más cutícula que las células del halterio, produciendo cada una de ellas un único tricoma; mientras que las células del halterio presentan entre 1 y 4 tricomas, mucho más cortos que los de las alas (Roch y Akam 2000). Estas diferencias entre las células del halterio y del ala obedecen a diferencias en la arquitectura del citoesqueleto.

1.5. Estructuras a las que dan lugar los discos imaginales de *Drosophila melanogaster*

1.5.1. El ala de *Drosophila melanogaster*

El ala adulta está constituida por 2 capas de células epidérmicas continuas (un epitelio dorsal y uno ventral) a lo largo del margen del ala. Podemos diferenciar 3 componentes básicos: las estructuras del margen, las venas y las regiones de intervena. Sin tener en cuenta las estructuras neurales del ala, las células de intervena constituyen el 90% del área del ala, mientras que las células de vena constituyen el 10% restante. La función de las células de intervena es proveer al ala de una superficie aerodinámica para el vuelo.

El ala de *Drosophila* también presenta toda una serie de elementos sensoriales, mecano y quimiorreceptores, que se localizan a lo largo del margen del ala, en la base del radio, a lo largo de la vena L3 y en la vena transversal anterior. El margen

anterior está formado por una vena que presenta elementos sensoriales que se localizan en dos filas dorsales y una ventral. Las filas ventrales y dorsales están separadas por 2 filas de tricomas. El margen posterior está formado por 2 filas de células, una dorsal y otra ventral (García-Bellido y Merriam 1971; Hartenstein y Posakony 1989).

Las venas actúan como soportes rígidos necesarios para volar y su desarrollo constituye un sistema experimental excelente para analizar los mecanismos moleculares y celulares implicados en la formación del patrón de un epitelio debido a que han sido identificados muchos genes implicados en la formación de las venas en *Drosophila* (para una revisión, Díaz-Benjumea y García-Bellido 1990; García-Bellido y de Celis 1992; Bier 2000). La mayoría de las mutaciones en estos genes se han clasificado según el fenotipo de pérdida de función: pérdida de venas, exceso de venas o venas más anchas.

Las venas son esclerotizaciones epidérmicas sobre lagunas de hemolinfa que discurren longitudinalmente entre las superficies dorsal y ventral del ala y que cercan tráqueas y nervios (García-Bellido y de Celis 1992). Existen dos tipos de venas, las longitudinales, que discurren a lo largo del ala y un segundo tipo, las venas transversales, que discurren perpendiculares a las venas longitudinales, conectándose con ellas en varios puntos. Las venas longitudinales son 6, tres de ellas se localizan en el compartimento anterior (L1, L2 y L3) y 3 en el compartimento posterior (L4, L5 y L6). Las venas transversales o "crossveins" son 2, la vena transversal anterior o cv-a (que conecta las venas L3 y L4) y la vena transversal posterior o cv-p (que conecta las venas L4 y L5) (Figura 5).

La corrugación es el aspecto dorsal o ventral preferencial de las venas. La cara corrugada presenta tricomas más gruesos y compactos que la cara opuesta y la cutícula está más pigmentada. El patrón de corrugación es específico de cada vena. En la condición salvaje, la vena L2 y la parte proximal de la vena L4 corrugan ventralmente, mientras que las venas L3, L5 y la parte distal de la vena L4 corrugan en la cara dorsal del ala. En el caso de la cv-a, la parte que contacta con la vena L3 corruga dorsalmente y la parte que contacta con la vena L4 lo hace ventralmente. Y de manera equivalente, la parte de la cv-p que contacta con la vena L4 corruga

ventralmente y la parte que contacta con la vena L5 lo hace dorsalmente (García-Bellido y de Celis 1992) (Figura 5).

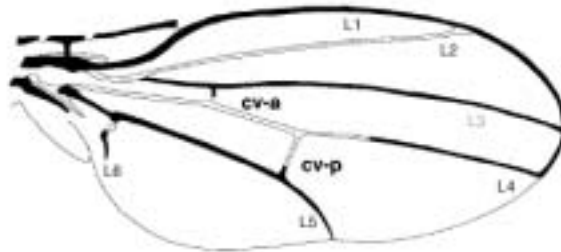


Figura 5. Patrón de venación en el ala de *Drosophila*. Las venas marcadas en negro corrugan en la cara dorsal y las blancas lo hacen en la cara ventral. L1-L6: venas longitudinales; cv-a y cv-p: vena transversal anterior y posterior respectivamente. Adaptado de Díaz-Benjumea y Hafen (1994).

Las células que forman las venas son más pequeñas, están más compactadas y secretan una cutícula más pigmentada que las células localizadas en las regiones de intervena, que comprenden las regiones entre venas. Además, las únicas células que permanecen vivas en el adulto son precisamente las células de vena. Las células de intervena se adhieren entre ellas vía integrinas, cambian su morfología pasando a ser células más planas y mueren rápidamente después que el adulto emerge, dando lugar a una cutícula transparente.

El desarrollo de las venas en *Drosophila* puede dividirse en 2 períodos. En una primera fase, durante el período de larva III, se inicia la formación de las venas en el disco imaginal de ala. La expresión génica en las venas se localiza como series de bandas paralelas (García-Bellido 1977; Sturtevant y col. 1993). En una segunda fase, durante el inicio del desarrollo pupal, el disco imaginal del ala se pliega por la línea que constituirá el futuro margen del ala, formándose una bicapa de células. Las células de los primordios de las venas longitudinales se comunican entre ellas durante el desarrollo pupal mediante varias señales inductivas para poder así alinearse de manera precisa, generando un tubo ininterrumpido (García-Bellido 1977; Díaz-Benjumea y García-Bellido 1990; Sturtevant y Bier 1995). Las venas transversales también se forman durante este período pupal (Mohler y Swedberg

1964) como resultado de la expresión localizada de *crossveinless-2* y la activación de la cascada de señalización BMP (Conley y col. 2000).

La diferenciación de la célula vena implica la actividad coordinada de varias cascadas de señales que promueven (receptor del factor de crecimiento epidérmico de *Drosophila* y Decapentaplegic) o inhiben la formación de venas (Notch) (para una revisión, Schweitzer y Shilo 1997; de Celis 1998). La activación de las señales del DER y Dpp se restringe a las células que formarán las venas, mientras que la activación de Notch se produce en las células adyacentes a las futuras venas.

La proteína transmembrana Rhomboid (Ro), también conocida como Veinlet (Ve), es el primer marcador de las venas longitudinales. Su expresión se inicia más o menos simultáneamente en todos los primordios de vena como unas líneas definidas durante la mitad de la tercera etapa larvaria promoviendo la actividad localizada del DER mediante la activación del ligando Spitz (Spi) (Sturtevant y col. 1993, 1994) y continúa durante el estadio pupal. Este patrón de expresión de *rhomboid* sugiere la existencia de bordes definidos preexistentes que determinarán la posición de las venas.

La activación de la expresión de *dpp* a través de su receptor Thick veins (Tkv), que se inicia en los territorios de vena a partir de las 18 horas tras la formación del pupario, parece estar mediada por la actividad DER (Yu y col. 1996; de Celis 1997). La actividad de esta cascada (DER/Ras/Raf/MAPK) está regulada temporal y espacialmente durante el desarrollo del ala. Sin embargo, a pesar que la expresión de DER rápidamente desaparece en los territorios de vena durante las etapas iniciales del período pupal, como consecuencia de los altos niveles de actividad MAPK (Sturtevant y col. 1994), la expresión de *dpp* es mantenida mediante un bucle de autorregulación y permanece a niveles elevados en las venas hasta su diferenciación final. Esta autorregulación es inhibida por DER en células de interviena, reforzando un refinamiento de los territorios de vena (Martín-Blanco y col. 1999). Estos patrones de activación de DER, Dpp y Notch dependen a su vez de la expresión localizada de otros componentes de estas cascadas. Así, Delta (DI), uno de los ligandos de Notch, se expresa a niveles elevados en las venas, y activa la señal de Notch y la expresión de *Enhancer of split (E(spl))* en las regiones de

intervena adyacentes (de Celis y col. 1997; Huppert y col. 1997) y limita la expresión de Rhomboid en las presuntivas venas (de Celis y Bray 1997).

En el ala, los fenotipos mutantes de alelos de *N* tanto viables como letales ponen de manifiesto el requerimiento de la función de *N* en al menos 3 procesos del desarrollo: proliferación celular, diferenciación de las venas y formación del margen del ala. En estos procesos la función de *N* puede ser ejecutada actuando a través de diferentes genes “downstream”. Alelos de pérdida de función de *N* presentan venas más gruesas y pérdidas del margen del ala, mientras que los alelos de ganancia de función de *N* conocidos como *Abruptex* (*Ax*) y que se corresponden con la condición hiperactivada de *N* (Palka y col. 1990; de Celis y col. 1991), causan la pérdida de venas y un incremento en el tamaño de las alas (de Celis y García-Bellido 1994).

En el disco de ala, Vein (*Vn*) un activador débil del DER (Schnepp y col. 1996; Simcox y col. 1996) se expresa en una banda delimitada por las venas L3 y L4 en los períodos larvarios y posteriormente se expande para ocupar todos los territorios de intervena en los estadios pupales donde es requerido para que tengan lugar las últimas divisiones del ala pupal (García-Bellido y col. 1994; Simcox y col. 1996).

Argos (*Aos*) se ha demostrado que es un ligando inhibidor del DER (Freeman y col. 1992) y parece actuar de manera similar en la formación de las venas (Sawamoto y col. 1994; Schweitzer y col. 1995).

La formación de las venas progresa durante el desarrollo pupal y en esta fase es cuando se activa el factor de transcripción *ventral veinless* (*vvl*) en todos los presuntivos territorios de vena (de Celis y col. 1995). *vvl* es un candidato a ser un mediador en la coordinación que tiene que producirse entre las células dorsales y ventrales para que las venas se diferencien correctamente. El fenotipo mutante de alelos viables de *vvl* consiste en la pérdida de las venas ventrales.

Los territorios de vena e intervena están marcados por diferencias en la expresión génica durante el desarrollo del disco imaginal. *blistered* (*bs*), que codifica para una proteína homóloga al Serum Response Factor de mamíferos, se expresa en las intervenas y es requerido para permitir que las células adopten la identidad de intervena (Fristrom y col. 1994; Montagne y col. 1996; Roch y col. 1998a, Nussbaumer y col. 2000). Los fenotipos de alelos viables en homocigosis van desde alas que presentan venas ectópicas y una frecuencia moderada de burbujas

("blisters"), alas con las venas posteriores más anchas y una gran frecuencia de burbujas, hasta llegar al fenotipo extremo, donde se produce una pérdida total de la adhesión entre las dos superficies del ala, dando lugar a alas con forma de globo. En clones mutantes para *bs* todas las células adoptan la identidad de vena y las intervenas se pierden, sugiriendo que la represión de *bs* es requerida para la diferenciación de las venas. *bs* sin embargo, no parece estar implicado en la proliferación celular.

Aunque las células de las venas muestran el mismo tipo de diferenciación y el desarrollo de las venas longitudinales de *Drosophila* implica a las mismas cascadas de señalización, existen diversas características que hacen diferentes a cada vena. Varios genes son requeridos para la formación de venas individuales, sugiriendo que cada vena es especificada individualmente (Díaz-Benjumea y García-Bellido 1990). Los genes específicos de vena podrían formar parte de un código combinatorial de señales que activaran un programa de diferenciación de vena común en diferentes partes del ala. Estos genes a su vez, podrían también conferir cualidades individuales a cada vena longitudinal (Biehs y col. 1998) (Figura 6).

La parte central del ala se corresponde con el dominio de expresión de Hh (para una revisión, Hammerschmidt y col. 1997; Vervoort 2000). Experimentos genéticos indican que Hh es requerido para la formación y posicionamiento de las 2 venas longitudinales más centrales (L3 y L4) y también para la formación del dominio central de intervena comprendido entre las venas L3-L4 (Mullor y col. 1997; Strigini y Cohen 1997). Hh se expresa en células posteriores y envía la señal a las células anteriores vía las proteínas transmembrana Smoothed (Smo) y Patched (Ptc) para inducir la expresión de Dpp a lo largo del límite de compartimento antero-posterior (Posakony y col. 1991; Tabata y Kornberg 1994; Sanicola y col. 1995; Zecca y col. 1995; Rodríguez y Basler 1997). A su vez Ptc inhibe la actividad de Smo en ausencia de la señal de Hh (Nusse 1996).

En un ala normal, la vena L3 está formada por las células anteriores localizadas a unas 5 células de diámetro respecto al dominio de actividad de Hh, mientras la vena L4 se localiza en el compartimento posterior y se diferencia a partir de células adyacentes al límite del compartimento antero-posterior. Las células posteriores no responden a Hh, ya que no expresan los elementos clave de la cascada de

transducción de Hh (Phillips y col. 1990). Esto significa que las venas L3 y L4 se desarrollan a partir de células con poca o ninguna actividad Hh. Además, la distancia entre las venas L3 y L4 está relacionada con la cantidad de Hh. Así, una reducción de la función de Hh provoca un decremento de la anchura de la región de intervena, mientras que la sobreexpresión de Hh en su propio dominio induce un incremento de la anchura de la región de intervena, mediante el desplazamiento de la vena L3. Se puede concluir por tanto, que Hh forma un gradiente de actividad donde un alto nivel de señal de Hh induce la formación de la intervena y un bajo nivel permite la formación de L3 (Mullor y col. 1997; Strigini y Cohen 1997). Además, Hh permite la formación de la vena L4 por células posteriores insensibles a Hh.

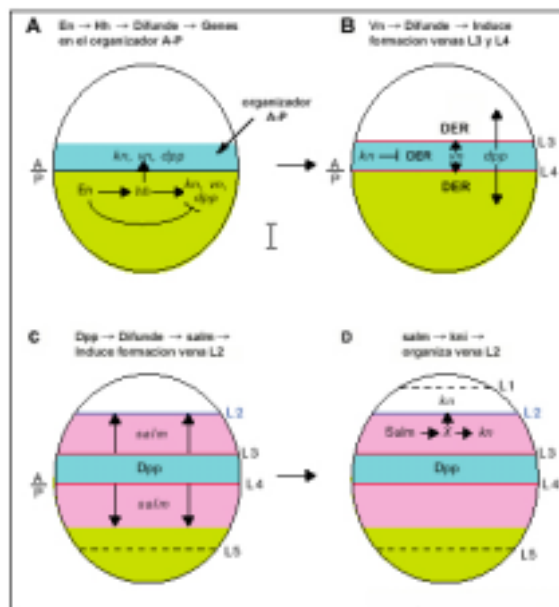


Figura 6. Formación de las venas. **(A)** Engrailed (dominio verde) activa la expresión de Hh y al mismo tiempo impide que las células del compartimento posterior respondan a Hh. Hh difunde al compartimento anterior, donde activa la expresión de genes en el organizador A-P (dominio azul) incluyendo *kn*, *vn* y *dpp*. **(B)** *Vn* difunde y activa la señal del DER en las células vecinas, que constituirán los primordios de las venas L3 y L4. Las células del organizador no pueden responder a *Vn*, en parte porque *kn* suprime la expresión del DER. *Dpp* también difunde desde el organizador y funciona como un morfógeno activando a los genes diana. **(C)** Niveles moderados de *Dpp* activan la expresión de *salm* (dominio rosa). La vena L2 (línea azul marino) se forma justo anteriormente al dominio de expresión de *salm*. **(D)** *Salm* activa la expresión de una hipotética señal (X) y a la vez suprime la respuesta a la señal X. Sólo las células adyacentes al dominio de expresión de *salm* pueden responder a esta señal induciendo la expresión de *kni* y *knrl* en el primordio de la vena L2. *kni* y *knrl* organizan entonces la expresión génica alrededor del primordio de L2. Adaptado de Bier (2000).

Hh controla el posicionamiento de las regiones de vena/intervena en la parte central del ala mediante la acción de *knot* (*kn*, también conocido como *collier* (*col*)) (Nestoras y col. 1997; Vervoort y col. 1999; Mohler y col. 2000). *Kn* es un factor de transcripción de la familia COE. En ausencia de la actividad *kn*, L3 y L4 se fusionan y el dominio central de intervena se pierde (Nestoras y col. 1997; Vervoort y col. 1999). *kn* se localiza en las células que reciben niveles elevados de la señal de Hh y su expresión está controlada por Ci. A su vez, *Kn* es requerido para la activación de *bs* en la parte central del ala. Mediante análisis clonal se ha visto que *kn* tiene dos funciones en la zona central del ala: En primer lugar, *kn* es requerido para la formación de la región de intervena que separa las venas L3 y L4 y en segundo lugar, es requerido para impedir la formación de venas ectópicas en esta región (Mohler y col. 2000).

Se ha demostrado que la formación de las venas L1, L3 junto a los elementos sensoriales asociados y L5 dependen de la actividad de 2 factores de transcripción del complejo *iroquois* (*iro-C*) codificados por los genes *araucan* (*ara*) y *caupolican* (*caup*) (Leyns y col. 1996; Gómez-Skarmeta y Modolell 1996; Gómez-Skarmeta y col. 1996). Estos dos genes se expresan de una forma Hh dependiente en la parte central del disco del ala. Se expresan en células con bajos niveles de actividad Hh y son regulados positivamente por Ci y Dpp y negativamente por En y Wg.

Un elemento esencial para transducir la señal de Hh es *Cubitus interruptus* (Ci) (Kalderon 1997; para una revisión, Ingham 1998a) un factor de transcripción homólogo al factor Gli de vertebrados (Orenic y col. 1990). Ci se localiza en el compartimento anterior (Johnson y col. 1995) pero en dos formas distintas dependiendo de la posición a lo largo del eje antero-posterior: una forma completa (Ci-155) en las células más posteriores, que recibe la señal Hh, y una forma truncada (Ci-75) en el resto de células anteriores (Aza-Blanc y col. 1997; para una revisión, Aza-Blanc y Kornberg 1999).

Dpp activa la expresión del complejo *spalt-major/spalt-related* (*sal-C*) en un dominio central del ala que incluye la posición de las venas L2, L3 y L4 (de Celis y col. 1996). *salm* y *salr* codifican factores de transcripción caracterizados por la presencia de varios motivos "double zinc finger" y son requeridos para el desarrollo correcto de las venas (Kühnlein y col. 1994; Barrio y col. 1996; de Celis y col. 1996;

Sturtevant y col. 1997). La eliminación de *salm* y *salr* en mosaicos genéticos afecta a la formación de las venas de una manera similar a como lo hace la reducción en la expresión de *dpp*, sugiriendo que *salm/salr* median la actividad de *dpp* en el proceso de formación de las venas (de Celis y col. 1996).

Salm y Salr regulan la expresión de los complejos génicos *knirps* (*kni-C*) e *iroquois* (*iro-C*) en el ala (de Celis y Barrio 2000). Bajos niveles de Salm/Salr activan de una manera autónoma celular la expresión de *knirps* y *knirps-related* (que codifican para proteínas de la familia del receptor de la hormona esteroide) en la presuntiva región de L2 (Gómez-Skarmeta y Modolell 1996; Gómez-Skarmeta y col. 1996; Lunde y col. 1998), mientras que niveles elevados de Salm/Salr reprimen la expresión del *kni-C*. Así, la vena L2 se forma justo anteriormente al dominio de expresión de Salm (de Celis y col. 1996; Sturtevant y col. 1997). Estos efectos duales de Salm/Salr sobre *kni* y *knrl* restringen su dominio de expresión a una banda de células que se corresponde con el primordio de la futura vena L2, determinando así su localización.

Además Salm y Salr reprimen la expresión del *iro-C* en el dominio central del ala, estableciendo la posición de la vena L5 adyacente al territorio de expresión de *salm/salr* en el compartimento posterior. Debido a la represión de Salm/Salr, la expresión del *iro-C* sólo ocurre en el dominio de Salm/Salr en células donde la señal de Hh es activa. El gen *abrupt* (*ab*) es el candidato a ser el gen organizador de la vena L5, ya que en mutantes *ab* se pierde la expresión de todos los genes testados en L5 (Sturtevant y Bier 1995).

De forma global podemos concluir que cada vena expresa una combinación única de factores de transcripción que son requeridos para su formación y que confieren las características individuales a cada vena (de Celis y Barrio 2000).

L2: Kni-C y Salm/Salr

L3: Iro y Salm/Salr

L4: Salm/Salr

L5: Iro

Además de las venas, la cutícula del adulto de *Drosophila* se caracteriza por la presencia de órganos sensoriales que se localizan en posiciones muy precisas. Cada

órgano sensorial se forma a partir de la progenie de una célula precursora única. Las posiciones de estos órganos ya están definidas en los discos imaginales gracias a los dominios de expresión restringidos espacialmente de los genes proneurales *achaete* (*ac*) y *scute* (*sc*) que confieren a determinadas células la habilidad para convertirse en células madre sensoriales (SMCs, del inglés “sensory mother cells”) (García-Bellido y Merriam 1971; para una revisión, Ghysen y Dambly-Chaudière 1989; Jan y Jan 1990). Esta relación espacial y temporal entre los patrones de expresión de *as-sc* en clusters de células y la aparición de las SMCs, ha sido estudiada con detenimiento (Cubas y col. 1991).

1.5.2. La pata de *Drosophila melanogaster*

Las patas de *Drosophila* son extremidades cilíndricas divididas en 9 segmentos a lo largo del eje proximo-distal (coxa, trocánter, fémur, tibia y 5 segmentos tarsales) separados por articulaciones flexibles, la mayoría de las cuales sólo giran en un plano, definiendo el eje dorso-ventral (Fistrom y Fristrom 1993). Cada segmento de la pata tiene un tamaño, forma y patrón de órganos sensoriales característico.

La separación entre segmentos es ya visible en el disco imaginal, que está formado por una serie de pliegues concéntricos de diámetro creciente desde el centro a la periferia del disco. La base de los surcos entre los pliegues se corresponde con estas constricciones que aparecerán en los diferentes segmentos de la extremidad. Sin embargo, no hay tantos pliegues en el disco imaginal como en la pata adulta. El fémur distal, la tibia proximal y los segmentos tarsales 2-5 son indistinguibles hasta después de haberse iniciado la evaginación del disco imaginal (Cohen 1993). (Figura 7).

N se activa localmente en los anillos de células de la zona distal de cada segmento de la pata durante el desarrollo imaginal (de Celis y col. 1998; Bishop y col. 1999). Esta activación de N en los límites de los segmentos no es solo crítica para la formación de las articulaciones, sino que también afecta al crecimiento de cada segmento. Como en el ala, la actividad de N es requerida en la pata para establecer fronteras que actúan como centros organizadores para el crecimiento subsiguiente de los segmentos de las patas.

Como en el caso de las venas y el margen del ala, la activación localizada de la cascada de N en la formación de los segmentos de las patas parece implicar un incremento en la expresión de los ligandos Serrate (Ser) y Delta (DI) en las células adyacentes a aquellas que presentan una actividad máxima de N (de Celis y Bray 1997; de Celis y col. 1997; Micchelli y col. 1997).



Figura 7. Representación esquemática de la relación entre el disco imaginal de pata de larva III y la pata adulta. Adaptado de Lecuit y Cohen (1997).

Se ha postulado que las patas y las antenas de *Drosophila* derivan de una estructura ancestral común y en ambos casos el crecimiento de estas estructuras requiere el producto del gen *Distal-less (Dll)*. Mientras que los genes *Hox* son requeridos durante el desarrollo para conferir a cada par de patas su identidad, los genes selectores *homothorax (hth)* y *extradenticle (exd)* (que son reprimidos por los genes *Hox* en las patas) controlan el desarrollo antenal reprimiendo los patrones de expresión de genes pata específicos.

1.5.3. El halterio de *Drosophila melanogaster*

Los halterios se localizan en el tercer segmento torácico (T3) y constituyen un segundo par de alas profundamente modificadas, que son necesarios para mantener el equilibrio durante el movimiento y el vuelo. La evolución de este segundo par de alas hasta convertirse en halterios implicó la modificación, reducción y/o eliminación de muchos caracteres (para una revisión, Weatherbee y Carroll 1999).

El crecimiento de los halterios y alas de *Drosophila* está regulado por los genes *vestigial (vg)* y *scalloped (sd)*. Mientras el desarrollo de las alas es independiente de los genes *Hox* (para una revisión, Carroll 1995) se ha comprobado que en el halterio *Ubx* reprime la expresión de la proteína de señalización *Wg* y toda una serie de genes activados por *Wg* y *Dpp* como son *spalt-related (salr)*, *vestigial (vg)*, *blistered (bs)* y *achaete-scute (ac-sc)*. Existe una clara correlación entre la represión de la expresión de estos genes y la aparición de las características morfológicas que diferencian los halterios de las alas: menor tamaño (*Wg*, *Vg*), ausencia de un patrón de venación (*Salr*), forma (*Bs*) y órganos sensoriales (*Sc*) (Weatherbee y col. 1998).

La represión específica que lleva a cabo *Ubx* en el halterio puede ser controlada indirectamente mediante interacciones de *Ubx* con otros factores o directamente mediante la unión de *Ubx* a elementos reguladores de los genes diana (o ambos). Mientras no haya datos que excluyan la posibilidad indirecta, el control directo por *Ubx* es atractivo por varias razones. Parece que la expresión de cada gen en el disco imaginal del ala está controlado por un elemento regulador específico de ala, mientras que es independiente de la expresión en otras partes del cuerpo. De esta forma, la represión de los elementos específicos del ala por *Ubx* afectaría específicamente la expresión en el halterio. Dado que los activadores de los genes diana de *Ubx* son comunes en muchas estructuras, la regulación indirecta de estos genes mediante sus activadores presumiblemente no estaría limitada al halterio.

1.6. Técnicas y estrategias para el estudio de colecciones de mutantes

1.6.1. Colección de mutantes generada por inserción de un elemento *P-lacW* en el cromosoma III de *Drosophila melanogaster*

En organismos modelo como *Drosophila* se han realizado estudios a gran escala sobre colecciones de mutantes (Shearn y col. 1971; Stewart y col. 1972; Shearn 1974; Shearn y Garen 1974; Kiss y col. 1976; Gatti y Baker 1989; Török y col. 1993; Roch y col. 1998b; Rørth y col. 1998; Spradling y col. 1999). La principal ventaja de esta aproximación es que permite el análisis de genes importantes para un

determinado proceso sin que sea necesario un conocimiento *a priori* sobre su identidad o naturaleza molecular.

En “screenings” genéticos convencionales, el genoma se mutageniza utilizando agentes químicos o radiación ionizante para crear mutaciones al azar. Cada uno de estos mutágenos produce típicamente mutaciones que reducen o eliminan la función génica. Los elementos transponibles se han convertido en un elemento mutagénico más eficaz debido a que facilitan la clonación del gen afectado.

Se asume de forma general que la inserción de los elementos transponibles se produce de forma aleatoria en las zonas eucromáticas del genoma. Sin embargo, es conocido por los datos disponibles, que los elementos *P* se insertan preferencialmente en las zonas 5' no traducidas de los genes, generando en la mayoría de los casos, mutaciones letales recesivas (Kelley y col. 1987; Spradling y col. 1995).

A mediados del año 1996 se inició en nuestro grupo el estudio de una colección de mutantes en colaboración con el Dr. Peter Deák (Department of Genetics. University of Cambridge) generada en el Department of Genetics. Jozsef A. University, Szeged, por inserción del transposón *P-lacW* en el cromosoma III de *Drosophila melanogaster* (Deák y col. 1997). El objetivo de nuestro trabajo ha sido la identificación de genes implicados en los procesos de proliferación y diferenciación de los discos imaginales, centrándonos fundamentalmente en el disco del ala como modelo de estudio. Para ello, de un conjunto de 2368 líneas mutantes, se seleccionaron aquellas que presentaban una fase de letalidad en larva III/pupa y las líneas semiletales y viables. De esta forma pretendíamos identificar genes requeridos específicamente para el desarrollo de los discos imaginales, que tendrían un efecto muy pequeño o nulo sobre el desarrollo embrionario. El análisis de este estudio se presentará en el Capítulo 1 de resultados.

1.6.2. La técnica del análisis clonal

En *Drosophila* existen mutaciones que cambian la diferenciación final de los tricomas y quetas que pueden ser utilizadas como marcadores. García-Bellido y Meriam en 1971 realizaron un estudio del desarrollo del disco imaginal del ala mediante análisis clonal utilizando estos marcadores celulares (Figura 8).

Los parámetros de crecimiento pueden ser estudiados en un organismo mediante la utilización de la recombinación mitótica, que puede inducirse en diferentes etapas del desarrollo y los clones de células homocigóticas para el marcador celular mutante pueden ser analizados en términos de frecuencia, tamaño, forma y características (Stern 1936).

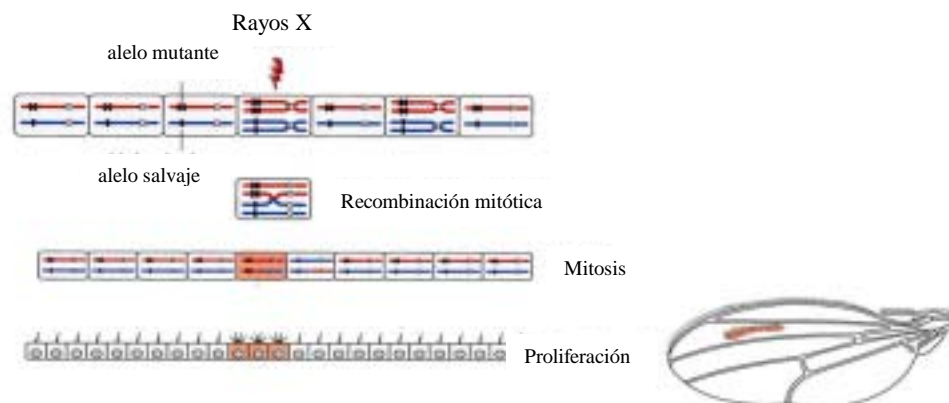


Figura 8. Técnica del análisis clonal. Los rayos X inducen una rotura y una recombinación entre cromátidas homólogas. La segregación asegura que un centrómero paterno y uno materno son heredados juntos y dan lugar a dos células: una homocigota para el alelo salvaje y una célula marcada, homocigota para la mutación de interés. Adaptado de Wolpert (1998).

La frecuencia de clones incrementa exponencialmente desde las larvas más jóvenes tratadas hasta las 21 horas tras la formación del pupario. La duración del ciclo mitótico de una división a la siguiente es constante y puede ser medida por el tiempo necesario para doblar el número de clones por cada disco imaginal (8.5 horas en promedio) (García-Bellido y Merriam 1971). A las 21 horas tras la formación del pupario, las células del ala ya no son sensibles a la inducción de recombinación mitótica. En este momento se están produciendo las últimas divisiones antes de la diferenciación celular.

Al incrementar la edad de las larvas en el momento de la irradiación, el tamaño de los clones decrece y recíprocamente, el número de clones por disco imaginal crece. Esto es así porque el tamaño de un clon es inversamente proporcional al número de células en el disco imaginal en el momento de la irradiación. Los clones más grandes que pueden conseguirse contienen alrededor de 1000 células.

Clones grandes inducidos en larvas jóvenes muestran una forma alargada (10 veces más largos que anchos). La orientación general sigue el eje proximo-distal. Esto presumiblemente muestra cambios en la orientación de los husos mitóticos (García-Bellido y Meriam 1971). Los límites de los clones son indeterminados y presentan muchas indentaciones.

Los *Minutes* son una clase de mutaciones recesivas que presentan un fenotipo dominante que consiste en que los individuos heterocigotos para la mutación crecen más lentamente. La técnica introducida por Morata y Ripoll (1975) que consistía en marcar clones *Minute*⁺ inducidos por recombinación mitótica en animales heterocigotos para *Minute*, permitió el descubrimiento de los compartimentos en *Drosophila*. Se trata de regiones del adulto que se forman a partir de grupos de células que se van dividiendo durante el desarrollo y que quedan confinadas en áreas específicas del disco imaginal. Estos compartimentos representan unidades de crecimiento y determinación (García-Bellido y col. 1973; Morata y Lawrence 1975). Un clon *Minute*⁺ producido en un animal *Minute* crece más rápidamente como consecuencia de su tasa de crecimiento. Sin embargo, estos clones siempre respetan unas fronteras, que constituyen los límites de los compartimentos. En primer lugar, los clones no cruzan una línea virtual que separa la zona anterior de la zona posterior. Más tarde, aparecen otras restricciones de linaje, la dorso-ventral y la proximo-distal.

A veces es útil generar 2 clones al mismo tiempo marcados de forma diferente, esta técnica se conoce como clones gemelos o “twin spots” y se utiliza cuando se quieren hacer comparaciones precisas entre la tasa de crecimiento de un clon experimental y un clon control.

Clásicamente, la recombinación mitótica ha sido inducida mediante rayos X. Sin embargo, la irradiación con rayos X presenta 3 problemas principales:

1. Existe un elevado número de marcadores cuticulares, pero el número de marcadores para otros tejidos es muy limitado.
2. Los rayos X causan un nivel considerable de muerte celular a las dosis utilizadas (10Gy (1000rad)).

3. Para algunas localizaciones génicas la frecuencia de recombinación es muy baja.

Estos problemas técnicos han sido solucionados en *Drosophila* utilizando una recombinasa específica de lugar de levaduras (FLP). Se pueden generar clones en el 95% de los genes, incluyendo el estudio de clones en tejidos internos (Golic y Lindquist 1989; Golic 1991; Chou y Perrimon 1992; Xu y Rubin 1993). La FLP cataliza la recombinación entre unas secuencias llamadas FRTs (del inglés “flippase recombination target”). Para generar recombinación mitótica mediante FRTs, éstos han de estar situados en posición idéntica en cromosomas homólogos y además orientados en la misma dirección. Así, la inducción de la expresión de la FLP vía un promotor ubicuo (“heat-shock”, hs) es capaz de incrementar significativamente la frecuencia de mosaicismo sin la letalidad asociada a la irradiación con rayos X. Sin embargo, como en el caso de la irradiación con rayos X, esta aproximación tiene aún limitaciones. La inducción ubicua de la FLP vía choque térmico permite un grado de control espacial y temporal limitado. En ocasiones la inducción de clones mediante esta técnica puede producir letalidad, debido al gran número de clones que se obtienen. Para superar las limitaciones de este sistema, se ha aprovechado el sistema de expresión génica GAL4 (Brand y Perrimon 1993). Este sistema de activación génica binaria utiliza el activador de levadura GAL4 para controlar la transcripción de los genes diana tanto cuantitativamente como cualitativamente. Fusionando el gen de interés al promotor de respuesta a GAL4 (UAS), su expresión puede ser dirigida con una línea GAL4 apropiada. Construyendo un “GAL4-responsible FLP” (UAS-FLP), se puede proveer un alto nivel de control espacial y temporal sobre la recombinación.

PARTE 2. LOS GENES HOMEÓTICOS

2.1. Función de los genes homeóticos a lo largo del desarrollo

El cuerpo de los insectos es metamérico, es decir, está compuesto por una serie de unidades repetidas, que se diferencian en patrones y estructuras particulares acordes con su posición. La generación y diversificación de los segmentos durante la embriogénesis depende de 2 procesos: la subdivisión del embrión en unidades reiterativas y la especificación de sus cascadas de diferenciación. En *Drosophila* y otros insectos de banda germinal larga, la estructuración del cuerpo se establece simultáneamente en el estadio blastodérmico de la embriogénesis.

Los experimentos de genética clásica en *Drosophila* dividen las mutaciones letales embrionarias en varias clases:

La primera clase son los genes de efecto materno, llamados así porque el fenotipo del embrión refleja el genotipo de la madre.

La segunda clase de genes son los genes “gap”, responsables del establecimiento de la subdivisión del embrión en 15 segmentos discretos. Sus mutaciones resultan en la pérdida de varios segmentos del embrión, formando un hueco en el patrón de segmentación normal.

La tercera clase de genes reguladores embrionarios son los genes homeóticos, que actúan para especificar la identidad de cada segmento. Estos genes se definen clásicamente por su fenotipo mutante, que consiste en la transformación de una parte del cuerpo en otra. Los diferentes fenotipos de estos mutantes reflejan tanto el momento como la localización de su expresión durante el desarrollo embrionario temprano. Las transformaciones dramáticas generadas por las mutaciones en genes homeóticos son debidas a la compleja regulación de su expresión. Los genes homeóticos contienen enormes regiones (alrededor de 200 kilobases) de ADN regulador que integra la información posicional facilitada por los genes de segmentación.

En *Drosophila*, los genes homeóticos se agrupan en dos grandes complejos, el complejo *Antennapedia* (*ANTP-C*) y el complejo *bithorax* (*BX-C*), que en conjunto

reciben el nombre de *Hom-c*, localizándose uno cerca del otro en el cromosoma 3 (para una revisión, Paro 1990). La localización de los genes de estos complejos en el cromosoma (de 3' a 5') refleja el orden de su expresión temporal y espacial (de anterior a posterior) (Figura 9). En mamíferos los clusters de genes *Hox*, presentan estas mismas características (para una revisión, Gellon y McGinnis 1998).

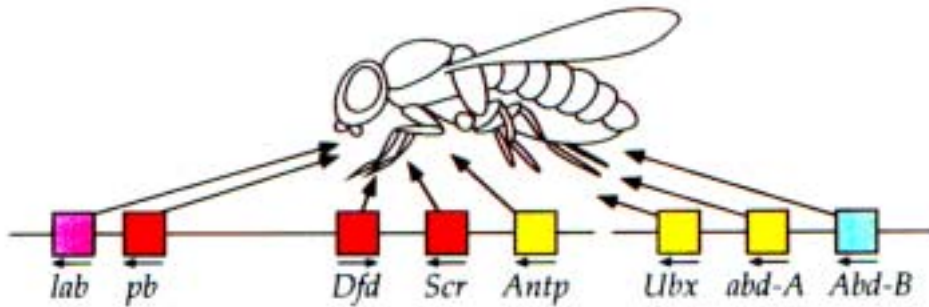


Figura 9. Los genes homeóticos de *Drosophila melanogaster*. Adaptado de Salser y Kenyon (1994).

De forma remarcable, humanos y moscas han heredado aparentemente de un ancestro común en algún momento hace 600 millones de años un sistema intacto para la especificación de las posiciones a lo largo del eje antero-posterior. Estas similitudes en la estructura, organización y expresión de los genes Hox sugirió que en vertebrados realizaban una función similar. La tecnología actual ha permitido corroborar esta hipótesis mediante estudios de patrones de expresión, estudios de homologías y otras aproximaciones experimentales (para una revisión, Gaunt y Singh 1990; Carrol 1995).

E.B. Lewis hizo un análisis innovador sobre las mutaciones homeóticas del *BX-C* (para una revisión, Lewis 1978,1998), que estableció el paradigma en el cual se ha basado el análisis contemporáneo de *Drosophila*.

2.2. Regulación de los genes homeóticos

La expresión diferencial de los genes homeóticos del *ANTP-C* y del *BX-C* es iniciada durante la embriogénesis por los genes “gap” y los genes “pair-rule” (Akam 1987). Durante el desarrollo larvario estos genes no se expresan, por lo que el mantenimiento de la expresión de los genes homeóticos, requerido para la correcta

diferenciación de cada segmento de la mosca, depende de otros mecanismos. Entre ellos:

- Autorregulación (Bergson y McGinnis 1990; Irvine y col. 1993).
- Regulación cruzada mediada por los productos de otros genes homeóticos (Hafen y col. 1984).
- Mecanismos de retroalimentación que implican comunicación célula-célula.
- Regulación por:
 - + Genes del grupo *Polycomb* (*Pc-G*) (Paro 1990).
 - + Genes del grupo *trithorax* (*trx-G*) (Kennison y Tamkun 1988; Shearn 1989).

2.2.1. Grupo *Polycomb*

Los genes del grupo *Polycomb* (*Pc-G*) son requeridos para silenciar la expresión de los genes homeóticos fuera de su dominio normal de expresión. Cuando los genes del *Pc-G* están mutados no se produce la represión de los genes homeóticos (para una revisión, Kennison 1995; Orlando y Paro 1995; Pirrotta 1997a; van Lohuizen 1999). Los experimentos genéticos y moleculares realizados indican que los productos de los genes del *Pc-G* actuarían como un complejo multimérico de unas 15 proteínas que regularían a los genes homeóticos. Además la composición de estos complejos variaría en función de los diferentes genes diana (Strutt y Paro 1997).

Se han identificado elementos reguladores en los genes homeóticos, así como en otros genes no relacionados, que son necesarios para el mantenimiento de un estado transcripcional reprimido. Estas regiones se han denominado elementos de respuesta a Polycomb (PREs: del inglés, "Polycomb-response elements") (para una revisión, Pirrotta 1997 a,b, 1998; Farkas y col. 2000). Sin embargo, hasta el momento no hay ninguna evidencia que haya podido demostrar que las proteínas del *Pc-G* de *Drosophila* se unan específicamente al ADN. Se han propuesto múltiples modelos que intentan explicar el mecanismo de acción de los genes del *Pc-G*. Estos modelos van desde compactación de la cromatina (Paro 1990), interferencias en las interacciones promotor-potenciador (Pirrotta y Rastelli 1994), formación de un complejo inactivo promotor-silenciador (Bienz y Müller 1995), secuestro de genes

diana en un compartimento nuclear (para una revisión, Paro 1993) y por último la relocalización de los nucleosomas (para una revisión, Pirrotta 1997a,b).

El gen *Polycomb* (*Pc*) fue identificado por el fenotipo de los machos heterocigotos mutantes, que se caracteriza por la presencia de peines tarsales en los pares de patas 2^o y 3^o. Estos peines tarsales son el reflejo de una transformación de las patas 2^a y 3^a en 1^a, ya que los machos sólo desarrollan esta estructura en el primer par de patas en la condición salvaje. La mutación de *Pc* en homocigosis es letal.

La proteína *Pc* no muestra homología a nivel de secuencia con ninguna otra proteína caracterizada hasta el momento, a excepción de su cromodominio, que es homólogo al dominio de la proteína HP-1, codificada por el gen *Su(var)205*, que está implicada en la organización de la estructura de la cromatina (para una revisión, Bienz y Müller 1995). HP-1 fue identificada como una proteína que afectaba a la variegación por efecto de posición (PEV: del inglés “position effect variegation”). Este fenómeno es debido a que la heterocromatina de *Drosophila* suprime la expresión de los genes eucromáticos situados justo a su lado. Esta represión es estable y se hereda clonalmente, dando lugar a un patrón variegado. Un fenómeno similar se produce en mamíferos cuando genes autosómicos recesivos se fusionan al cromosoma X inactivo (para una revisión, Henikoff 1990). La presencia del cromodominio en la proteína *Pc* se ha sugerido como la conexión existente entre los genes *Hom* y este efecto de variegación.

La proteína *Pc* se localiza en 60 bandas discretas sobre cromosomas politénicos (Zink y Paro 1989). La distribución de la proteína correlaciona perfectamente con la posición de los genes que los análisis genéticos sugieren que interactúan con *Pc*. La proteína se une a las zonas donde se localizan el *ANTP-C* y el *BX-C* y además en otros lugares donde mapan otras proteínas del *Pc-G*, indicando que estos genes deben regularse mutuamente.

Se ha comprobado que las funciones de los genes del *Pc-G* están conservadas entre mamíferos y *Drosophila*. Los resultados obtenidos indican que aunque mamíferos y moscas utilizan diferentes moléculas y mecanismos para iniciar la determinación, los mecanismos genéticos y moleculares utilizados para mantener el estado de los genes homeóticos parecen ser los mismos (Müller y col. 1995;

Schumacher y col. 1996; van der Lugt y col. 1996; Coré y col. 1997; Takihara y col. 1997; Bel y col. 1998; Jacobs y col. 1999).

2.2.2. Grupo *trithorax*

Los genes del grupo *trithorax* (*trx-G*) son requeridos para el mantenimiento del estado activo de los genes homeóticos en sus dominios normales de expresión, pero no para su establecimiento (para una revisión, Kennison 1993, 1995; Orlando y Paro 1995; Pirrotta 1997a; van Lohuizen 1999). Se cree que los genes del *trx-G* funcionan estequiométricamente como subunidades de una proteína multimérica. Se ha podido demostrar que Brm, Ash-1 y Ash-2 son subunidades de distintos complejos, donde algunas de las subunidades no son proteínas codificadas por los genes del *trx-G* conocidas hasta el momento (Papoulas y col. 1998).

Se han encontrado loci en mamíferos que están implicados en la regulación de los genes *Hox* (de la misma forma que lo están los grupos *Pc-G* y *trx-G* en la regulación de los genes homeóticos) (Yu y col. 1995). También forman complejos multiproteicos y regulan la activación y la represión transcripcional, así como aspectos de la estructura de la cromatina.

La clasificación de un gen dentro del grupo *trx* se basa en 4 criterios genéticos:

1. Alelos débiles en homocigosis generan transformaciones homeóticas semejantes a la pérdida de función de los genes homeóticos.
2. Dobles heterocigotos de alelos fuertes para diferentes genes del grupo generan transformaciones homeóticas similares, fenómeno conocido como no complementación intergénica.
3. Alelos fuertes en heterocigosis suprimen el fenotipo dominante generado por la delección de *Pc*.
4. Pérdida de función de estos genes provoca una reducción en la acumulación de los productos de genes homeóticos como *Ubx* y *Sex combs reduced* (*Scr*), pero acumulación ectópica de *Antp*.

Dentro del *trx-G* se incluyen los genes:

brahma

brahma (*brm*) fue identificado inicialmente a partir de un “screening” para encontrar genes supresores dominantes de las mutaciones *Pc* (Kennison y Tamkun 1988). *brm* se expresa ubicuamente y está presente en todos los estadios del desarrollo (Elfring y col. 1998). Una proteína relacionada de *Sacharomyces cerevisiae*, Swi2 (también conocida como Snf2, Gam 1 y Tye 3) se ha visto que facilita la unión de activadores a regiones promotoras (para una revisión, Winston y Carlson 1992; Carlson y Laurent 1994; Tamkun 1995; Wade y Wolffe 1999; Peterson y Workman 2000; Sudarsanam y Winston 2000).

Brm formaría parte de un complejo de 2 MDa que contribuiría a la regulación de la transcripción génica alterando la estructura de la cromatina mediante su interacción con activadores transcripcionales. Se sabe que el gen *osa*, que codifica para una proteína con un dominio de interacción rico en AT (ARID), es un componente de este complejo, promoviendo la activación de varios genes diana (Collins y col. 1999; Collins y Treisman 2000).

trithorax

Los mutantes homocigotos para *trithorax* (*trx*) mueren al final de la embriogénesis. Mediante estudios de análisis clonal se pudo ver que *trx* es requerido durante los estadios larvarios para que se produzca la correcta diferenciación de los segmentos torácicos, abdominales y la cabeza (Ingham 1981,1985). Es decir, estas mutaciones en *trithorax* mimetizan las mutaciones de pérdida de función de muchos genes de los complejos *ANTP-C* y *BX-C*, incluyendo el gen *Ubx* (para una revisión, Ingham 1998b). Pero además, al igual que en el caso de *brm*, su función no se limita exclusivamente a la regulación de los genes homeóticos (Breen 1999).

Al igual que en el caso del *Pc-G* se han identificado elementos reguladores en los genes homeóticos, así como en otros genes no relacionados, que son necesarios para el mantenimiento de un estado transcripcional activo. Estas regiones se han denominado elementos de respuesta a Trithorax (TREs: del inglés, “Trithorax-response elements”) (para una revisión, Pirrotta 1997 a,b; Farkas y col. 2000).

Utilizando anticuerpos contra la proteína Trx se ha visto que se une en 63 lugares específicos sobre cromosomas politénicos de las glándulas salivares larvarias

(Chinwalla y col. 1995). Al igual que para Pc, se detectan lugares de unión en zonas donde mapan genes del *ANTP-C* y *BX-C*. Además, al menos 30 de los lugares de unión coinciden con los de Pc, implicando que las interacciones entre estos dos grupos de proteínas son importantes para realizar sus funciones activadoras y represoras correctamente (Orlando y col. 1998).

El homólogo humano de *trx* es el gen *ALL-1* (también conocido como *HRX*, *MLL* y *HTRX1*) que se localiza en 11q23. Se hipotetiza que codifica para un factor de transcripción implicado en la regulación de genes que controlan el desarrollo y/o la diferenciación. Las translocaciones cromosómicas que se producen entre diferentes genes y el gen *ALL-1* se asocian comúnmente con leucemias agudas en niños, leucemias linfoblásticas agudas (ALL) y leucemias mieloides agudas (AML) (para una revisión, Look 1997). El punto de rotura se localiza en uno de los intrones del gen, formándose un gen quimera con la pauta de lectura de *ALL-1* en fase con los diferentes genes que reemplazan la parte N-terminal de la proteína ALL-1 (Djabali y col. 1992; Gu y col. 1992; Tkachuk y col. 1992 y Shilatifard y col. 1996).

absent, small or homeotic discs-2

El gen *absent, small or homeotic discs-2* (*ash-2*) (Shearn y col. 1971; Shearn y col. 1987; Shearn 1989; LaJeunesse y Shearn 1995; Adamson y Shearn 1996) es un miembro del *trx-G* descubierto por el Dr. Allen Shearn (Department of Biology, Johns Hopkins University, Baltimore) en un “screening” de mutantes letales en larva/pupa que presentaban anomalías en los discos imaginales. Mutaciones en *ash-2* producen transformaciones homeóticas que recuerdan las mutaciones de pérdida de función de los genes homeóticos. Las transformaciones que pueden apreciarse son las siguientes:

- proboscis → pata y/o antena
- antena → pata
- 1^{er} par de patas → 2^o par de patas
- 3^{er} par de patas → 2^o par de patas
- halterio → ala
- genitalia → pata y/o antena

Mutaciones en *ash-2* también generan la aparición de fenotipos que no son típicos de las mutaciones en genes homeóticos. Estos fenotipos incluyen la aparición de quetas ectópicas, la duplicación o pérdida de venas, pérdidas del margen posterior del ala, duplicación de quetas torácicas, transformación de las *sensilla campaniforme* en quetas, sobrecrecimiento en las patas y patas supernumerarias (Adamson y Shearn 1996). Estos fenotipos implican que *ash-2* está envuelto en la regulación de muchas clases de genes.

ash-2 se ha mapado en 96A17-19 sobre cromosomas politénicos, y se ha determinado su posición en relación a otros genes de la zona. La región que contiene a *ash-2* se ha clonado y el ADNc correspondiente se ha aislado y secuenciado. El ADNc completo consiste en 1959 nucleótidos, que codifican para 572 aminoácidos. La secuencia predice una proteína de aproximadamente 69 KDa. Ash-2 tiene una similitud de secuencia con *Polycomb-like*, *trithorax* y *absent*, *small or homeotic discs-1* (*ash-1*) en un dominio rico en cisteínas llamado PHD, un putativo dominio “double zinc-finger” que se cree que está implicado en las interacciones proteína-ADN o proteína-proteína (Adamson y Shearn 1996).

Se ha generado un anticuerpo policlonal que detecta la proteína Ash-2 en los discos imaginales (presente a bajos niveles en los discos imaginales larvarios y en una concentración mucho mayor en los discos imaginales tras la formación del pupario), en los núcleos de las glándulas salivares y en las células de los cuerpos grasos (Adamson y Shearn 1996).

El transcrito de *ash-2* está presente durante todo el desarrollo. En Western blots, el anticuerpo detecta 2 proteínas, una de aproximadamente 70 KDa durante el período larvario y una proteína de 53 KDa que se expresa durante el período pupal. Estos datos implican que *ash-2* está regulado durante el desarrollo, y que la proteína debe adoptar nuevas funciones a partir de la formación de la pupa. Esta idea encaja bien con el hecho que *ash-2* parece estar implicado en varios procesos diferentes del desarrollo (Adamson y Shearn 1996).

La mayoría de alelos de *ash-2* presentan una fase de letalidad tardía, que puede ser debida a que el producto del gen sea sólo necesario en estadios tardíos del desarrollo, o que exista una contribución materna, que permite a las larvas mutantes

para *ash-2* sobrevivir hasta la fase pupal. Se sabe que *ash-2* es requerido durante la oogénesis.

El análisis genético de *ash-2* ha revelado que interacciona con un alelo de ganancia de función de *Antennapedia*, *Antp^{Ns}*. De manera alelo específica, el fenotipo de esta ganancia de función se ve incrementado o suprimido actuando sobre el promotor 2 (P2) de *Antennapedia* (Adamson y Shearn 1996).

Recientemente han sido clonados los homólogos de *ash-2* en humanos (*ASH-2L*) y en ratones (*Ash-2l*). La presencia de una señal conservada de localización nuclear y el motivo PHD en el gen humano, parecen sugerir que *ASH2L* podría funcionar como un regulador transcripcional en humanos, tal y como lo hace su homólogo en *Drosophila* (Ikegawa y col. 1999).

Existen abundantes evidencias que indican que muchos de los miembros del *trx-G* y *Pc-G* están ampliamente conservados tanto a nivel estructural como funcional (para una revisión, Gould 1997; Schumacher y Magnuson 1997). Incluso se ha encontrado un homólogo de *Enhancer of zeste* (un miembro del *Pc-G*) en plantas, que se conoce como *curly leaf (clf)* (Goodrich y col. 1997).

OBJETIVOS

1. Estudio de una colección de mutantes generados por inserción de un elemento *P-lacW* en el cromosoma III de *Drosophila melanogaster* con la finalidad de identificar mutaciones que afecten a la proliferación, morfogénesis y/o diferenciación de los discos imaginales y estudiar su función.
2. Estudio monográfico de una de las líneas seleccionadas de la colección (I(3)112411).
 - 2.1. Caracterización fenotípica del mutante y de los nuevos alelos generados. Estudio de su comportamiento en clones de células homocigóticas en un fondo heterocigoto (análisis clonal).
 - 2.2. Análisis molecular del gen responsable de los fenotipos asociados al mutante I(3)112411.
 - 2.3. Análisis funcional del gen mediante interacciones génicas y patrones de expresión.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Estirpes utilizadas

Todos las estirpes fueron mantenidas a 25°C.

Las estirpes de la colección de elementos *P-lacW* se mantienen en heterocigosis con el balaceador TM6C, que contiene los marcadores *Stubble (Sb)* y *Tubby (Tb)*. Para una descripción más completa de los balaceadores, las deficiencias y las mutaciones, consultar Lindsley y Zimm (1992).

Todos los experimentos control han sido realizados con la estirpe Canton S.

Además se han utilizado las siguientes estirpes mutantes:

- Se ha utilizado un alelo de *ash-2* generado por el Dr. Allen Shearn:
B-4584 *red¹ e¹ ash-2¹ / TM6, Tb¹*
- Para los estudios de complementación con genes que mapan en la zona de inserción del elemento *P-lacW* en la línea I(3)112411 se han utilizado los mutantes:
U-83350 *In (3R) Ubx^{7LL} ats^R asp¹ ats¹ p^p / TM6B, e¹ Tb¹ ca¹*. Sinónimos: Df(3R)XS, Dp(3R)XS.
U-Z317 *st¹ e¹ tld² / TM3, Sb¹*
tld^{6P1}
B-4530 *w¹¹¹⁸; kni^{ri-1} e¹ I(3)96Bg¹ / TM3, Sb¹*
B-4587 *st¹ slo¹*
B-625 *tx¹*
B-4569 *cn¹; tok³ / TM3, Sb¹ Ser¹*

La inicial B indica que las estirpes se obtuvieron del Bloomington Stock Center y la inicial U indica que la estirpe procede del Umea Stock Center.

- Para el estudio de dobles mutantes se han utilizado los siguientes alelos:
cv-2¹
px⁷²
- Para los estudios de interacción con alelos de ganancia de función de *Antennapedia* se han utilizado los mutantes:
U-71700 *st¹ Antp^{Ns} cu¹*
B-2259 *Antp^{73b}*

2. Análisis clonal

La recombinación mitótica fue inducida con rayos X mediante una fuente generadora que operaba a una dosis de 1000 R (300 R/minuto, 100 KV, 15 mA) a diferentes intervalos de tiempo tras la puesta del huevo (60, 72 ó 80 horas). En todos los casos las puestas fueron de 24 horas. Por lo tanto, el tiempo de irradiación tiene un margen de +/- 12 horas.

- Para hacer el análisis clonal del cromosoma III la estirpe utilizada para el brazo R fue:

$f^{36a}; mwh f^{+87D} M(3) w^{124} / TM1, mwh$

- Y para el brazo L:

$f^{36a}; M(3) f^{55} f^{+77A} / TM1, mwh$

- Para hacer el análisis de clones gemelos ("twin analysis") para el brazo R del cromosoma III la estirpe utilizada fue:

$f^{36a}; mwh bld cu f^{+98B} / TM1, mwh$

Para generar clones de células homocigotas en discos imaginales en un fondo heterocigoto la recombinación mitótica fue inducida mediante el sistema de recombinación de lugar específico de levadura FRT-FLP. La expresión del enzima Flipasa de levaduras (FLP) permite la recombinación entre las dianas de recombinación FLP (FRT) en las células de *Drosophila* (Golic y Lindquist 1989). Los clones en disco se generaron utilizando las siguientes estirpes:

hsFLP; FRT82B *ash-2*¹ / FRT82B *arm lacZ*

hsFLP; FRT82B *ash-2*¹ / FRT82B *M arm lacZ*

A las 50 ± 12 horas tras la puesta del huevo las larvas se pusieron a 37°C durante 20 minutos, se dejaron desarrollar, se diseccionaron en el estadio larvario LIII y se procedió a realizar la tinción con los anticuerpos adecuados.

3. El transposón *P-lacW*

El elemento *P-lacW* (Bier y col. 1989) contiene el gen *white*⁺ que permite identificar las moscas que llevan el transposón por su color de ojos (el genotipo de las líneas de la colección es *yw; P-lacW / TM6C*). El transposón también tiene insertado el gen

bacteriano *lac-Z* que codifica para el enzima β -Galactosidasa. Y por último, el elemento *P-lacW* contiene secuencias plasmídicas (pBR322/ori/ampR) que permiten el clonaje de las regiones genómicas flanqueantes al transposón. En la Figura 10 se presenta un esquema de dicho elemento.

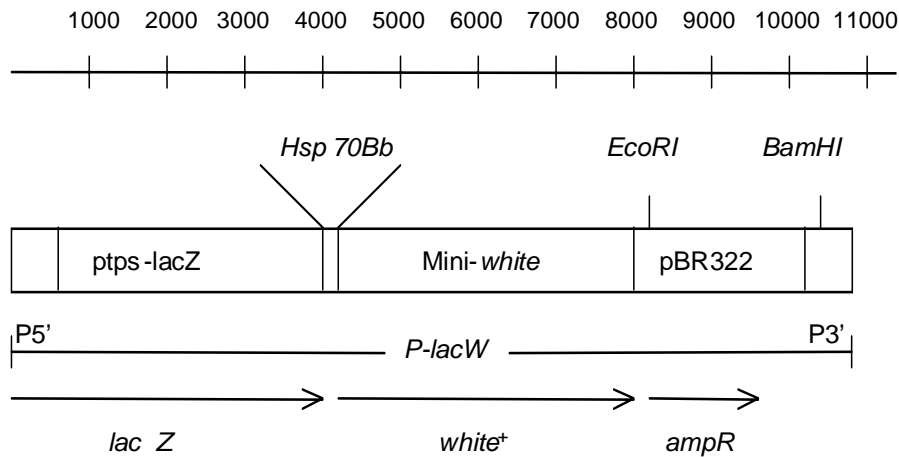


Figura 10. Esquema del elemento *P-lacW* que tienen insertado en su cromosoma III las líneas de la colección.

4. Esquema de la escisión del elemento *P-lacW*

- Se cogen hembras vírgenes de genotipo *yw/yw*; *P-lacW* / TM6C y se cruzan con machos *+ / +*; *Df(3R)C7* / TM3, *Sb P(Δ2-3)*.
- De los descendientes se seleccionan los machos de genotipo *yw / Y*; *P-lacW* / TM3, *Sb P(Δ2-3)* y se cruzan con hembras vírgenes *yw / yw*; *P-lacW* / TM6C.
- Se selecciona por la presencia de moscas *yw*; (*) / *P-lacW* donde (*) representa el elemento *P-lacW* que se ha escindido, y por lo tanto se ha perdido de este cromosoma (Török y col. 1993).

La presencia de estas moscas indica que el fenotipo puede ser revertido y que por lo tanto el elemento *P-lacW* es el responsable del fenotipo asociado.

La ausencia de estas moscas indica que el fenotipo no puede ser revertido, y que esta línea en particular lleva asociada una mutación en un segundo lugar o en

muy pocos casos, podría ser debido a la presencia de un elemento *P-lacW* defectivo.

5. Montaje de las alas

- Se dejan los adultos en SH (glicerol:etanol 1:2) al menos durante 1 día.
- Se sacan los adultos del SH y se ponen en agua destilada.
- Se separan las alas del cuerpo de la mosca con la ayuda de unas pinzas Dumont nº 5.
- Se limpian las alas con agua destilada.
- Se hacen 2 lavados con etanol absoluto.
- Se ponen las alas en ácido láctico:etanol (6:5).
- Se ordenan las alas en un porta con la ayuda de agujas de tungsteno.
- Se espera a que se evapore el exceso de ácido láctico:etanol.
- Se pone un cubre sobre el porta con cuidado de no mover las alas y que no se formen burbujas.
- Se sella la preparación y se coloca sobre el porta un peso durante unas horas para que las alas queden completamente planas.

6. Extracción de ADN genómico

- Se seleccionan 200 moscas adultas o larvas del tercer estadio del genotipo deseado.
- Se homogenizan en 1.5 ml del tampón NIB:
 - 10 mM tris pH 7.4
 - 60 mM NaCl
 - 10 mM EDTA
 - 0.15 mM espermidina
 - 0.15 mM espermina
- Después de homogeneizar se pasa a un tubo Falcon de 15 ml donde se añaden 15 µl de proteinasa K (concentración final = 0.2 mg/ml).
- Se añade 1.5 ml del siguiente tampón:
 - 0.32 M tris pH 9.0
 - 30 mM EDTA

2% SDS

0.2 mg/ml proteinasa K

- Se centrifuga 5 minutos a 3000 rpm, se recupera el sobrenadante y se incuba a 37°C durante 2 horas.
- Se realizan 3 pasos de fenol/cloroformo y 1 paso de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1).
- Al volumen recuperado se le añade 2.4 volúmenes de etanol absoluto a –20°C.
- Se centrifuga 2 minutos a 3000 rpm, se recupera el ADN y se dejan secar los restos de etanol a temperatura ambiente.
- Se resuspende el ADN en 200 µl de TE pH 8.0 y se añaden 4 µl de RNAsa (concentración final = 200 µg/ml).
- Se incuba a 37°C durante 30 minutos.
- Se realizan 2 pasos de fenol/cloroformo.
- Al volumen recuperado se le añade 2.4 volúmenes de etanol absoluto a –20°C.
- Se deja 15 minutos a temperatura ambiente.
- Se centrifuga 10 minutos a 4°C.
- Se descarta el sobrenadante y se deja secar el pellet durante 10 minutos a temperatura ambiente y se resuspende en 100 µl de TE.
- Se guarda a 4°C hasta su utilización.

7. Técnica de rescate del plasmidio

Las secuencias bacterianas en el elemento *P-lacW* están flanqueadas por una diana *Eco RI* en una dirección y por dianas únicas para *Bam HI*, *Hind III*, *Pst I*, *Bgl II* y *Xba I* en la otra dirección. Estas enzimas pueden ser utilizados para clonar las secuencias de ADN contiguas al lugar de inserción del elemento *P-lacW* (Pirrota 1986).

1. – Se digiere el ADN genómico con los enzimas de restricción elegidos (en nuestro caso *Eco RI*, *Bam HI* y *Pst I*).
 - Se incuba unas 4 horas a 37°C.

- Se realiza un paso de fenol/cloroformo y uno de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) y al sobrenadante recuperado se le añade 1/10 del volumen de acetato de sodio 3M y 2.4 volúmenes de etanol absoluto.
 - Se deja 1 hora y 15 minutos a -80°C .
 - Se centrifuga 15 minutos a 4°C y se lava el pellet con 500 μl de etanol al 70%.
 - Se centrifuga 5 minutos a 4°C , se deja secar bien el pellet y se resuspende en 75 μl de TE.
2. – Para la ligación se ha de utilizar la cantidad de ADN equivalente a una mosca.
- Se deja a 16°C durante toda la noche.
 - Se hacen dos pasos de fenol/cloroformo y uno de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). Al volumen recuperado se le añade 1/10 del volumen de acetato de sodio 3M y 2.4 volúmenes de etanol absoluto a -20°C y se deja a -80°C durante 2 horas.
 - Se centrifuga 15 minutos a 4°C y se lava el pellet con 500 μl de etanol al 70%.
 - Se centrifuga 5 minutos, se deja secar bien el pellet y se resuspende en 10 μl de TE.
3. – Protocolo de transformación.

Las células competentes utilizadas fueron Epicurian Coli XL-2 Blue ultracompetent cells de Stratagene y el protocolo se realizó siguiendo las instrucciones facilitadas por el fabricante.

8. Análisis de PCR y secuenciación

Para secuenciar las zonas flanqueantes al elemento *P-lacW* se utilizó un cebador derivado de la repetición invertida terminal del elemento *P* (28 mer). La inserción del elemento *P-lacW* en la secuencia genómica se determinó secuenciando los rescates del plasmidio con 2 cebadores localizados en la secuencia interna del elemento *P-lacW*. Para el rescate *Eco RI* el cebador era 5' TCACTCGCACTTATTGCAAGCATACG 3'. Y para el rescate *Bam HI* 5' ACACAACCTTTCCTCTCAACAA 3'.

A partir de las secuencias genómicas obtenidas, se diseñaron toda una serie de cebadores que nos permitieron ir avanzando en el conocimiento de la secuencia del

gen en ambas direcciones. La lista de cebadores utilizados se presenta a continuación:

CEBADORES	POSICIÓN	SECUENCIA
a.1(F)	31-55	5' GGTACAGGCACATGCACTGACGCTG 3'
a.2(F)	407-427	5' GAGTCACGGTCTGAGTTGCGG 3'
a.3(R)	441-418	5' AGAAGAGCAAGTGCCCGCAACTCA 3'
1.1(F)	612-637	5' CAAGAGCCAGAGTTGGAGCGAAGAGG 3'
1.2(R)	772-749	5' GAAATTCGGTTGCTGGCCAGAGTG 3'
3.1(F)	1112-1138	5' TGCCCTTCATCACCAACTATGTGTTCCG 3'
3.2(R)	1070-1049	5' TGCACCCAGCGTGAACAGTTGG 3'
d.1(F)	1204-1229	5' GAAGCCCCGCAGATTTATCCCTCTTG 3'
d.2(R)	1211-1185	5' GGGGCTTCATTGCACTTACTAGCCTGG 3'
4.1(F)	1252-1276	5' CCATATCCCAGATGTGCCACTGTGC3'
4.2(F)	1261-1283	5' AGATGTGCCACTGTGCCATTGCC 3'
4.3(R)	1296-1275	5' CCTGCTGCATGTTGGCAATGGC 3'
4.4(R)	1594-1568	5' TGAGTATATCCATCGTCCGGTGAGTCGC 3'
e.1(F)	1659-1685	5' AACTTGACCCCATGTGTTATCGAACGC 3'
f.1(F)	2168-2190	5' GGGTCCTGCTTCTGCTCCTGCTC 3'
f.2(R)	2366-2342	5' AGATCTTGGGGCGTATCTGCAATGC 3'
5.1(F)	2671-2692	5' TCGACGAGAGCTCCGATTGGGC 3'
5.2(R)	2833-2810	5' CGGACCATGCAGTAACCACGTTCCG 3'
6.1(F)	3093-3119	5' ACTACAGTGATGCCTATGTGGAGGGCG 3'
6.2(R)	2966-2944	5' CGTCGGGCATCTCTTCGATGGTG 3'
h.1(R)	3312-3292	5' TGCAAATTCAGCGGCGCGGTA 3'
7.1(F)	3457-3477	5' CACATCCTGCAGGGCAGCCGC 3'
j.1(R)	3904-3878	5' ATGATGATAGTCTTTTCAAATTTCTGC 3'

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador modelo Gene Amp PCR System 2400 de Perkin Elmer.

Las secuencias se obtuvieron utilizando el kit Thermo Sequenase™ dye terminator cycle sequencing pre-mix kit (Amersham) en un secuenciador automático ABI PRISM 377 (Perkin Elmer) de los Servicios Científico-técnicos de la Universidad de Barcelona.

Se buscó en las bases de datos mediante NCBI BLAST (Altschul y col. 1990) a través del BCM Search Launcher (Smith y col. 1996).

9. Tinción β -Galactosidasa

- Se diseccionan los discos imaginales y se fijan en glutaraldehído al 1% durante 5-10 minutos a temperatura ambiente.
- Se hacen 2 lavados de 5 minutos en PBS y se añaden 100 μ l de solución teñidora X-Gal (X-Gal al 8% en N,N'-dimetilformamida) precalentada a 37°C.
- Se incuban a 37°C en la oscuridad hasta el día siguiente.
- Se acaban de diseccionar los tejidos en PBS si es necesario.
- Se montan en glicerol:PBS o Bálsamo del Canadá.

10. Inmunohistoquímica sobre discos imaginales

- Se diseccionan los discos y se fijan en 4% paraformaldehído en PBS durante 20 minutos.
- Se hacen 2 lavados de 5 minutos en PBS.
- Se dejan los discos en metanol durante 5 segundos 3 veces.
- Se hacen 2 lavados de 5 minutos en PBS.

A partir de este punto se trabaja a 4°C.

- Se hacen 4 lavados en suero bloqueador (PBS + 0.3% Tritón X100 + 2% BSA).
- Se dejan los discos imaginales toda la noche en el anticuerpo primario diluido en suero bloqueador a la concentración adecuada para cada caso.
- Se hacen 3 lavados de 10 minutos en PBS + 0.3% Tritón X100.
- Se hace un lavado de 30 minutos en suero bloqueador.
- Se dejan los discos imaginales toda la noche en el anticuerpo secundario diluido a la concentración adecuada en suero bloqueador.
- Se hacen 3 lavados de 10 minutos en PBS + 0.3% Tritón X100.
- Se montan los discos en AntiFade (de Molecular Probes).

10.1. Listado de anticuerpos utilizados

Se han utilizado los siguientes anticuerpos primarios:

ANTICUERPO	DILUCIÓN DE TRABAJO
α - β -Galactosidasa (generado en conejo) (Cappel)	1:1000
α -Antennapedia (generado en ratón) (Condie y col. 1991)	1:500
α -Ultrabithorax (generado en ratón) (White y Wilcox 1984)	1:50
α -Engrailed (generado en ratón) (Patel y col. 1989)	1:5
α -Wingless (generado en ratón) (Brook y Cohen 1996)	1:10
α - Blistered (generado en rata) (Affolter y col. 1994)	1:300
α -Ventral veinless (generado en rata) (Llimargas y Casanova 1997)	1:400
α -Plexus (generado en conejo) (Matakatsu y col. 1999)	1:1000

Los anticuerpos secundarios tenían marcaje fluorescente y se obtuvieron de Jackson ImmunoResearch Laboratories.

Los tejidos teñidos se examinaron bajo un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiophot.

En el caso de clones generados en disco, los resultados se analizaron en secciones ópticas utilizando un microscopio confocal Leica Ar-Kr laser TCS-NT.

Las imágenes fueron procesadas con el programa Adobe Photoshop.

RESULTADOS

CAPÍTULO 1. Estudio de la colección de mutantes generados por la inserción de un elemento *P-lacW* en el cromosoma III de *Drosophila melanogaster*

1.1. Líneas letales en larva III

De un conjunto de 2368 líneas letales, semiletalas y viables se seleccionaron en primer lugar aquellas líneas que presentaban una fase de letalidad en el estadio de LIII (Tabla 1). Se analizaron un total de 168 líneas que se clasificaron según el fenotipo de sus discos imaginales centrándonos fundamentalmente en la morfología de los discos del ala, pata y halterio. En esta primera fase del estudio se descartaron 109 líneas, veintitrés porque su fase de letalidad era más temprana en el desarrollo y 86 líneas letales en larva III por presentar unos discos imaginales sin ninguna aberración morfológica aparente.

Al final de esta primera selección quedaban 59 líneas que presentaban diversas anomalías en sus discos imaginales que se clasificaron en función del tipo de discos que presentaban. En la clase I se incluyeron aquellas líneas que no presentaban discos (no visibles bajo la lupa) o eran extremadamente reducidos. En la clase II se incluyeron aquellas líneas que presentaban discos de un tamaño menor respecto a los discos salvajes. Y finalmente, en la clase III se clasificaron las líneas que presentaban unos discos imaginales de tamaño normal pero con una morfología aberrante.

Gracias a la presencia del gen bacteriano *lac-Z* en el elemento *P-lacW* que llevan insertado las líneas, se pudieron realizar tinciones β -Galactosidasa de estas 59 líneas para intentar estudiar los patrones de expresión de los genes mutados. Sin embargo, el resultado fue negativo en todas las líneas, no detectándose expresión en ningún caso.

Durante este proceso de clasificación 16 líneas fueron descartadas por presentar múltiples elementos *P-lacW* (información facilitada por el Dr. Deák) o por haber comprobado que el elemento *P-lacW* no era el responsable del fenotipo observado en las líneas mutantes. Además, tres líneas se descartaron por ser alelos de líneas

estudiadas. De este total de 19 líneas, trece se descartaron después de haberlas clasificado según la morfología de sus discos imaginales (Clase I: 1049/03; Clase II: 0470/03, 0526/06, 0793/11, 0833/11, 0943/15, 0979/07, 0991/05, 1060/06, 1074/13, 1475/08; Clase III: 0017/04, 0896/05) y 6 después de haber realizado el análisis clonal (Clase II: 0256/16, 0812/02; Clase III: 0184/05, 0277/07, 0573/06, 0573/11).

Las líneas 0184/05 y 0277/07, ambas alélicas de la línea 0139/04, presentaron un análisis clonal sin ningún fenotipo asociado. Las líneas que presentaron algún fenotipo anómalo al estudiar su análisis clonal fueron:

Línea 0256/16

El resultado del análisis clonal de la línea 0256/16 muestra que cuando los clones se localizan sobre las venas longitudinales se produce un incremento en el número de células que forman las mismas. Cuando el clon se localiza sobre una vena transversal ésta desaparece. El efecto sobre estos procesos de diferenciación es autónomo celular.

Debido al fenotipo obtenido en el estudio clonal se decidió realizar la escisión del elemento *P-lacW*. Con este experimento se pudo demostrar que el elemento *P-lacW* no era el responsable del fenotipo asociado a la línea ya que no se pudieron obtener revertientes viables. Por este motivo, se decidió abandonar el estudio de esta línea.

Líneas 0573/06 y 0573/11

El resultado del análisis clonal de ambas líneas muestra que la zona afectada por el clon queda reducida, provocando que la cara contraria sufra diversos pliegues debido a su mayor tamaño. En algunos casos también se observa la aparición de tejido de vena ectópico.

Debido a la sospecha que se trataba de líneas alélicas, se realizaron estudios de complementación que corroboraron esta hipótesis.

Al realizar la escisión del elemento *P-lacW* se obtuvieron revertientes viables, lo que nos hizo suponer que el elemento *P-lacW* era el responsable del fenotipo asociado a las líneas. Sin embargo, el Dr. Deák comprobó que dichas líneas presentaban 2 inserciones, una localizada en la posición 66E y la otra localizada en la posición 72B/C. Debido a la dificultad asociada a estas líneas se decidió finalizar su estudio en este punto.

Línea 0812/02

El resultado del análisis clonal de la línea 0812/02 muestra que los clones pueden agruparse en dos grandes bloques. Unos clones pequeños, de entre 20 y 30 células, sin fenotipo asociado y clones de mayor tamaño, donde se aprecia un incremento de la densidad celular, efecto que es autónomo celular.

Al analizar la escisión del elemento *P-lacW* no se obtuvieron revertientes viables, por lo que, al igual que con las líneas anteriores, se descartó su estudio posterior.

Los resultados obtenidos de las 40 líneas restantes, seleccionadas para continuar su estudio fueron los siguientes:

Clase I. De un total de 22 líneas se analizaron 9. Cuatro de ellas presentaron clones sin ningún fenotipo asociado y 5 no presentaron clones (Tabla 1).

Clase II. De un total de 9 líneas se estudiaron 7. Cinco de ellas presentaron clones normales y 2 no presentaron clones (Tabla 1).

Y finalmente de la clase III de un total de 9 líneas se analizaron 5, presentando todas ellas clones sin ningún fenotipo asociado (Tabla 1).

Nº TOTAL LÍNEAS 168	Letales tempranos 23	0187/17, 0259/13, 0455/19, 0455/24, 0480/13, 0481/16, 0592/13, 0600/06, 0608/04, 0693/07, 0730/15, 0738/10, 0809/06, 0826/09, 0927/08, 997/16, 1014/05, 1183/01, 1199/08, 1268/08, 1374/10, 1405/05, 1413/09		
	Discos normales 86	0018/13, 0020/01, 0036/12, 0050/42, 0079/02, 0089/31, 0127/19, 0183/01, 0222/41, 0225/64, 0239/31, 0247/15, 0276/14, 0282/06, 0284/04, 0291/20, 0323/01, 0428/24, 0458/31, 0479/16, 0496/11, 0501/01, 0505/15, 0510/10, 0514/06, 0530/18, 0545/07, 0545/15, 0545/16, 0554/01, 0557/02, 0576/06, 0602/03, 0604/14, 0608/07, 0621/05, 0630/03, 0633/04, 0643/18, 0657/11, 0661/05, 0669/04, 0673/04, 0678/14, 0681/11, 0697/01, 0730/02, 0737/04, 0758/07, 0768/07, 0843/07, 0845/07, 0845/12, 0850/09, 0864/05, 0891/06, 0916/04, 0955/01, 0967/13, 0993/12, 1002/09, 1029/08, 1039/01, 1039/10, 1039/14, 1044/15, 1055/09, 1060/06, 1075/05, 1126/09, 1131/05, 1132/08, 1152/14, 1208/13, 1227/09, 1262/06, 1309/11, 1323/04, 1348/02, 1352/07, 1382/10, 1412/07, 1424/11, 1440/15, 1442/01, 1489/06		
	Letales larva III 145	Líneas descartadas 19	Múltiples P/ 2ª mutación 16	0017/04, 0256/16, 0470/03, 0526/06, 0573/06, 0793/11, 0812/02, 0833/11, 0896/05, 0943/15, 0979/07, 0991/05, 1049/03, 1060/06, 1074/13, 1475/08
		Discos anormales 59	Alelos de líneas estudiadas 3	0184/5 (0139/04), 0277/07 (0139/04), 0573/11 (0573/06)
		Clase I (sin discos) 22	Clones sin fenotipo 4 0965/16, 1195/11, 1344/15, 1396/02 Sin clones 5 0248/38, 0571/15, 0965/07, 0973/01, 1005/02 Clones con fenotipo 0 No estudiado 13 0501/16, 0629/17, 0657/04, 0703/07, 0721/05, 0721/17, 0771/11, 0952/14, 1115/15, 1250/15, 1375/01, 1472/06, 1475/03	
		Análisis clonal 40	Clase II (discos pequeños) 9	Clones sin fenotipo 5 0448/23, 0936/14, 1035/15, 1168/07, 1391/01 Sin clones 2 0053/10, 0262/22 Clones con fenotipo 0 No estudiado 2 1037/07, 1415/05
		Clase III (discos anormales) 9	Clones sin fenotipo 5 0139/04, 0424/20, 0477/16, 0745/10, 1346/12 Sin clones 0 Clones con fenotipo 0 No estudiado 4 0177/02, 1207/07, 1235/08, 1266/02	

Tabla 1. Clasificación de las líneas letales en larva III según el fenotipo de sus discos imaginales y el estudio de su análisis clonal.

Los números entre paréntesis indican la línea de la cual son alelos las líneas descartadas.

1.2. Líneas letales en pupa

En una segunda fase se seleccionaron aquellas líneas que presentaban una fase de letalidad en el estadio de pupa (Tabla 2). Se analizaron un total de 135 líneas que se clasificaron según el fenotipo de sus discos imaginales y al igual que en el apartado anterior, el estudio se centró fundamentalmente en la morfología de los discos imaginales de ala, pata y halterio.

Del conjunto de las líneas, 98 fueron descartadas por presentar unos discos imaginales sin ninguna aberración morfológica aparente. La información facilitada por el Dr. Deák nos permitió descartar 22 líneas más por presentar múltiples elementos *P-lacW*.

Quedaban 15 líneas que fueron seleccionadas por la morfología anómala de sus discos imaginales. Doce de las líneas se clasificaron dentro de la clase II y 3 dentro de la clase III (0474/18, 0577/06 y 1448/01) (Tabla 2).

Debido a los resultados negativos obtenidos con el conjunto de letales en LIII, se decidió no profundizar en el estudio analizando el comportamiento clonal de estas líneas.

LETALES EN PUPA 135	Discos sin fenotipo 98	0110/27, 0275/06, 0277/13, 0280/02, 0281/08, 0281/14, 0284/16, 0285/10, 0293/09, 0299/10, 0316/19, 0343/05, 0353/13, 0363/02, 0377/07, 0381/07, 0390/03, 0394/05, 0423/02, 0428/06, 0444/02, 0458/26, 0483/01, 0491/05, 0500/02, 0500/06, 0500/16, 0505/01, 0510/17, 0550/15, 0556/02, 0580/01, 0595/09, 0613/08, 0621/11, 0621/18, 0624/19, 0666/07, 0670/03, 0674/04, 0685/10, 0714/03, 0716/15, 0727/01, 0735/02, 0770/08, 0807/07, 0829/01, 0840/14, 0853/01, 0872/17, 0890/04, 0915/10, 0920/06, 0927/12, 0960/03, 0982/02, 0989/10, 0998/12, 1003/03, 1017/10, 1024/09, 1024/12, 1029/10, 1037/12, 1127/11, 1131/11, 1131/12, 1134/10, 1158/06, 1164/15, 1178/09, 1185/07, 1310/05, 1319/02, 1322/14, 1323/06, 1323/09, 1323/12, 1336/03, 1336/10, 1338/09, 1361/10, 1386/06, 1388/15, 1391/16, 1422/12, 1426/07, 1452/11, 1466/04, 1469/01, 1473/10, 1474/02, 1474/06, 1474/10, 1478/01, 1478/04, 1482/09
	Discos anormales 15	0262/03, 0474/18, 0577/06, 0594/03, 0689/02, 0736/15, 0951/08, 0989/16, 1150/15, 1250/04, 1324/08, 1372/09, 1420/07, 1448/01, 1479/10
	Múltiples P/2^a mutación 22	0019/06, 0053/02, 0281/13, 0303/02, 0413/16, 0416/08, 0483/01, 0506/20, 0542/03, 0677/12, 0680/02, 0741/07, 0793/11, 0807/07, 0829/08, 1018/01, 1034/14, 1224/07, 1323/04, 1335/01, 1418/03, 1465/07

Tabla 2. Clasificación de las líneas letales en pupa según el fenotipo de sus discos imaginales.

1.3. Líneas semiletales y viables en adulto

En una tercera fase se seleccionaron aquellas líneas mutantes que eran semiletales o viables en homocigosis (Tabla 3). Se analizaron un total de 419 líneas. En este caso, el estudio se centró en la morfología del ala adulta.

En principio, del conjunto de las líneas se descartaron 328. Cuarenta y seis de ellas porque la fase de letalidad era anterior a la seleccionada, y las 282 líneas restantes fueron descartadas por presentar unas alas totalmente salvajes. Posteriormente 78 líneas más fueron descartadas por presentar múltiples elementos *P-lacW* (información facilitada por el Dr. Deák) o por haber comprobado que el elemento *P-lacW* no era el responsable del fenotipo observado en las líneas mutantes.

Finalmente se seleccionaron 13 líneas que presentaban unas alas con diversos fenotipos asociados:

0023/09: Aparición de tejido de vena ectópico.

0030/06: Problemas de adhesión entre las caras dorsal y ventral del ala (“blisterings”).

0283/04: Ala de tamaño reducido y con gran cantidad de tejido de vena ectópico.

0405/06: Alas que presentan pérdidas del margen de la zona posterior (“scalloping”).

0434/18: La vena transversal anterior no se forma correctamente.

0447/29: Problemas de adhesión entre las caras dorsal y ventral del ala y aparición de venas transversales ectópicas.

0447/38: Problemas de adhesión entre las caras dorsal y ventral del ala y aparición de venas transversales ectópicas.

0574/01: Alas que presentan pérdidas del margen de la zona posterior (“scalloping”).

0671/11: Desaparición de la parte más distal de la vena L5 y en ocasiones bifurcación de la vena transversal posterior.

0675/01: Desaparición completa de las quetas del *notum*.

0702/09: Bifurcación de la vena transversal anterior.

0836/03: Bifurcación de la vena transversal anterior.

1124/11: Aparición de venas transversales ectópicas.

De entre todas ellas se seleccionó la línea 1124/11 ó I(3)112411 que será en la que se centrará esta tesis.

Este mutante se seleccionó inicialmente por presentar un fenotipo en el ala que se caracteriza por la presencia de venas transversales ectópicas. Se comprobó que la línea sólo tenía un elemento *P-lacW* insertado en el genoma (información facilitada por el Dr. Deák) y además que éste era el responsable del fenotipo asociado (la pérdida del elemento *P-lacW* revertía la letalidad y el fenotipo asociado a la línea).

**LÍNEAS
SEMILETALES
Y VIABLES
419**

Alas sin fenotipo	0001/08, 0001/22, 0007/21, 0014/05, 0019/25, 0025/01, 0031/08, 0036/01, 0037/04, 0040/19, 0059/12, 0066/15, 0069/30, 0073/59, 0076/08, 0088/06, 0094/18, 0095/12, 0098/26, 0099/11, 0099/19, 0104/09, 0109/17, 0121/24, 0188/01, 0188/09, 0200/04, 0201/14, 0225/29, 0229/30, 0234/47, 0236/34, 0236/39, 0237/33, 0238/37, 0238/44, 0239/43, 0244/20, 0252/40, 0252/55, 0252/66, 0261/11, 0264/37, 0265/32, 0265/43, 0268/21, 0269/05, 0270/22, 0271/14, 0273/18, 0273/42, 0273/44, 0274/18, 0276/07, 0276/11, 0278/21, 0286/14, 0287/05, 0288/13, 0289/29, 0303/04, 0320/10, 0321/11, 0324/14, 0346/02, 0368/10, 0369/09, 0377/03, 0389/07, 0396/06, 0404/28, 0413/03, 0414/05, 0414/15, 0418/32, 0419/19, 0422/03, 0422/05, 0422/32, 0422/39, 0423/09, 0426/06, 0426/10, 0428/05, 0434/20, 0439/01, 0440/06, 0442/15, 0442/21, 0443/06, 0443/39, 0445/05, 0446/12, 0446/23, 0446/32, 0448/28, 0477/19, 0479/09, 0483/19, 0485/18, 0487/18, 0495/08, 0496/10, 0509/10, 0513/02, 0513/03, 0513/09, 0513/11, 0516/01, 0520/01, 0523/19, 0524/13, 0525/01, 0527/13, 0554/18, 0563/18, 0569/06, 0571/01, 0571/14, 0573/10, 0585/07, 0590/11, 0604/02, 0607/06, 0607/08, 0607/11, 0609/14, 0623/08, 0623/10, 0623/14, 0629/14, 0638/11, 0638/18, 0649/12, 0651/04, 0662/08, 0669/05, 0672/05, 0672/06, 0672/10, 0680/16, 0686/07, 0688/02, 0700/05, 0701/06, 0701/16, 0702/04, 0703/10, 0707/17, 0714/11, 0715/01, 0717/10, 0718/14, 0721/14, 0729/12, 0732/14, 0734/03, 0734/14, 0742/05, 0750/02, 0751/02, 0762/01, 0763/04, 0769/03, 0770/09, 0775/13, 0775/15, 0791/01, 0803/01, 0824/14, 0848/07, 0852/03, 0852/08, 0855/05, 0871/06, 0876/07, 0879/02, 0902/14, 0903/08, 0903/14, 0920/11, 0920/12, 0923/02, 0930/08, 0939/02, 0939/09, 0966/11, 0990/06, 0991/02, 1004/03, 1015/04, 1019/04, 1020/12, 1023/03, 1023/15, 1036/03, 1039/09, 1056/11, 1066/05, 1070/16, 1077/01, 1077/05, 1077/07, 1107/09, 1108/12, 1110/01, 1111/05, 1111/16, 1117/03, 1134/03, 1135/03, 1143/02, 1144/14, 1159/09, 1186/08, 1191/11, 1196/08, 1199/04, 1203/07, 1232/06, 1248/02, 1250/06, 1253/10, 1261/04, 1261/07, 1261/10, 1267/05, 1267/11, 1275/08, 1280/10, 1283/06, 1287/11, 1291/14, 1292/17, 1295/15, 1296/15, 1298/03, 1302/04, 1305/09, 1306/10, 1311/03, 1312/16, 1319/09, 1321/07, 1323/01, 1327/03, 1338/01, 1338/04, 1343/03, 1343/04, 1343/11, 1346/01, 1353/01, 1353/05, 1354/09, 1361/09, 1372/03, 1381/11, 1381/12, 1383/07, 1384/04, 1392/13, 1419/08, 1422/06, 1422/14, 1432/06, 1436/09, 1437/04, 1446/08, 1451/10, 1455/11, 1456/13, 1460/06, 1463/15, 1464/11, 1465/08, 1469/12, 1473/13, 1479/13, 1482/13, 1483/07, 1483/16
Alas anormales	0023/09, 0030/06, 0283/04, 0405/06, 0434/18, 0447/29, 0447/38, 0574/01, 0671/11, 0675/01, 0702/09, 0836/03, 1124/11
Múltiples P/ 2ª mutación	0014/07, 0019/01, 0024/05, 0038/31, 0050/05, 0081/31, 0101/02, 0110/01, 0222/31, 0229/05, 0234/34, 0244/21, 0245/35, 0264/09, 0273/02, 0274/03, 0364/01, 0379/01, 0396/05, 0424/05, 0425/32, 0444/37, 0471/17, 0474/31, 0475/23, 0484/12, 0492/05, 0492/15, 0492/17, 0499/06, 0502/17, 0580/04, 0582/09, 0596/13, 0597/05, 0604/04, 0613/18, 0632/07, 0652/08, 0653/03, 0717/05, 0718/06, 0726/13, 0730/06, 0746/06, 0755/15, 0759/02, 0770/11, 0787/09, 0805/03, 0837/10, 0876/02, 0958/08, 0981/05, 1049/13, 1084/06, 1084/08, 1106/10, 1120/14, 1179/13, 1185/02, 1196/07, 1219/10, 1250/11, 1258/01, 1261/13, 1278/16, 1314/04, 1338/07, 1380/06, 1381/07, 1393/08, 1407/13, 1419/14, 1444/05, 1445/07, 1472/07, 1479/12
Líneas descartadas	0003/06, 0040/21, 0040/24, 0046/23, 0077/08, 0106/18, 0110/04, 0110/41, 0114/06, 0183/10, 0241/51, 0255/07, 0264/20, 0264/30, 0335/13, 0341/07, 0379/13, 0420/08, 0422/02, 0422/38, 0424/12, 0426/22, 0442/05, 0446/01, 0482/19, 0529/04, 0585/13, 0613/01, 0715/02, 0747/06, 0749/13, 0751/01, 0755/12, 0772/13, 0785/14, 0904/05, 0989/01, 1190/16, 1207/10, 1233/04, 1243/10, 1274/16, 1310/10, 1344/08, 1357/10, 1457/01

Tabla 3. Clasificación de las líneas semiletales y viables en homocigosis según el fenotipo de sus alas.

CAPÍTULO 2. Caracterización fenotípica y molecular del mutante I(3)112411

La mutación en la línea I(3)112411 es recesiva. En heterocigosis las moscas se desarrollan perfectamente y no presentan ningún fenotipo asociado. En homocigosis la mutación no afecta al desarrollo larvario, los discos imaginales y el cerebro de larvas homocigotas para la línea I(3)112411 no presentan ninguna alteración grave, siendo su tamaño y su morfología equivalentes a los de unos discos imaginales salvajes. Las moscas homocigotas para la mutación eclosionan 2 días más tarde que los heterocigotas, viven entre 1 y 2 días, son estériles y presentan toda una serie de fenotipos asociados, que se localizan fundamentalmente en el ala, el halterio y la pata.

Se realizó un estudio de letalidad de esta línea, observándose que sólo un 38.1% de las pupas homocigotas eclosionan.

2.1. Fenotipo del mutante I(3)112411

2.1.1. Fenotipo en el ala del mutante I(3)112411

El ala del mutante I(3)112411 se caracteriza por la presencia de los siguientes fenotipos (Figura 11C,D):

- Aparición de venas transversales ectópicas.
- Reducción del tamaño del ala en comparación con la condición salvaje.
- Presencia en un 16.7% de los casos (10/60) de una pérdida parcial del margen posterior del ala, dando lugar a fenotipos similares a los presentes en mutantes para el gen *Notch*.
- Presencia en un 5% de los casos (3/60) de una transformación de la *sensilla campaniforme* a queta. En 2 de los casos la *sensilla campaniforme* transformada es la TSM1 (del inglés, "twin *sensilla* 1") y en el caso restante se produce la transformación de la *sensilla* ACV (*sensilla* de la vena transversal anterior).
- Presencia en un 48.3% de las alas (29/60) de un trazado irregular de la vena L2.

- Aparición de un engrosamiento de las venas L3 y L5.

En el mutante también se produce la pérdida de quetas del *notum*, en especial algunas de las 4 macroquetas del *scutellum*.

Los fenotipos de la línea I(3)112411 pueden clasificarse desde los más débiles, en los cuales no aparecen venas transversales supernumerarias pero sí los efectos en la vena L2 y/o las transformaciones de la *sensilla campaniforme*, hasta los fenotipos más extremos donde se presentan todos los fenotipos descritos a la vez.

Como se ha comentado en la introducción, un ala salvaje se caracteriza por la presencia de 2 venas transversales, la primera se localiza en el compartimento anterior y une las venas longitudinales L3 y L4 (“crossvein” anterior, cv-a) y la segunda se localiza en el compartimento posterior y une las venas longitudinales L4 y L5 (“crossvein” posterior, cv-p). La localización y número de las venas transversales presentes en las alas homocigotas de la línea I(3)112411, así como el porcentaje de alas incluido en cada categoría se presenta en la Tabla 4.

NÚMERO VENAS TRANSVERSALES		NÚMERO DE ALAS
COMP. A	COMP. P	
1	1	3 (5%)
1	2	7 (11.7%)
2	1	12 (20%)
2	2	17 (28.3%)
2	3	2 (3.3%)
3	1	11 (18.3%)
3	2	6 (10%)
4	1	1 (1.7%)
4	3	1 (1.7%)

Tabla 4. Localización y cuantificación de las venas transversales presentes en los compartimentos anterior y posterior de alas de homocigotos viables para la línea I(3)112411. A: anterior; P: posterior.

A partir de estos datos se calcula que la media de venas transversales por ala en el mutante I(3)112411 es de 3.8 (2.2 en el compartimento anterior y 1.6 en el posterior).

Una característica importante a tener en cuenta es que estas venas transversales ectópicas nunca se forman entre las venas L1 y L2 ó entre las venas L3 y L4. Es más, la formación de estas venas transversales extras tiene lugar en dos regiones específicas del ala. Una primera región se localiza en el compartimento anterior, en la zona proximal entre las venas L2 y L3. Y la segunda región se localiza en el compartimento posterior en la zona proximal existente entre las venas L4 y L5. En algunos de estos casos, se produce un incremento en la amplitud de la cv-p (Figura 11B).

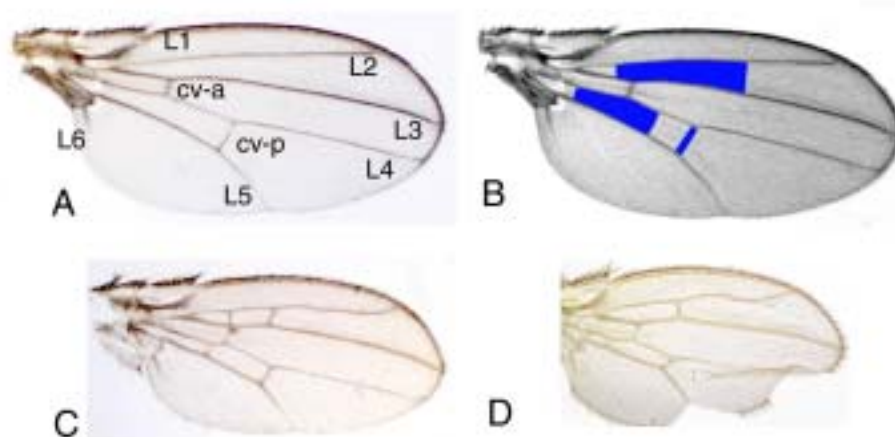


Figura 11. Alas adultas. **(A)** Ala salvaje mostrando la localización de las venas longitudinales L1-L6 y las venas transversales anterior (cv-a) y posterior (cv-p). **(B)** Mapa de las regiones donde se localizan las venas transversales ectópicas en el mutante l(3)112411. **(C)** Fenotipo débil de un ala homocigota l(3)112411. **(D)** Fenotipo extremo de un ala homocigota l(3)112411.

Debido a su organización planar las alas son un buen sistema modelo para estudiar defectos en el tamaño. Para caracterizar mejor la reducción observada en las alas homocigotas mutantes para l(3)112411 se realizó un estudio de cuantificación. Se midió el tamaño de los compartimentos anterior y posterior de alas de machos homocigotos mutantes y salvajes. Se realizaron mediciones de 33 alas homocigotas y 15 salvajes. Para ello se utilizó el programa de tratamiento de imágenes NIH. Las medias de los diferentes resultados obtenidos se presentan en la Tabla 5.

COMPARTIMENTO	CONTROL	HMZ. I(3)112411	EFEECTO
ANTERIOR	31743.3	22899.5	Reducción (27.9%)
POSTERIOR	34164.5	20106.2	Reducción (41.2%)
AREA TOTAL	65907.8	43005.7	Reducción (34.8%)

Tabla 5. Cuantificación del tamaño de los compartimentos del ala adulta. Las unidades son arbitrarias.

El siguiente paso consistió en analizar si esta disminución en el tamaño del ala iba asociado con una modificación en el número de células del ala. Para cuantificar el número de células se escogieron 2 zonas arbitrarias, una en el compartimento anterior y otra en el posterior. Se dibujó un cuadrado dentro de estas zonas y se contó el número de células. Como cada célula se caracteriza por la presencia de un tricoma, el contaje es tan sencillo como contar el número de tricomas en el área determinada. La localización exacta de estas dos zonas se indica en la Figura 12.

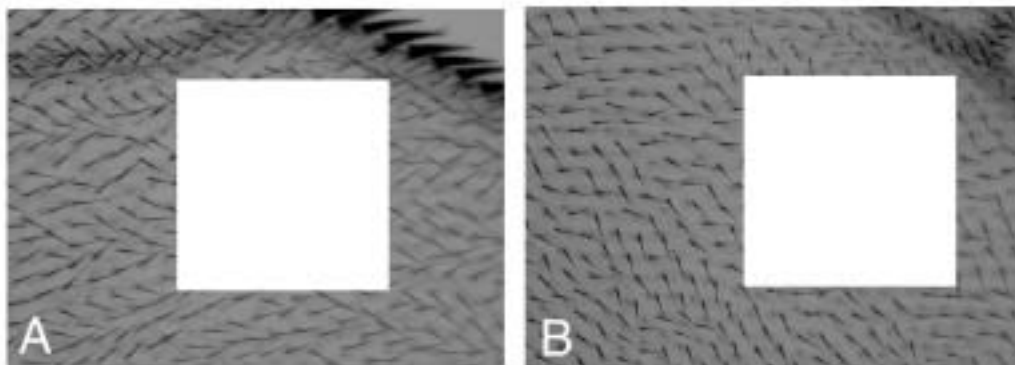


Figura 12. Ala adulta donde se localizan las zonas seleccionadas para realizar el recuento celular. **(A)** Área seleccionada en el compartimento anterior. **(B)** Área seleccionada en el compartimento posterior.

Se realizaron 10 contajes de cada caso y los datos obtenidos se resumen en la Tabla 6.

COMPARTIMENTO	SALVAJE	HMZ. I(3)112411	EFEECTO
ANTERIOR	85.3	74.7	Reducción (12.4%)
POSTERIOR	78.9	65.7	Reducción (16.7%)

Tabla 6. Resultado del recuento celular. Se indica el número de células promedio obtenido en los recuentos.

Se observa que el número de células presentes en la misma superficie es menor en las alas de moscas homocigotas mutantes que en las alas de moscas salvajes, lo que nos está indicando que las células son de mayor tamaño. Al igual que en el caso anterior, el efecto es más evidente en el compartimento posterior que en el anterior. Además durante el proceso de conteo se observó que en algunos casos, el tricoma que caracteriza a cada célula era múltiple en lugar de simple.

2.1.2. Fenotipo en el halterio y la pata del mutante I(3)112411

En individuos homocigotos para la línea I(3)112411 se detecta una transformación parcial del halterio a ala a muy baja frecuencia (< 0.5%).

Además, las moscas homocigotas mutantes presentan una transformación del primer segmento torácico en segundo segmento torácico. Esta transformación viene definida por una reducción (total o parcial) de los peines tarsales presentes en el primer par de patas de los machos (Figura 13).

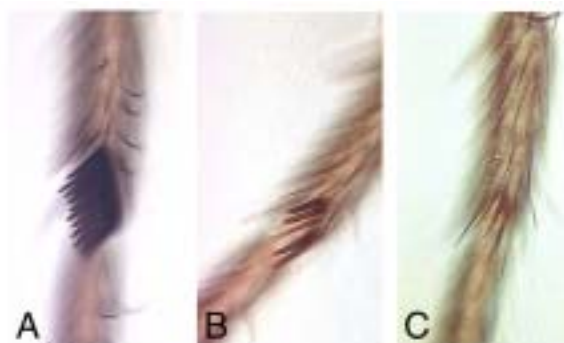


Figura 13. Transformaciones homeóticas presentes en el mutante I(3)112411. **(A)** Pata adulta del primer segmento torácico donde se aprecia el peine tarsal. **(B)** Reducción débil del peine tarsal en moscas homocigotas para I(3)112411. **(C)** Reducción extrema del peine tarsal en moscas homocigotas para I(3)112411.

2.2. El elemento *P-lacW* como responsable del fenotipo observado en el mutante I(3)112411. Generación de nuevos alelos

Gracias a la información facilitada por el Dr. Peter Deák, sabíamos que la línea I(3)112411 presentaba un único elemento *P-lacW* insertado en la posición 96A11-16. Para confirmar que esta inserción era la responsable del fenotipo mutante asociado a la línea I(3)112411 se realizó el protocolo de escisión del elemento *P-lacW*, que consiste en movilizar el transposón mediante la acción del enzima Transposasa ($\Delta 2-3$ en nuestro caso). De esta forma se obtienen dos tipos diferentes de moscas:

En un primer lugar se obtienen revertientes viables, es decir, moscas que presentan una morfología y viabilidad totalmente normal, indicando por tanto que la escisión precisa del *P-lacW* rescata todos los fenotipos asociados con la mutación. Se obtuvieron 15 escisiones precisas independientes, por lo que queda claramente confirmado que el transposón es la única causa del fenotipo asociado a la línea I(3)112411.

En segundo lugar se obtuvieron 3 líneas revertientes no viables, también conocidas como escisiones imprecisas, debidas a que los saltos del transposón no son siempre perfectos y pueden causar deleciones en el genoma.

2.3. Identificación del gen mutado en la línea I(3)112411

Para poder obtener las secuencias genómicas flanqueantes al elemento *P-lacW* e identificar así al gen afectado, utilizamos la técnica de rescate del plasmidio. La digestión del genoma con el enzima *Bam HI* permitió clonar un fragmento de ADN genómico flanqueante al extremo 5' del transposón de aproximadamente 7 Kb y con el enzima *Eco RI* se clonó un fragmento de unas 10 Kb.

Mediante la secuenciación directa a partir de cebadores específicos del elemento *P-lacW* se pudo descubrir que el elemento *P-lacW* se encuentra insertado en un intrón del gen *absent, small or homeotic discs-2 (ash-2)*, un miembro del grupo *trithorax*.

El gen *ash-2* había sido descrito previamente por el Dr. Shearn como un gen formado por 6 exones y con unos intrones de un tamaño que oscilaba entre 60 y 800 pares de bases. El transcrito codificado por el gen *ash-2* consistiría en 1959

nucleótidos que codificarían para una proteína de 572 aminoácidos con un peso molecular predicho de 64.8 KDa (Adamson y Shearn 1996).

Nosotros secuenciamos el gen completo, así como las regiones más a 5' y más a 3' de *ash-2* (Figura 27, Apéndice) descubriendo la existencia de varias diferencias. A partir de la secuencia genómica se deduce que el gen *ash-2* está constituido por 8 exones y 7 intrones. El elemento *P-lacW* se encuentra insertado en el cuarto intrón, que se corresponde con el intrón de mayor tamaño presente en este gen. El esquema del gen *ash-2* se presenta en la Figura 14.

A efectos de nomenclatura, las 3 escisiones imprecisas obtenidas se denominaron *ash-2¹*, *ash-2²* y *ash-2³*.

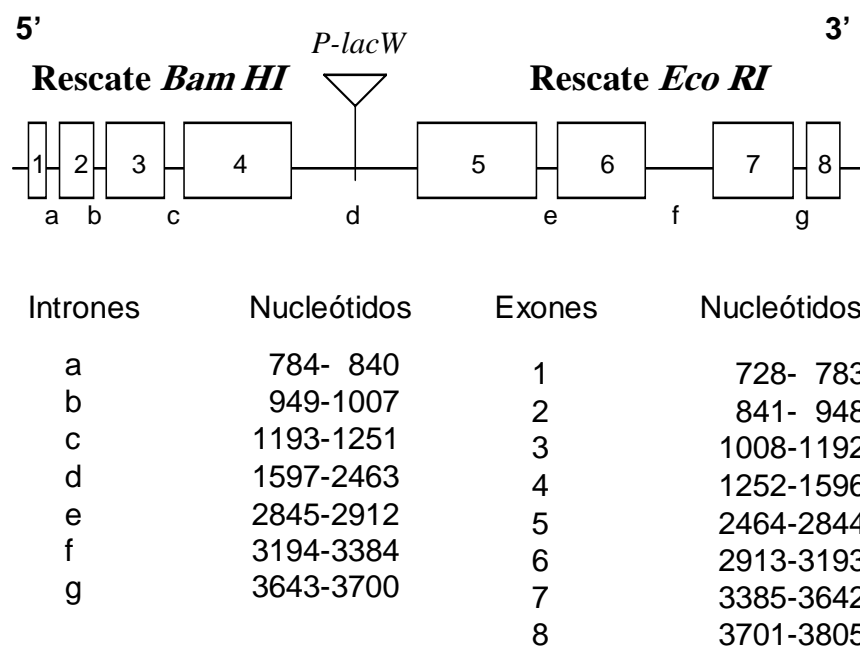


Figura 14. Esquema del gen *ash-2* y localización del punto de inserción del elemento *P-lacW* en el cuarto intrón (entre los nucleótidos 1779 y 1780).

2.3.1. Caracterización fenotípica de los alelos *ash-2¹*, *ash-2²* y *ash-2³*

El alelo *ash-2¹* se caracteriza por ser letal en el estadio de pupa temprana, mientras que los alelos *ash-2²* y *ash-2³* son semiletal. En el caso del alelo *ash-2¹* nunca aparecen homocigotos adultos viables.

Como ya ocurría con la línea I(3)112411, los alelos *ash-2^{l2}* y *ash-2^{l3}* presentan unos discos imaginales y un cerebro sin ninguna alteración aparente. Por el contrario, los discos de la línea *ash-2^{l1}* presentan diversas alteraciones morfológicas así como una reducción en su tamaño.

Se realizaron estudios de letalidad de los alelos *ash-2^{l2}* y *ash-2^{l3}*, observándose que los porcentajes de pupas homocigotas que eclosionan son del 81.4% y 52.3% respectivamente. Ambos alelos se caracterizan por la presencia de venas transversales ectópicas, que se localizan entre las venas L2-L3 y L4-L5. Los mutantes homocigotas para *ash-2^{l2}* tienen en promedio 2.5 venas transversales por ala, y los mutantes *ash-2^{l3}* un promedio de 3.1.

Los porcentajes de transformación de *sensilla campaniforme* a queta, son para *ash-2^{l2}* y *ash-2^{l3}* de un 11.2 y un 8.3% respectivamente.

En el caso de la vena L2, un 1.7% de las alas homocigotas *ash-2^{l2}* presentan algún tipo de efecto, mientras que este porcentaje se eleva hasta el 21.7% en el caso de los homocigotas *ash-2^{l3}*. Y sólo en un 1.7% de los homocigotas para *ash-2^{l3}* se produce la pérdida de parte del margen posterior del ala.

2.3.2. Estudios de interacción entre los alelos I(3)112411, *ash-2^{l1}*, *ash-2^{l2}* y *ash-2^{l3}*

Se realizaron estudios de interacción entre los 3 alelos generados tras la escisión del elemento *P-lacW* (*ash-2^{l1}*, *ash-2^{l2}*, *ash-2^{l3}*) y la línea original I(3)112411. De esta forma pudo comprobarse que el alelo más extremo era *ash-2^{l1}*. Así, la combinación I(3)112411 / *ash-2^{l1}* es letal en un estadio pupal temprano, presentando sólo un 0.37% de moscas hemizigotas viables (Figura 15B). De manera equivalente se dedujo que el alelo *ash-2^{l3}* es más extremo que el alelo *ash-2^{l2}*.



Figura 15. Alas adultas. **(A)** Ala salvaje. **(B)** Combinación I(3)112411 / *ash-2^{l1}*.

Para el resto del trabajo se utilizó el alelo I(3)112411 como alelo hipomorfo y el alelo *ash-2^{l1}* como alelo extremo.

2.3.3. Estudios de interacción con alelos de ganancia de función de *Antennapedia*

Para diferentes alelos de *ash-2* se han descrito fenotipos asociados con la transformación de la antena a pata. Debido a que estas transformaciones son similares a las causadas por mutaciones de ganancia de función del gen homeótico *Antennapedia*, se estudió si los alelos de *ash-2* afectaban la transformación de antena a pata causada por los alelos de ganancia de función de *Antennapedia*, *Antp^{Ns}* (alelo *Nasobemia*) y *Antp^{73b}*, utilizándose como un criterio de clasificación (Adamson y Shearn 1996). Los fenotipos asociados a estos alelos se deben a una acumulación ectópica de *Antennapedia* en la zona que dará lugar a la antena en el disco imaginal de ojo-antena (Talbert y Garber 1994). Esta pata ectópica que aparece se caracteriza porque no presenta el peine tarsal en los machos, y por el patrón de quetas se deduce que se trata de la pata correspondiente al segundo segmento torácico (Struhl 1981).

Para comprobar si nuestros alelos se comportaban como los alelos de *ash-2* descritos hasta el momento, examinamos el efecto de nuestros alelos sobre estos alelos de ganancia de función de *Antp*. Ninguno de los dos alelos testados (I(3)112411 y *ash-2^{l1}*) afectaron la expresividad o penetrancia de la transformación parcial de antena a pata del alelo *Antp^{73b}* en los dobles heterocigotos *Antp^{73b} / I(3)112411* ó *Antp^{73b} / ash-2^{l1}*. Sin embargo, las combinaciones dobles heterocigotas para nuestros dos alelos y *Antp^{Ns}* presentaron un incremento en el fenotipo asociado a este alelo de ganancia de función. Este incremento es mucho más evidente en la combinación con el alelo *ash-2^{l1}* (Figura 16D). Mientras que la transformación de la antena a pata de las moscas *Antp^{Ns} / +* no suele ser completa (Figura 16B), la combinación *Antp^{Ns} / ash-2^{l1}* da lugar en la mayoría de los casos a una transformación completa, detectable porque en las estructuras transformadas aparecen los elementos más distales, es decir, los garfios de las patas.

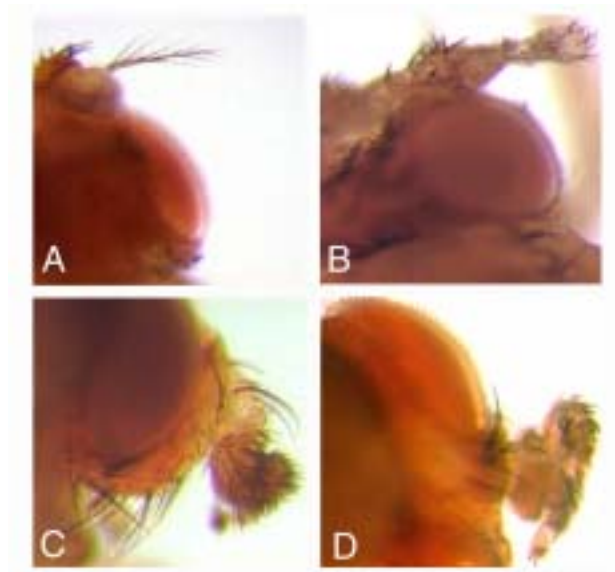


Figura 16. Interacciones genéticas entre el alelo de ganancia de función de *Antennapedia*, $Antp^{Ns}$ y *ash-2*. **(A)** Antena salvaje. **(B)** Transformación de la antena en moscas $Antp^{Ns} / +$. **(C)** $Antp^{Ns} / l(3)112411$. **(D)** $Antp^{Ns} / ash-2^{l1}$.

2.4. Generación de mosaicos genéticos

2.4.1. Mosaicos genéticos en el ala

La aparición de venas transversales ectópicas en el alelo l(3)112411 así como en las combinaciones viables de los alelos $ash-2^{l1}$, $ash-2^{l2}$ y $ash-2^{l3}$ sugiere un papel del gen en el proceso de formación y refinamiento del patrón vena-intervena en el ala. Para entender mejor los efectos de la pérdida de función del gen mutado en nuestras líneas, generamos clones del alelo letal en pupa $ash-2^{l1}$ marcados con *forked* mediante recombinación mitótica inducida por rayos X. Utilizamos la técnica *Minute* que permite el crecimiento de clones que cubren grandes territorios (las células *Minute*⁺ homocigotas para el alelo $ash-2^{l1}$ crecen en un fondo heterocigoto *Minute*) (Figura 17).

Las alas que presentan clones de gran tamaño (que abarcan territorios de vena e intervena) están totalmente distorsionadas. Estos clones de células mutantes para $ash-2^{l1}$ reducen drásticamente las regiones de intervena. En clones tempranos que

cruzan la frontera dorso-ventral, ambas regiones, la dorsal y la ventral están reducidas. En clones que se localizan en la cara dorsal o en la ventral, la zona mutante está reducida mientras que la cara opuesta presenta una forma abombada.

Cuando el clon se localiza sobre venas, las ensancha. La corrugación de estas venas es la correcta y lo que se produce es un severo incremento del tejido que forma la vena en el misma superficie donde se localiza el clon. Las venas se ensanchan con excepción de la vena L4, la cual a pesar de tener un clon que se localice en la cara de corrugación de la vena, no se ve alterada, o el efecto es muy suave y siempre en la zona cercana a la vena transversal posterior.

Los clones que cruzan la frontera dorso-ventral disrupcionan la morfología de las células del borde. Se observa una reordenación anómala de los tricomas del margen del ala y hay tricomas que no se desarrollan.

Al igual que ya se había observado para los homocigotos viables I(3)112411, los tricomas de muchas de las células que constituyen el clon de células mutantes homocigotas para *ash-2¹* son múltiples.

En los clones de *ash-2¹* también se observan efectos no autónomos celulares. Se observa que células heterocigotas adyacentes a los clones se transforman en tejido de vena ectópico. Así, los clones que se localizan cerca de las venas diferencian tejido de vena, y una porción de células salvajes se desarrolla como vena como continuidad. En estos casos, el tejido de vena no autónomo conecta con el autónomo.

Cuando los clones se localizan en la región de intervena comprendida entre las venas L3 y L4 no se forma nunca tejido de vena ectópico y no se produce una reducción del área.

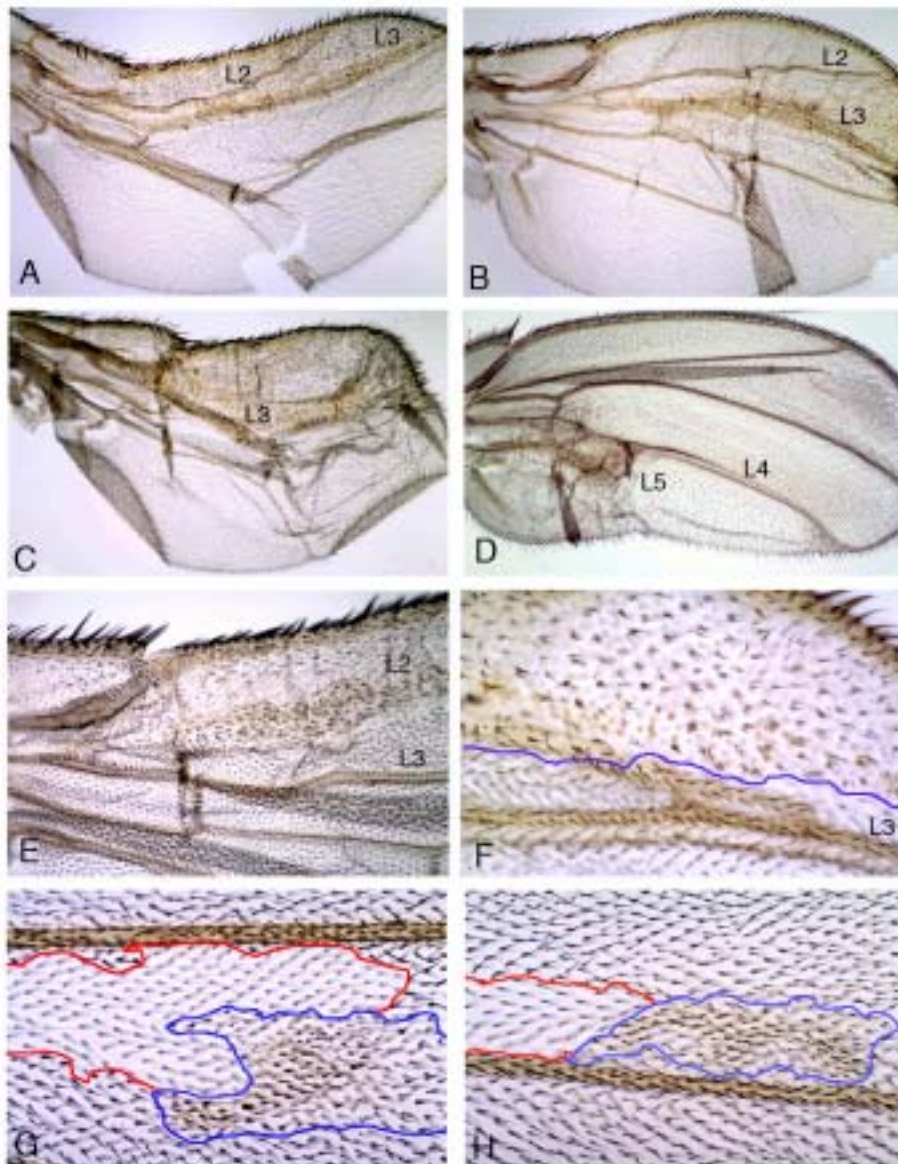


Figura 17. Análisis clonal del alelo *ash-2¹* en alas adultas. **(A)** Clon anterior *Minute⁺ ash-2¹* que cruza el margen dorsoventral del ala. **(B)** Clon dorsal *Minute⁺ ash-2¹* que discurre sobre la vena L3 y parte de la zona de intervena comprendida entre las venas L2 y L3. **(C)** Vista dorsal de un clon *Minute⁺ ash-2¹* que se localiza sobre la vena L3 y que cruza el margen dorsoventral del ala. **(D)** Clon posterior *Minute⁺ ash-2¹* que se localiza sobre la vena L5 y la región de intervena entre la vena L4 y el margen posterior del ala. Notar que la vena L4 no está afectada. **(E)** Ampliación de un clon anterior y ventral *Minute⁺ ash-2¹* que se localiza sobre la vena L2 y la zona de intervena comprendida entre la vena L1 y L2. **(F)** Clon *Minute⁺ ash-2¹* que presenta tejido de vena ectópico autónomo y no autónomo. La línea azul separa el clon de las células salvajes. **(G,H)** Clones gemelos. El contorno del clon *ash-2¹* está marcado con la línea azul y el clon control con la roja. Notar como el tejido de vena ectópico en **(H)** trata de alcanzar la vena salvaje.

Los clones se indujeron en 2 estadios del desarrollo, a las 60 ± 12 y 80 ± 12 horas tras la puesta del huevo. El porcentaje de clones que se obtienen a 60 ± 12 horas es de un 4.9% (16 clones / 327 alas) y a 80 ± 12 horas el porcentaje es de un 8.9% (40 clones / 451 alas). En el caso de clones inducidos en moscas salvajes, estos porcentajes son de un 10.1% a 60 ± 12 horas y de un 16.2% a 80 ± 12 horas. El resumen de los resultados obtenidos se presenta en la Tabla 7.

CLONES <i>ash-2¹</i>					
60 \pm 12 horas			80 \pm 12 horas		
CLONES A	Dorsal	13 (81.3%)	CLONES A	Dorsal	19 (73.1%)
	Ventral	3 (18.7%)		Ventral	7 (26.9%)
CLONES P	Dorsal	2 (100%)	CLONES P	Dorsal	9 (64.3%)
	Ventral	-		Ventral	5 (35.7%)

Tabla 7. Distribución de los clones de la línea *ash-2¹* a las 60 ± 12 horas y 80 ± 12 horas tras la puesta del huevo. A: anterior, P: posterior.

Debido a la dificultad para cuantificar los efectos producidos por los clones del alelo *ash-2¹* se decidió estudiar el comportamiento clonal del alelo I(3)112411. De manera equivalente al alelo *ash-2¹*, los clones fueron inducidos a las 60 ± 12 y 80 ± 12 horas tras la puesta del huevo. El porcentaje de clones obtenido a las 60 ± 12 horas es de un 4.9% (16 clones / 329 alas) y a 80 ± 12 horas el porcentaje es del 6.1% (39 clones / 643 alas). El resumen de los resultados se presenta en la Tabla 8.

CLONES I(3)112411					
60 \pm 12 horas			80 \pm 12 horas		
CLONES A	Dorsal	4 (30.8%)	CLONES A	Dorsal	20 (74.1%)
	Ventral	9 (69.2%)		Ventral	7 (25.9%)
CLONES P	Dorsal	3 (50%)	CLONES P	Dorsal	10 (66.7%)
	Ventral	3 (50%)		Ventral	5 (33.3%)

Tabla 8. Distribución de los clones de la línea I(3)112411 a las 60 ± 12 horas y 80 ± 12 horas tras la puesta del huevo. A: anterior, P: posterior.

Para cuantificar los efectos producidos por los clones de este alelo se midió el tamaño de los compartimentos anterior y posterior de alas de machos donde se habían inducido clones de células homocigotas para I(3)112411 y se compararon con las mediciones de alas salvajes. Sólo se detectó una reducción en el tamaño del compartimento cuando el clon se localiza en el compartimento posterior. Y en todos los casos, el compartimento contrario a donde se localiza el clon permanece inalterado, lo que sugiere que el tamaño final del órgano se ve modificado. Los clones del alelo *ash-2¹* provocan una reducción en el tamaño del compartimento sin embargo, en este caso no fue posible la cuantificación debido a la distorsión general que se genera en toda el ala.

A continuación se cuantificó el número de células presentes en las mismas zonas que definimos en el apartado 2.1.1. (Figura 12). Se comprobó que el número de células presentes en la misma superficie es menor en las alas donde se localizan los clones mutantes para I(3)112411 que en los controles. Esta reducción en el número de células es mucho mayor en el compartimento posterior (36%) que en el anterior (13.6%).

Al igual que durante el proceso de recuento realizado con las alas homocigotas para I(3)112411, se detectó que en algunos casos los tricomas que caracterizan a cada célula eran múltiples en lugar de simples.

Para comprobar la posible distribución asimétrica de los clones intuida a partir de los resultados presentados (Tablas 7 y 8), se realizó un análisis de clones gemelos, de manera que se comparó el comportamiento de células homocigotas mutantes para *ash-2¹* (marcadas con *forked*) con las células hermanas salvajes (marcadas con *bold*). Ambos clones se generan en el mismo evento de recombinación. Las larvas fueron irradiadas a las 72 ± 12 horas tras la puesta del huevo. La recombinación mitótica fue inducida por rayos X y se analizaron un total de 33 clones.

Los clones mutantes para *ash-2¹* presentan la diferenciación de tejido de intervena a vena cuando los clones se localizan cerca de una vena. Este fenotipo se deduce por el tamaño y por la pigmentación más oscura de las células que conforman el clon. Este tejido de vena ectópico que conecta con las venas longitudinales se asemeja a venas transversales ectópicas (Figura 17G,H).

A partir de los datos presentados en las Tablas 9 y 10 se deduce la existencia de una distribución asimétrica de los clones mutantes. Además, los clones mutantes presentan en promedio, menos células que los clones controles.

CLONES CONTROL		
ANTERIORES 18 (57.6%)	DORSALES	8 (42.1%)
	VENTRALES	10 (57.9%)
POSTERIORES 15 (42.4%)	DORSALES	9 (57.1%)
	VENTRALES	6 (42.9%)

CLONES <i>ash-2¹</i>		
ANTERIORES 12 (60.0%)	DORSALES	6 (50.0%)
	VENTRALES	6 (50.0%)
POSTERIORES 8 (40.0%)	DORSALES	7 (85.7%)
	VENTRALES	1 (14.3%)

Tabla 9. Distribución de los clones de la línea *ash-2¹* así como sus clones gemelos (formados por células salvajes) a las 72 ± 12 horas tras la puesta del huevo.

En la Tabla 10 se presenta la distribución y el contaje del número de células de los clones de *ash-2¹* y sus clones gemelos. Para analizar de manera más eficiente los resultados, los 33 clones estudiados se clasificaron en 3 grupos. En el grupo A se engloban los clones gemelos en los que el número de células del clon control es equivalente al número de células del clon mutante. En el grupo B se incluyen los clones gemelos en los que el clon control tiene aproximadamente el doble de células que el clon mutante y en el grupo C se incluyen los clones gemelos en los que el clon mutante está formado por un número de células igual o cercano a cero. La localización sobre el ala de todos estos clones se presenta en la Figura 18.

	A y D	A y V	P y D	P y V
GRUPO A	36-37	110-104	50-40	
	25-27	42-44	55-57	
	60-58	140-129	79-77	
	71-72	61-69		
		25-24		
GRUPO B	25-10	25-12	77-42	103-52
	115-53		106-58	
			51-30	
			79-35	
GRUPO C	50-10	188-30	39-0	107-0
	85-9	31-0	105-0	79-0
		30-0		23-0
		27-0		166-10
				30-0

Tabla 10. Localización y recuento del número de células de los clones de la línea *ash-2¹¹* así como sus clones gemelos (formados por células salvajes) a las 72 ± 12 horas tras la puesta del huevo. El primer número indica el número de células del clon control y el segundo número indica el número de células del clon mutante. En el grupo A se engloban los clones gemelos en los que el número de células del clon control es equivalente al número de células del clon mutante. En el grupo B se incluyen los clones gemelos en los que el clon control tiene aproximadamente el doble de células que el clon mutante y en el grupo C se incluyen los clones gemelos en los que el clon mutante está formado por un número de células igual o cercano a cero.

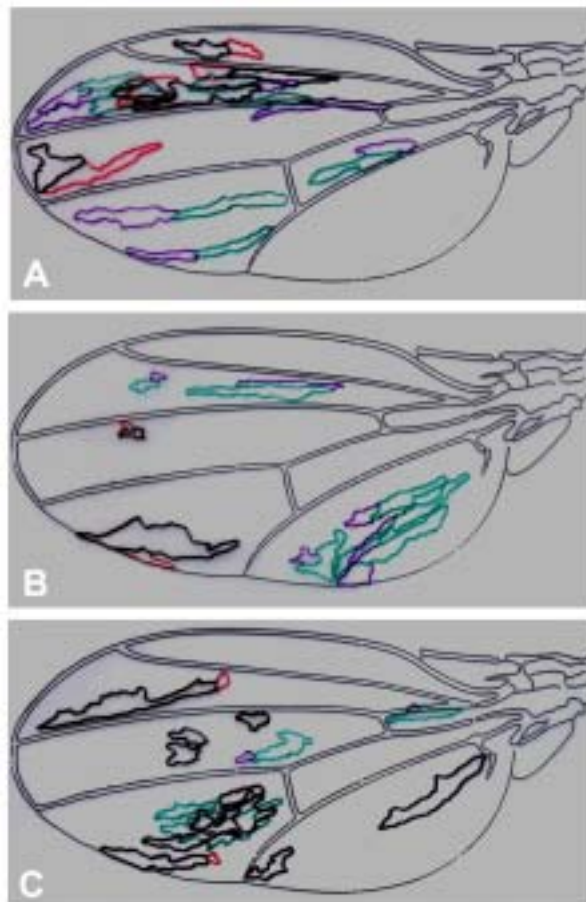


Figura 18. Distribución de los clones de la línea *ash-2^l* así como sus clones gemelos (formados por células salvajes) a las 72 ± 12 horas tras la puesta del huevo. Color negro: clon control ventral. Color rojo: clon mutante ventral. Color verde: Clon control dorsal. Clon lila: clon mutante ventral. **(A)** Localización de los clones del grupo A. **(B)** Localización de los clones del grupo B. **(C)** Localización de los clones del grupo C.

En la Figura 18 se aprecia claramente que los clones mutantes sobreviven cuando se localizan en el compartimento anterior. Sin embargo, cuando los clones se localizan en el compartimento posterior, la supervivencia de los clones ventrales es muy baja.

2.4.2. Mosaicos genéticos en la pata

Debido a los fenotipos descritos en las patas de mutantes *ash-2*, como son la aparición de zonas de sobrecrecimiento con la consiguiente formación de pequeñas

patas supernumerarias, decidimos estudiar los efectos asociados a la generación de clones del alelo *ash-2¹* en pata. Los clones están marcados con *forked* y la recombinación mitótica fue inducida por rayos X. Al igual que con los mosaicos generados en el ala, utilizamos la técnica *Minute*.

En los clones que se localizan sobre los peines tarsales de las patas del primer segmento torácico, éstos desaparecen total o parcialmente (Figura 19B).

Cuando los clones son de un tamaño considerable, se detecta una reducción en la longitud y un incremento en la amplitud de las extremidades (Figura 19C).

También se detectaron anomalías en las articulaciones presentes entre los diferentes segmentos de las patas, produciéndose en los casos más extremos la fusión de varios de estos segmentos (Figura 19D).

En ningún caso se detectó la aparición de zonas de sobrecrecimiento o la aparición de patas ectópicas.

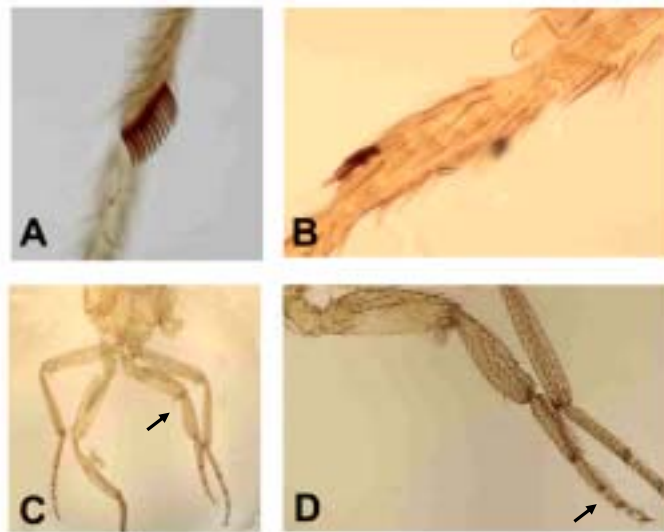


Figura 19. Análisis clonal del alelo *ash-2¹* en patas adultas. **(A)** Pata salvaje del primer segmento torácico donde se aprecia el peine tarsal. **(B)** Clon *Minute⁺ ash-2¹* donde se aprecia la pérdida parcial del peine tarsal. **(C)** Clon *Minute⁺ ash-2¹* que muestra como la presencia de un clon de gran tamaño provoca la distorsión en la longitud y amplitud de la pata. **(D)** Clon *Minute⁺ ash-2¹* que presenta la fusión de varios segmentos de la pata. La flecha indica la pata donde se localiza el clon.

2.5. Estudio funcional del gen *ash-2*

2.5.1. Patrón de expresión del gen *ash-2*

El patrón de expresión del gen *ash-2* ha sido descrito previamente. La proteína Ash-2 se acumula de manera uniforme en los discos imaginales así como en los núcleos de las glándulas salivares y las células del cuerpo graso. No se detecta proteína en el sistema nervioso central (Adamson y Shearn 1996).

Gracias a la presencia del gen *lac-Z* en el elemento *P-lacW* que lleva insertado la línea I(3)112411 en su genoma, nos fue posible detectar el patrón de expresión del gen *ash-2* en nuestro fondo mutante, mediante un experimento de inmunohistoquímica. De esta forma pudimos comprobar que los individuos heterocigotos (I(3)112411 / TM6C) presentaban un patrón de expresión equivalente al descrito, mientras que en los individuos homocigotos (I(3)112411 / I(3)112411) se detectaba una disminución en la acumulación de la proteína Ash-2, patrón de expresión que confirma el carácter hipomorfo de nuestro alelo.

2.5.2. Estudios de expresión en discos imaginales

Debido a las transformaciones homeóticas presentes en el mutante I(3)112411 creímos conveniente estudiar el patrón de expresión de *Antennapedia* y de *Ultrabithorax* (como representantes de los complejos *ANTP* y *BX* respectivamente) en nuestros fondos mutantes.

El patrón de *Antennapedia* se caracteriza por una expresión localizada a lo largo del margen anterior del disco de ala, así como en la presuntiva zona del *notum* donde la expresión es más intensa. *Antp* también se expresa de forma ubicua en el disco imaginal de pata, siendo la expresión más intensa en las zonas más distales del disco (Condie y col. 1991). El patrón de *Antp* en la línea I(3)112411 no está alterado, mientras que en discos de alas homocigotas para el alelo *ash-2¹¹* *Antp* se localiza en zonas del disco imaginal de ala donde no lo hace normalmente. En ningún caso se detectan patrones de expresión ectópicos en otros discos imaginales (Figura 20).

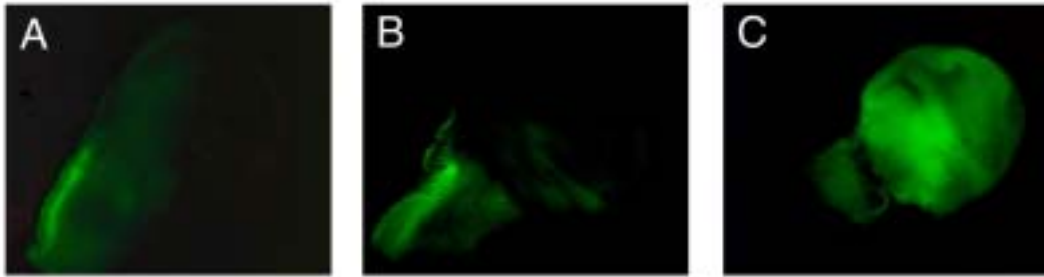


Figura 20. Patrón de expresión de *Antp* en discos imaginales de ala. **(A)** Expresión en un fondo salvaje. **(B)** Expresión en un fondo I(3)112411 / I(3)112411. **(C)** Expresión en un fondo *ash-2¹ / ash-2¹*.

El gen *Ultrabithorax* se expresa de forma ubicua en el disco de pata correspondiente al tercer segmento torácico y en el halterio (siendo la expresión mayor en la zona posterior que en la anterior) (White y Wilcox 1984). Al igual que pasaba con *Antp*, en la línea I(3)112411 no se observa ninguna alteración en el patrón de expresión de *Ubx*. En cambio, en el alelo *ash-2¹* se detecta una disminución en los niveles de expresión de *Ubx* en discos homocigotos, tanto de halterio como de pata, siendo el efecto mucho más pronunciado en éste último (Figura 21).

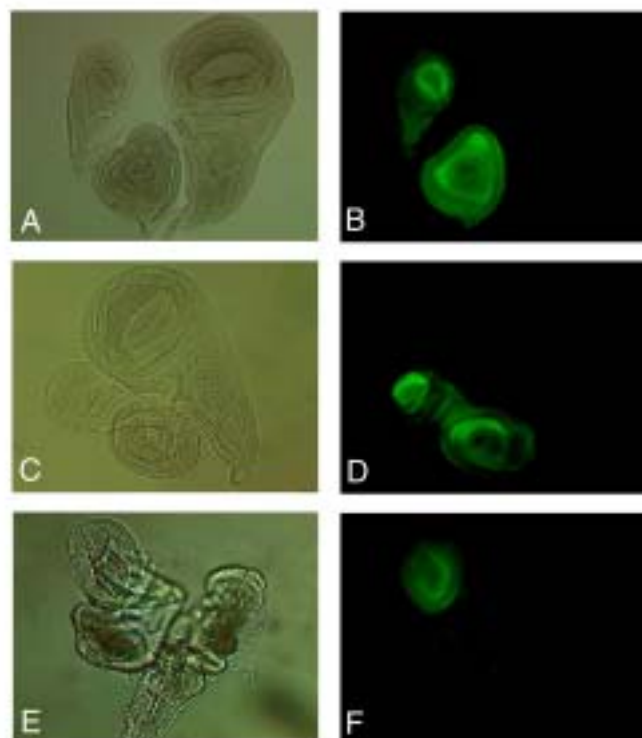


Figura 21. Patrón de expresión de *Ubx*. **(A,C,E)** Discos imaginales salvajes, homocigotos para l(3)112411 y homocigotos para *ash-2*¹ respectivamente. **(B,D,F)** Patrón de expresión en un fondo salvaje, homocigoto para l(3)112411 y homocigoto para *ash-2*¹ respectivamente.

Como nuestros alelos presentan un efecto mucho más acusado en el compartimento posterior que en el anterior y debido a los efectos detectados en el borde dorso-ventral del ala, decidimos estudiar los patrones de expresión de *engrailed* y *wingless* en nuestros fondos mutantes. *Engrailed* es un factor de transcripción con homeodominio que se expresa en los compartimentos posteriores de los discos imaginales (Patel y col. 1989), mientras que *Wingless* es una proteína de señalización que se secreta, por lo que su localización es tanto extracelular como citoplasmática. En el estadio de larva III la expresión de *wg* se localiza a lo largo del límite dorso-ventral del disco imaginal del ala (Brook y Cohen 1996). Los patrones de expresión tanto de *engrailed* como de *wingless* en fondos mutantes homocigotos para l(3)112411 y *ash-2*¹ son totalmente comparables al patrón salvaje, no detectándose ninguna diferencia apreciable.

Plexus es una proteína que forma parte de la matriz nuclear y se localiza de manera ubicua en los discos imaginales de larva III. En el disco imaginal del ala, no se detectan diferencias en su localización en los presuntivos territorios de vena e intervena, por lo que su expresión no parece interferir con la diferenciación de las venas en sus posiciones normales (Matakatsu y col. 1999). Para determinar si *ash-2* es necesario para la activación transcripcional de *plexus* comprobamos el patrón de expresión de *plexus* en fondos homocigotos mutantes para los alelos I(3)112411 y *ash-2¹*. En ambos casos, el patrón de expresión de *px* es totalmente equiparable a un disco salvaje.

2.5.3. Estudios de expresión en alas pupales

Debido al patrón de venación alterado presente en las alas adultas para el alelo I(3)112411 decidimos caracterizar los patrones de expresión de marcadores moleculares de las regiones de vena e intervena. Para ello utilizamos 2 genes: *blistered* y *ventral veinless*.

Blistered (Bs) es un factor de transcripción homólogo al *Serum Response Factor* de mamíferos que se expresa en las presuntivas regiones de intervena en discos imaginales del ala del estadio de larva III y en alas pupales (Fristrom y col. 1994). En la Figura 22A puede observarse el patrón salvaje en un ala pupal. En alas pupales homocigotas para I(3)112411 se detecta un patrón de expresión de *bs* alterado, apreciándose como en las zonas donde se localizarán las futuras venas transversales ectópicas *bs* desaparece (Figura 22B,C).

A continuación caracterizamos el patrón de expresión de *ventral veinless* (*vvf*), un factor de transcripción que durante el desarrollo se requiere para la proliferación y la diferenciación de las venas. *Vvf* se localiza en las presuntivas venas en las alas pupales (de Celis y col. 1995) (Figura 22D). En las alas pupales homocigotas para I(3)112411 se pone de manifiesto la presencia de venas transversales ectópicas. Además puede apreciarse que el número de células que conforman las venas es mayor que en el ala pupal control, coincidiendo con los fenotipos que más tarde se detectaran en las alas homocigotas adultas (Figura 22E,F).

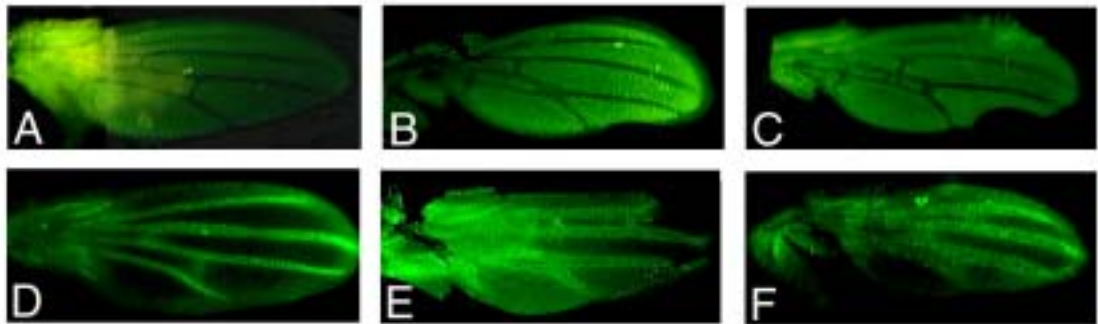


Figura 22. Patrones de expresión de *blistered* y *ventral veinless* en alas pupales. **(A)** Expresión de *bs* en fondo salvaje. **(B,C)** Expresión de *bs* en fondo l(3)112411 / l(3)112411. **(D)** Expresión de *vvl* en fondo salvaje. **(E,F)** Expresión de *vvl* en fondo l(3)112411 / l(3)112411.

2.5.4. Estudios de expresión en mosaicos genéticos

Decidimos estudiar la expresión de diferentes genes de interés en fondos mutantes *ash-2¹* en estadios larvarios. Para ello, generamos clones en los discos imaginales induciendo la recombinación mitótica mediante el sistema FRT-FLP. De forma general, se puede concluir que los clones de células *ash-2¹* son de menor tamaño respecto a los clones controles y además hay casos en los que las células mutantes no sobreviven, sugiriendo que la proliferación celular está alterada. Estos resultados son los esperados, teniendo en cuenta los obtenidos previamente a través del estudio del análisis clonal en el ala adulta.

En primer lugar miramos el patrón de expresión de *Ubx* en clones de *ash-2¹* generados en el disco imaginal de halterio. Las células homocigóticas para *ash-2¹* presentan una disminución en la expresión de *Ubx*, mientras que en las células que rodean al clon (que son por tanto heterocigotas para la mutación) el patrón de *Ubx* no está alterado. *Ubx* también se expresa como se ha indicado anteriormente en el disco imaginal de pata correspondiente al tercer segmento torácico, allí se comprueba que la reducción en los niveles de expresión de *Ubx* es aún más pronunciada que en el halterio (Figura 23).

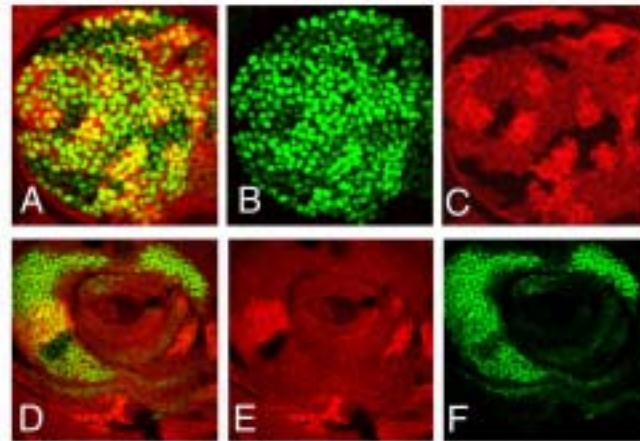


Figura 23. Inmunolocalización de Ubx en clones de *ash-2¹* en discos imaginales de larva III. **(A-C)** Discos imaginales de halterio. **(D-F)** Discos imaginales de pata.

Para determinar si la actividad de *ash-2* es necesaria para la activación transcripcional de *blistered*, analizamos el patrón de expresión de *blistered* en un fondo mutante *ash-2¹*. En discos imaginales de larva III salvajes *bs* se expresa en bandas longitudinales que se corresponden con las regiones de intervena, las regiones de vena y el borde dorso-ventral no presentan expresión de *bs* (Fristrom y col. 1994). Nuestros resultados muestran que los clones mutantes que se localizan en regiones de intervena resultan en la ausencia de *Bs*, mientras que los clones controles en las presuntas regiones de intervena presentan un patrón normal de expresión de *Bs* (Figura 24).

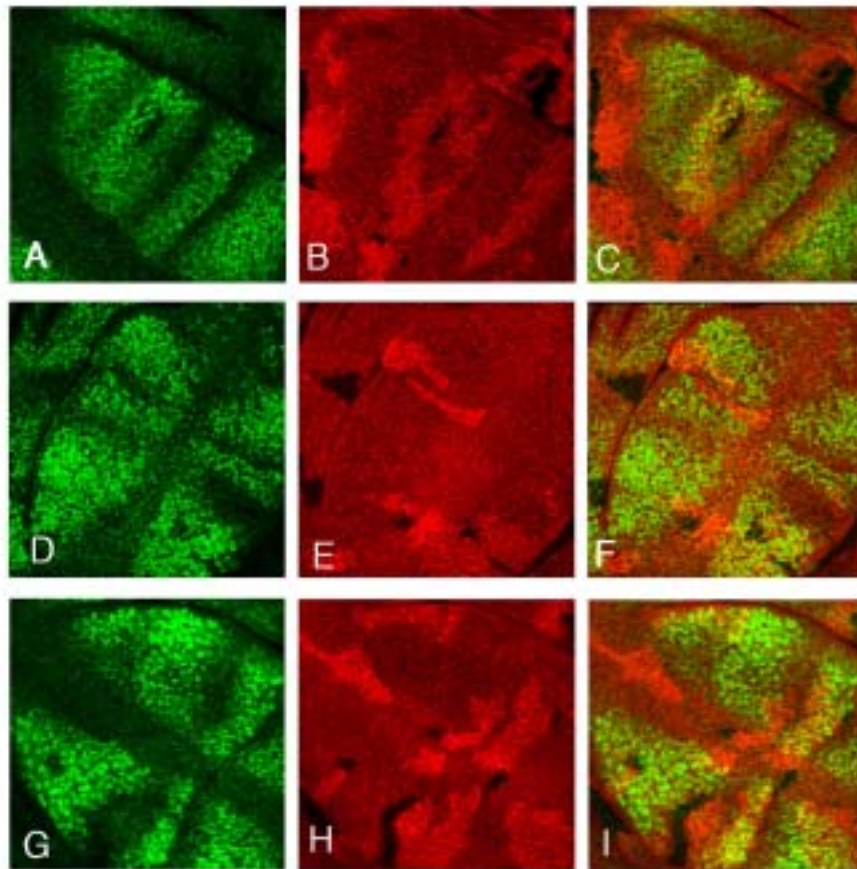


Figura 24. Inmunolocalización de Bs en clones de *ash-2¹* en discos imaginales de ala de larva III.

2.6. Interacciones génicas

2.6.1. Interacción con el gen *crossveinless-2*

Dada la especificidad y alta penetrancia del fenotipo de venas transversales ectópicas que aparece en las moscas homocigotas para el alelo I(3)112411 decidimos hacer estudios de interacción génica con un alelo mutante del gen *crossveinless-2* que se caracteriza por presentar en homocigosis un fenotipo en el que desaparecen de forma específica las 2 venas transversales (García-Bellido y de Celis 1992). Debido a las recientes aportaciones realizadas por Conley y col. (2000) el alelo que escogimos para el estudio fue el *cv-2¹* y lo testamos con nuestros alelos para ver si se producía un incremento o reducción del fenotipo asociado.

De esta forma pudimos comprobar que las combinaciones $cv-2^1 / cv-2^1$; $l(3)112411 / TM6C$ y $cv-2^1 / cv-2^1$; $ash-2^{11} / TM6C$ eran capaces de reestablecer el patrón normal de venación. Es decir, se obtenían alas que presentaban sus correspondientes venas transversales anterior y posterior. El tamaño de estas alas era normal en ambos casos (Figura 25B,C).

Los individuos $cv-2^1 / cv-2^1$; $l(3)112411 / l(3)112411$ presentaban venas transversales ectópicas además de las $cv-a$ y $cv-p$. También se apreciaba la reducción en el tamaño del ala (Figura 25D).

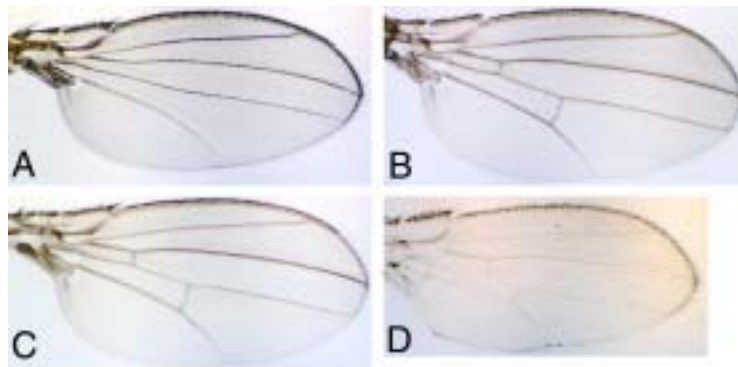


Figura 25. Interacción génica entre *crossveinless-2* y *ash-2*. **(A-D)** Alas adultas. **(A)** $cv-2^1 / cv-2^1$; + / + **(B)** $cv-2^1 / cv-2^1$; $l(3)112411 / TM6C$. **(C)** $cv-2^1 / cv-2^1$; $ash-2^{11} / TM6C$. **(D)** $cv-2^1 / cv-2^1$; $l(3)112411 / l(3)112411$.

2.6.2. Interacción con el gen *plexus*

El gen *plexus* codifica para un componente del nucleoplasma esencial para reprimir la diferenciación de las venas. Así, mutantes *plexus* generan la aparición de tejido de vena ectópico en las regiones de interviena del ala (Matakatsu y col. 1999).

Se realizaron estudios de interacción con el alelo px^{72} . Se trata de un alelo hipomorfo que se caracteriza por la aparición de tejido de vena ectópico en la zona distal comprendida entre las venas L1 y L3 y posterior a la vena L4. Además también se forman pliegues entre las venas L2-L3 y L4-L5 en las zonas más distales del ala, conectando y acercando de esta forma las venas L2 y L3 por un lado y L4 y L5 por otro. La zona comprendida entre L3 y L4 no suele tener venas longitudinales ectópicas, a excepción de una pequeña vena longitudinal que aparece en la parte

más distal de la vena L4 y que conecta con el margen del ala. Además, el territorio comprendido entre las venas L3 y L4 es más ancho que en un ala salvaje debido a un incremento en el número de células (Díaz-Benjumea y García-Bellido 1990; Matakatsu y col. 1999). Los mutantes px^{72} no presentan ningún otro fenotipo asociado.

Los dobles homocigotos $px^{72} / px^{72} ; I(3)112411 / I(3)112411$ se caracterizan por la presencia de venas transversales ectópicas entre las venas L2 y L3, de donde se deriva más tejido de vena ectópico, formándose unas venas totalmente ramificadas (Figura 26B).

La zona comprendida entre las venas L3 y L4 no presenta venas transversales ectópicas, pero sí la pequeña bifurcación descrita para el homocigoto px^{72} / px^{72} . Además, este área es mucho mayor que el de un ala salvaje. En el caso de homocigotos px^{72} / px^{72} , este incremento en la anchura de esta región se localiza fundamentalmente en la zona distal del ala, pero en el caso de los dobles homocigotos ($px^{72} / px^{72} ; I(3)112411 / I(3)112411$) el incremento se extiende a toda la región, tanto en la zona proximal, como en la distal (Figura 26).

En la vena L5, a la altura de la “crossvein” posterior también aparece tejido de vena ectópico como en el caso del homocigoto px^{72} / px^{72} , sin embargo, en la doble combinación homocigota, desaparece completamente la zona proximal comprendida entre las venas L4 y L5 debido a que se produce la fusión de dichas venas.

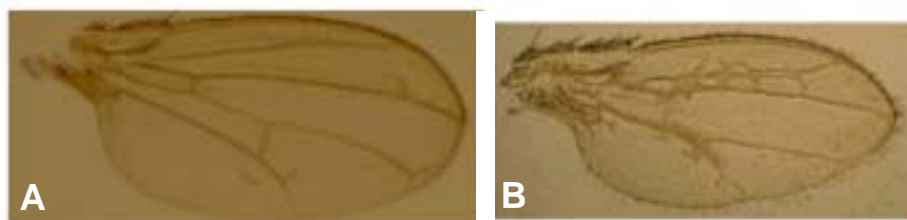


Figura 26. Interacciones genéticas entre *plexus* y *ash-2*. **(A-B)** Alas adultas. **(A)** $px^{72} / px^{72} ; + / +$ **(B)** $px^{72} / px^{72} ; I(3)112411 / I(3)112411$.

APÉNDICE

A.1. Caracterización molecular del alelo *ash-2*¹

Para conocer molecularmente cual era la mutación presente en el alelo *ash-2*¹ se secuenciaron las regiones adyacentes al punto de inserción del elemento *P-lacW* en este mutante. Así se determinó que la secuencia del intrón en el punto original de inserción se reestablecía totalmente. Sin embargo, se producía la desaparición de los nucleótidos 2307 y 2308 (tg) y la inserción de una secuencia de 5 nucleótidos (ttagg) entre las posiciones 2394 y 2395 (Figura 27). Estos datos indican que el elemento *P-lacW* habría realizado al menos dos saltos. En un primer salto se escindió de manera precisa, volviéndose a insertar en una localización cercana. Y en un salto posterior, el elemento *P-lacW* se escindió de manera imprecisa generando las modificaciones presentadas.

1 ggttgaacgggtcatagttcttgggtgccccgggtacaggcacatgcaactgacgctgcccggccacg
64 actggatgtagttgaagggtggtctcgatctcgctcttcagcagcagctggaacttcagatccg
127 agctggccacgcgcacctcatctgcaaaaggaattcggaaactatgtgtaagcagggggcgg
190 gggctccgggtggtcgtcttcattctatTTTTTTTTTTCGCGGTGCACCTTTTCACTTACAGAGC
253 tccaggagattctggaagtcggcgcacacctcgacatggtgctccactagctgcacaccgaa
316 tcggtagcttccaggggttagggccgcttgccagcggcgacgactcctggcgtctatggag
379 agtagtcggagctctgggatacgtggtggcggagtcacggtctgagttgcccggcacttgctcttct
442 tgctattcgttggctcgctcggctcgctcccggcggctcgtgcaatgccatttaggatggcgccc
505 tcgctctcaaacacggaacactgttttccggcaacaaaaaaaaatgataattctacactcggaca
568 tataatat atg gta ggg ata tat ata tat aca att aca atc gaa gca aga
617 gcc aga gtt gga gcg aag agg cag ggg cag ggt tgt cag gct gtg tgc
665 tct aaa tgt tgt cgt cta tcg ttt atc gct ctt tgg cga cgt tct ggt
713 att tgc aaa cgc acc atg tgt ttg ccc gcc aac ggt cac tct ggc cag
M C L P A N G H S G Q
761 CAA CCG AAT TTC TTG CGG GCG GC agattttgtttacatggttaattggtgactga
Q P N F L R A A
816 aaacctttatcactgcaatggagga C AGC CAA ATG GAC ACG AGC TCG CCG ACA
S Q M D T S S P T
869 GAG TCC AGC TCC GAG GTG AAC TTC ACT GCG GAG GAG GAT AAA TCG CAG
E S S S E V N F T A E E D K S Q
917 GAA ACG CGT TCC GCA GCC GGC GTT TGT TAC TGgtgagctctttgtatgagttt
E T R S A A G V C Y C
970 ttgcttggccggctcccttctattgacattgttttttagC GGC AAG GAG CGT AAT CTC
G K E R N L
1027 AAT ATT GTG GAG CTG CTT TGT GCC AAC TGT TCA CGC TGG GTG CAC GAG
N I V E L L C A N C S R W V H E
1075 ACC TGC GTT TCC TAC CAG CTT GGT AAG GGC AAA CTT CTG CCC TTC ATC
T C V S Y Q L G K G K L L P F I
1123 ACC AAC TAT GTG TTC GTC TGT AAA AAT TGC TCT GCC AGC GGA TTG GAG
T N Y V F V C K N C S A S G L E
1171 AGC TTT CGC AAG AGC CAG GCT Agtaagtgcaatgaagccccgcagatttatccctc
S F R K S Q A T
1227 ttgataataacaatatccattccagCC ATA TCC CAG ATG TGC CAC TGT GCC ATT
I S Q M C H C A I
1281 GCC AAC ATG CAG CAG GCG GCT TCC AGG GAC GGA CGT CGG CAG ATA GAG
A N M Q Q A A S R D G R R Q I Q
1329 TTT AGC AAG GAC AAG GAG ATC ATA CCG TAC ATC GAA CAG TAC TGG GAG
F S K D K E I I P Y I E Q Y W E
1377 GCC ATG ACC ACC ATG CCG CGC AGA CTC ACC CAG TCC TGG TAC AGC ACC
A M T T M P R R L T Q S W Y S T
1425 GTC CAG CGA TCT TTG GTC AAG GAT GTG CAG ACA CTG TTC ACC TAC GAG
V Q R S L V K D V Q T L F T Y E
1473 GAG CAT GCG GAA CAT GGC GCG ATG TAC GGA CTA TTC CAT CAG GAT CTG
E H A E H G A M Y G L F H Q D L
1521 CGA ATC ATC AAG CCC AAC TAC GAG AGC ATG AGC AAG AGC GGC GCC CTG
R I I K P N Y E S M S K S G A L
1569 CGA CTC ACC GAC GAT GGA TAT ACT CAA Ggtgagtgtaataagatgatagacat
R L T D D G Y T Q A
1623 ctaaatcgatttgaagtctataaattgaaatgctaaaaacttgaccccatgtgttatcgaacgc
1686 tcagtggtagaaagctaaatgaattatgttttggcgccaaattggcaacactgttcgaccag
1749 ctgattttggcacagtggtttttgtgtcgccELEMENTO Ptattccgctgcctattcgcttc
1802 ccctatttatcgccgcttcccttccgctcgctctttcgttaagtgttggcagagtaaaagtaaca
1865 acaacaactaacaacaaatcgcaatgctggtatcgtatgatttgcacacacacagagaaaga
1928 gagagagagagagagagccccacgtagtcagattgtggggggggcgaactgggggtgggtggg
1991 gctggcagaagcgcgctcaacttggctcattcattacaacaaatagttacgcttggaaact
2054 tcgccagtgctcagtggtgctgtgtggtgctctttcgggggaattgattgctgattgatt
2117 ttgagcactacgcaattgcaaggccccgctccttcagttccattgtgaccgggtcctgcttc
2180 tgctcctgctcatttccctccgcgatggcctcatcttttacgggacgacgagtgtaagcccg
2243 gaaacagcaccgacccgaactttgccattcatctacatatgtcccgaatcaatttcttg
2306 gTgaacgaatttcttgggatagctccttctggaagcattgcagatacggcccaagatctac
2369 tccactattactatcacgcattagttaggctgtttttatatttccacaatacatgtctattat
2427 tggatttgaactaatgattgatccacatgcttccagCT TCC CTC TCC AAA AAC AAT
S L S K N N
2484 CGA CAG AAA AGG AAA TTT CCC GGC ACG GAT TCG GGT CCC ACG GGC AAG
R Q K R K F P G T D S G P T G K

2532 AAG GGT CGG CCC AGT TCC GAT ATT ACG GCC AAT GTA AAG TTG CCA CCG
 K G R P S S D I T A N V K L P P
2580 CAT GGC TAT CCA TTG GAA CAC CCC TTC AAC AAG GAT GGC TAT CGT TAT
 H G Y P L E H P F N K D G Y R Y
2628 ATA CTC GCC GAA CCG GAT CCA CAT GCT CCA TTT CGT CAG GAG TTC GAC
 I L A E P D P H A P F R Q E F D
2676 GAG AGC TCC GAT TGG GCT GGC AAA CCT ATC CCC GGC TGG CTC TAC CGC
 E S S D W A G K P I P G W L Y R
2724 ACC CTG GTG CCA CAT TCT GTG CTC CTG GCG CTG CAT GAT CGG GCA CCA
 I L V P H S V L L A L H D R A P
2772 CAG CTG AAA ATA AGC GAG GAT CGG TTG GCG GTG ACG GGC GAA CGT GGT
 Q L K I S E D R L A V T G E R G
2820 TAC TGC ATG GTC CGA GCC ACA CAC Tgtaacgttatatatagatatatatagttcc
 Y C M V R A T H S
2875 ctgaagaaatcatagttatattgattatcttttcccagCT GTG AAC CGG GGA TGC TGG
 V N R G C W
2933 TAC TTT GAG GTC ACC ATC GAA GAG ATG CCC GAC GGA GCT GCC ACG CGA
 Y F E V T I E E M P D G A A T R
2981 CTT GGC TGG GGC CGG GAG TAC GGC AAC TTG CAG GCT CCA TTG GGA TAC
 L G W G R E Y G N L Q A P L G Y
3029 GAC AAG TTC GGT TAC TCC TGG AGA TCT CGC AAG GGC ACC AAG TTT ACC
 D K F G Y S W R S R K G T K F T
3077 GAG AGC CAT GGC AAA CAC TAC AGT GAT GCC TAT GTG GAG GGC GAT ACA
 E S H G K H Y S D A Y V E G D T
3125 TTG GGA TTC CTC ATA GAG CTG CCA AAG GAG GCG TCG CTC GAC TAT CTG
 L G F L I E L P K E A S L D Y L
3173 CCC AAC ACA TTC AAA GAT CGG gtggggttagattcttggtttactctttactgatc
 P N T F K D R
3229 aaacaataaccgatcttttNttttgtaaaatgatgtaggtcatcttgataaattagcctatatta
3292 taccgcgccgctgaatttgcatataattgcatctttacaaatcgaccctccctaattagcaat
3355 cttgttcaaaatctattcattctgcaacag CCC CTG GTC AAG TTC AAG TCT CAT
 P L V K F K S H
3409 CTG TAC TAC GAA GAT AAG GAC AAG ATC ACA GAA ACC CTG AAA AAT CTG
 L Y Y E D K D K I T E T L K N L
3457 CAC ATC CTG CAG GGC AGC CGC ATC CAG TTC TTT AAG AAC GGT CAA TCG
 H I L Q G S R I Q F F K N G Q S
3505 CAG GGT GTG GCA TTC GAA GAC ATT TAT GCC GGC AGC TAT TTC CCG GCC
 Q G V A F E D I Y A G S Y F P A
3553 ATC TCG ATC CAC AAA AGT GCA ACG GTC AGC GTA AAC TTC GGA CCC GCC
 I S I H K S A T V S V N F G P A
3601 TTC AAG TAT CCC GAG GTG CTC GTC GAG CAC AAA GCC AAG GGGgtaaatatt
 F K Y P E V L V E H K A K G
3651 tctcggtttgttcccaggaagcttaacatctattataacaatcccctacag ATG CAC GAT
 M H D
3710 CGC GTG GAG GAG CTG ATC ACA GAG CAA TGT TTA GCC GAC ACC CTC TAC
 R V E E L I T E Q C L A D T L Y
3758 CTC TCA GAA CAC GAT GGA CGT CTG CTC TTG GAT TAT ATG GGT CTT TAG
 L S E H D G R L L D Y M G L *
3806 tgggatatgtcgtcatcacatgagtttgggagaactagtgtgttattttgtatgcactata
3869 ctttggaaagcagaaatttgaaaagactatcatcatactatcatacctaaaacattttaaatt
3932 taccacttttaagcagaaaa

Figura 27. Secuencia genómica del gen *ash-2* así como las regiones flanqueantes 5' y 3'. El punto de inserción del elemento *P-lacW* está indicado en azul. Y las alteraciones encontradas en el alelo *ash2^{l1}* están indicadas en rojo.

A.2. Estudios de complementación con genes que mapan en la región 96A

Se realizaron estudios de complementación con genes que mapan en la misma región que nuestro mutante (96A11-16) para descartar la posibilidad de haber afectado a un gen vecino en el proceso de escisión del elemento *P-lacW*. Estas complementaciones se realizaron con los alelos I(3)112411 y *ash-2¹* y diferentes alelos de los genes *tolloid (tld)*, *slowpore (slo)*, *tolkin (tok)*, *taxi (tx)*, y I(3)96Bg. En todos los casos se produjo complementación, descartándose que estos genes estuvieran afectados en nuestras líneas mutantes.

También se incluyó en este estudio una deficiencia de la zona (Df(3R)XS), cuyos puntos de rotura son 96A1-7; 96A21-25, 89C; 89E. La combinación I(3)112411 / Df(3R)XS es muy poco viable y en los casos en que lo es, las alas de estas moscas presentan la aparición de venas transversales ectópicas, así como una reducción débil del tamaño del ala (Figura 28C).

También se realizaron estudios de complementación con el alelo *ash-2¹*. Se trata de un alelo que presenta una inserción de 3 Kb y que fue generado mediante una mutagénesis con N-metil-N'-nitrosoguanidina. Su fase de letalidad se sitúa en el estadio de pupa temprana y había sido descrito previamente por el Dr. Shearn en 1989.

La combinación *ash-2¹* / *ash-2¹* es letal en pupa joven y no aparecen moscas hemizigóticas viables. La combinación I(3)112411 / *ash-2¹* presenta una baja proporción de moscas hemizigotas viables. En estos casos, las alas se caracterizan porque no aparecen reducciones evidentes de su tamaño, la vena L2 no está alterada, pero sí aparecen venas transversales ectópicas, que se localizan en las mismas regiones ya descritas para los homocigotos I(3)112411 / I(3)112411 (Figura 28B).



Figura 28. Alas adultas. **(A)** Ala salvaje. **(B)** Combinación I(3)112411 / *ash-2*¹. **(C)** Combinación I(3)112411 / Df(3R)XS.

DISCUSIÓN

La discusión se ha dividido en 3 partes. En una primera parte se discute la idoneidad de los transposones como generadores de colecciones de mutantes, así como los resultados obtenidos con la colección de líneas del cromosoma III generadas por inserción de un elemento *P-lacW* en su genoma.

En la segunda parte se discuten los resultados obtenidos a partir del estudio de los diferentes alelos de *ash-2* dentro del contexto de la diferenciación celular, así como dentro del contexto de los genes homeóticos.

Y por último, en la tercera parte se discuten las posibles perspectivas de futuro para poder clarificar de forma más precisa las implicaciones de *ash-2* en todos estos procesos.

PARTE 1. ESTUDIO DE UNA COLECCIÓN DE MUTANTES GENERADOS POR LA INSERCIÓN DE UN ELEMENTO *P-lacW* EN EL CROMOSOMA III DE *Drosophila melanogaster*

1.1. Mutagénesis con elementos transponibles

Los elementos transponibles han desplazado en gran medida la utilización de métodos químicos (etilmetanosulfonato, nitrosoguanidina) o físicos (rayos X) para generar colecciones de mutantes debido a las ventajas que presentan. En primer lugar, los elementos *P* presentan diferentes marcadores genéticos que permiten identificar de manera inmediata las moscas mutagenizadas. Además se puede detectar de forma rápida el lugar exacto del genoma donde se ha producido la lesión mediante una hibridación *in situ* sobre cromosomas politénicos. Otra ventaja importante es que permiten estudiar los patrones de expresión temporal y espacial de los genes donde se han insertado (O’Kane y Gehring 1987) sin necesidad de tener ninguna información previa sobre dicho gen. En el caso particular de la colección de elementos *P-lacW* utilizada en este trabajo (Deák y col. 1997), los resultados de la tinción para la β -Galactosidasa fueron negativos. Esto puede ser debido a que la inserción del elemento *P-lacW* cause la pérdida de función del gen, reduciendo o anulando la transcripción; que el lugar de inserción del transposón no

sea compatible con una activación transcripcional del gen *lac-Z*; que los transposones se inserten en zonas silenciosas del genoma o que la técnica utilizada no sea suficientemente sensible. Por último, los elementos *P* presentan secuencias bacterianas que permiten la clonación de las regiones flanqueantes (Steller y Pirrota 1985).

A pesar de todas las ventajas presentadas, las colecciones de elementos transponibles se caracterizan por presentar un gran inconveniente, se ha observado que en muchos casos, la inserción del elemento *P* no es la responsable del fenotipo asociado a la mutación y además también se generan líneas donde hay más de un elemento *P*. En nuestro caso, de las 168 líneas letales en larva III estudiadas, 16 presentaban múltiples mutaciones (9.5%); en el caso de los letales en pupa eran 22 de 135 (16.3%) y por último, dentro de las líneas semiletal y viables analizadas fueron 78 de 419 (18.6%). Estos porcentajes constituyen una estimación muy a la baja, ya que para la mayoría de las líneas mutantes no se realizó la escisión del elemento *P-lacW*. Una mejor estima del alcance de este fenómeno se obtiene a partir de estudios más amplios realizados con esta misma colección, que muestran que de un total de 101 líneas testadas, en 35 de ellas (34.7%) el elemento *P-lacW* no es el responsable del fenotipo asociado a la línea (Salzberg y col. 1997).

1.2. Estudio de una colección de líneas mutantes generadas por inserción de un elemento *P-lacW* en su genoma

Al igual que ya se había hecho previamente en nuestro laboratorio con una colección de mutantes generados por inserción de un elemento *P-lacW* en el cromosoma II (Roch y col. 1998b) las líneas mutantes en larva III se clasificaron según la morfología de sus discos imaginales, se realizaron estudios de análisis clonal en algunos de los casos que presentaban efectos en la morfogénesis de los discos imaginales y finalmente se analizó la correlación entre los efectos de la mutación en los discos y los fenotipos obtenidos en el análisis clonal. Así, de los mutantes que presentaban efectos en los discos imaginales, la mayoría se caracterizan por presentar unos discos de menor tamaño. Además, la mayoría de mutantes de la clase I (líneas sin discos o discos extremadamente reducidos) no

generan clones cuando se induce la recombinación mitótica, de donde se deduce que en estos mutantes están afectados los procesos de viabilidad, proliferación y crecimiento celular. En la clase II (líneas con discos de menor tamaño que los discos salvajes) encontramos líneas que presentan clones con fenotipo asociado. Se espera que los mutantes de este grupo afecten principalmente al establecimiento de un patrón correcto y a la proliferación. Las mutaciones que alteran el patrón sin alterar el tamaño de los discos (clase III) constituyen una proporción menor. Esto podría estar reflejando que patrón y proliferación son dos procesos estrechamente relacionados.

En todas las clases encontramos líneas que presentan un análisis clonal sin ningún fenotipo asociado. Existen diversas explicaciones para este hecho. Puede ser que el fenotipo de los discos sea debido a una mutación localizada en otro lugar del cromosoma; que el gen sea necesario en una etapa anterior del desarrollo; que las células heterocigotas salvajes que rodean al clon de células homocigotas mutantes sean capaces de rescatar el fenotipo producido por éstas; o simplemente debido a la perdurabilidad del producto salvaje (García-Bellido y Meriam 1971).

Debido a que los resultados obtenidos a través del estudio de los mutantes letales en larva III/pupa no nos proporcionó una vía para poder continuar con el objetivo de nuestro trabajo, se decidió optar por una nueva estrategia que consistió en analizar los fenotipos de las líneas de la colección que eran semiletal y viables. De esta forma el proceso se agilizaba, ya que las moscas homocigotas adultas nos permitían caracterizar de forma inmediata el fenotipo asociado a las mutaciones presentes en estas líneas. Después del análisis de 419 líneas semiletal y viables se decidió centrar los esfuerzos de nuestro proyecto en la caracterización en profundidad de la línea I(3)112411.

PARTE 2. *ash-2* EN EL CONTEXTO DE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR Y LOS GENES HOMEÓTICOS

De la colección de mutantes presentada, se seleccionó la línea I(3)112411 para realizar un estudio más detallado. El análisis molecular permitió comprobar que el gen mutado en esta línea era *absent, small or homeotic discs-2 (ash-2)*, un miembro del grupo *trithorax*. Los genes de este grupo se caracterizan por estar implicados en la regulación de los genes homeóticos.

La inserción del elemento *P-lacW* se localiza en el intrón de mayor tamaño de dicho gen y es el único responsable del fenotipo asociado a la línea.

A partir de la línea I(3)112411 se generaron 3 nuevos alelos, uno de los cuales era letal en pupa (*ash-2^{l1}*) que fue seleccionado para ser caracterizado en profundidad junto con la línea original.

2.1. Implicación de *ash-2* en la diferenciación celular

A partir de los resultados obtenidos con nuestros alelos, proponemos que *ash-2* está implicado en la maquinaria de regulación génica de genes que controlan la formación del patrón del ala, además de estar regulando a los genes homeóticos.

En este trabajo primero nos centramos en el alelo I(3)112411 por la aparición de las venas transversales supernumerarias y después a través del análisis clonal de los alelos I(3)112411 y *ash-2^{l1}* hemos mostrado que *ash-2* es requerido para el desarrollo correcto del ala.

Los clones de células mutantes para *ash-2^{l1}* se caracterizan por reducir drásticamente las regiones de intervena y ensanchar las venas, a excepción de la vena L4 que no se ve prácticamente alterada. Si los clones son de gran tamaño, se produce una distorsión generalizada del ala. En clones tempranos que cruzan el margen anterior del ala, la triple fila de órganos sensoriales presentes en este margen se ven desorganizados y/o desaparecen. También se observan efectos no autónomos celulares asociados con la aparición de tejido de vena ectópico cuando el clon se localiza cerca de una vena.

El análisis de clones gemelos nos permitió comprobar que los clones mutantes estaban formados por un número menor de células que los clones controles. Estos resultados demuestran que la función de *ash-2* es requerida para la viabilidad y/o proliferación celular.

Debido a la aparición de tejido de vena ectópico en clones *ash-2¹* es factible considerar que *ash-2* está implicado en el mantenimiento de la condición de intervena. Además la pérdida de función de *ash-2* suprime la expresión del gen *blistered*. Basándonos en estos resultados, se puede postular que *ash-2* es necesario para promover la condición de intervena. De esta forma, *ash-2* actuaría de forma directa o indirecta sobre la expresión de *bs*.

Se ha demostrado un papel dual para *bs*. Por un lado suprime la actividad de genes promotores de vena en la región de intervena y por otro es requerido de manera autónoma celular para el desarrollo de las células intervena (Montagne y col. 1996). Se ha comprobado que la cascada de señalización del DER es necesaria en los estadios larvarios para reprimir a *bs* (Roch y col. 1998a) y para activar a *veinlet*, promoviendo la diferenciación de las venas (Martín-Blanco y col. 1999). En los estadios pupales *veinlet* y *blistered* son mutuamente excluyentes (Roch y col. 1998a). Por lo tanto, es posible que *ash-2* no active a *bs* directamente sino que actúe como un represor de un gen promotor de venas. En clones para *ash-2¹* se aprecia que no todas las células del clon se transforman en tejido de vena en lugar de intervena, como si ocurre con los clones de *bs* (Fristom y col. 1994; Montagne y col. 1996; Roch y col. 1998a). En muchos casos, el tejido de extravena que aparece en los clones para *ash-2¹* se corresponde con venas que se han ensanchado o con la formación de tejido de vena ectópico cerca de una vena existente. Esto sugiere que *ash-2* podría operar en la región de intervena cerca de la vena para reprimir la formación de tejido de vena. Hay que tener en cuenta que la proteína se acumula en todos los discos imaginales (Adamson y Shearn 1996) sin embargo, esto no constituye *a priori* un impedimento para realizar esta función, ya que otros represores de la diferenciación de venas, como por ejemplo *plexus* (que codifica para una proteína que se localiza en la matriz nuclear), se expresan también de forma ubicua, y su expresión en los primordios de las venas en los discos imaginales de ala no interfiere en el proceso de diferenciación de las venas en su posición normal

(Matakatsu y col. 1999). La expresión de *px* en fondos homocigotos mutantes para *ash-2* pone de manifiesto que *ash-2* no está implicado en la regulación transcripcional de *px*. Sin embargo, los experimentos con el alelo *px⁷²* muestran la existencia de una interacción entre las rutas de ambos genes que conducen a la represión de la formación de tejido de vena.

Se ha demostrado que Brm, Ash-1 y Ash-2 son subunidades de distintos complejos (Papoulas y col. 1998) en los que intervienen proteínas que no están codificadas por genes del grupo *trx*. Además se han encontrado proteínas que se asocian con estos complejos promoviendo la activación de algunos genes diana como es el caso de Osa (Collins y col. 1999; Collins y Treisman 2000). Esto nos lleva a pensar que *ash-2* podría estar actuando como un cofactor, implicado en la represión de genes necesarios para la formación de las venas.

El gen *crossveinless-2* pertenece a la clase de genes que provoca una pérdida parcial de tejido de vena. En este caso, desaparecen las 2 venas transversales (*cv-a* y *cv-p*). *cv-2* codifica para una proteína que contiene una putativa secuencia transmembrana; un dominio parcial Von Willebrand Factor D, similar a dominios que se conoce que regulan la formación de uniones intra e intermoleculares; y 5 dominios ricos en cisteína, similares a los presentes en proteínas que se conocen que unen a los ligandos "BMP-like". *cv-2* se expresa en las venas transversales en desarrollo y es necesario para la actividad local de BMP (Conley y col. 2000). En el desarrollo temprano de las alas, la cascada de señalización de BMP es activada a lo largo del límite anteroposterior mediante el ligando *decapentaplegic (dpp)*, especificando los ejes del ala (Posakony y col. 1991). Sin embargo, en estadios pupales la expresión de *dpp* se pierde en la frontera y se expresa en las venas pupales; esta expresión es requerida para la diferenciación de las venas. Así *dpp* es capaz de desencadenar el programa de diferenciación de venas cuando se expresa ectópicamente en alas pupales, dando lugar a la formación de venas extras (de Celis 1997).

Cabe destacar que la forma activada de Mothers Against Dpp (Mad), que es el transductor intracelular de la señal de la cascada de señalización de BMP, se detecta en las zonas donde se localizarán las venas transversales, antes que en las futuras venas longitudinales; además la expresión localizada de *cv-2* es necesaria para la actividad Mad en los territorios de venas transversales (Conley y col. 2000).

Estos autores muestran que la expresión ectópica de *cv-2* no es suficiente para desencadenar la formación de venas transversales lo que sugiere la implicación de otros genes. Los experimentos realizados en esta tesis muestran que el desarrollo de las venas transversales puede ser rescatado en ausencia de *cv-2* cuando los niveles de *ash-2* están reducidos. Estos resultados sugieren que *ash-2* actúa como un represor de la formación normal de las venas transversales en los territorios presuntivos de venas transversales y además podemos localizarlo “downstream” de *cv-2*.

La especificación y mantenimiento del tejido de vena requiere la cooperación entre varias cascadas de señalización además de BMP. La cascada de señalización MAPK mediada por el DER estimula la formación de las venas (Sturtevant y col. 1994). *Delta* (uno de los ligandos de *Notch*) se expresa a lo largo de las venas, en respuesta a niveles elevados de la cascada de señalización DER. La expresión de *Delta* en las presuntivas células vena induce la expresión de *N* e inhibe la formación de venas en las células de los alrededores (intervenena) (Martín-Blanco y col. 1999). Podríamos especular con la posibilidad que *ash-2* inhiba la expresión de alguno de estos elementos formadores de vena en las regiones de intervenena y así la ausencia o reducción en los niveles de *ash-2* incrementaría la formación de vena.

La región comprendida entre las venas L3 y L4 es la menos sensible a los efectos de *ash-2*. Existen 2 líneas de evidencia que muestran que las células en esta zona central del ala no responden a cambios en *ash-2*:

- En los alelos I(3)112411, *ash-2*² y *ash-2*³ no aparecen venas transversales ectópicas entre las venas L3 y L4.
- Los clones para I(3)112411 y *ash-2*¹ no presentan fenotipo cuando se localizan en las regiones de intervenena comprendidas entre las venas L3 y L4.

Los mutantes *bs* muestran venas ectópicas excepto en la zona de intervenena entre L3-L4 (Fristrom y col. 1994). Esta zona es resistente a la formación de venas en muchos mutantes que se caracterizan por presentar un fenotipo de formación de venas extra. Esto sin embargo no sucede en los mutantes del grupo *knot* (Díaz-Benjumea y García-Bellido 1990). Esta región está bajo el control de genes

organizadores que responden a la señal de *hh* (Tabata y Kornberg 1994; Zecca y col. 1995). Uno de los genes que responde a *hh* es *knot*, que especifica la región de intervena entre L3 y L4 y suprime la expresión de DER (Mohler y col. 2000). La expresión de *kn* en la región entre L3 y L4 especifica una zona libre de venas, formándose las venas L3 y L4 fuera de esta zona. La expresión de *bs* en esta zona es inducida y controlada por Hh (Nussbaumer y col. 2000).

A partir de todos estos datos, se puede concluir que el desarrollo de la región de intervena comprendida entre las venas L3 y L4 así como la represión de los genes iniciadores de vena en esta zona, no depende de la función *ash-2*. Por el contrario, *ash-2* operaría en el desarrollo del ala fuera de este territorio. En estas regiones la expresión de *bs* depende de *dpp* (Nussbaumer y col. 2000). La expresión temprana de *dpp* en la región central del ala desencadena la expresión de genes diana que posicionan las intervenas y las venas longitudinales (de Celis y Barrio 2000). Por lo tanto, es también posible que además de un papel en la diferenciación intervena/vena, *ash-2* tenga un papel temprano en la regulación de algún gen diana de *dpp* y por lo tanto en el establecimiento del patrón correcto de vena/intervena.

2.2. Papel del gen *ash-2* en la formación y especificación de los segmentos distales de la pata

La pata de *Drosophila* está formada por unidades segmentales, que de proximal a distal se conocen como: coxa, trocanter, fémur, tibia y segmentos tarsales 1-5. Su formación tiene lugar por pliegues concéntricos y la subsiguiente segmentación del epitelio monocapa que constituyen los discos imaginales de pata, invaginados a partir de la epidermis durante la embriogénesis (Cohen 1993).

Se sabe que los genes homeobox *BarH1* y *BarH2* juegan un papel esencial en la formación y especificación de los segmentos distales de las patas de *Drosophila*. En el inicio de la etapa larvaria III, la yuxtaposición de tejidos Bar-positivos y Bar-negativos causa los pliegues centrales que separan los futuros segmentos tarsales 2 y 3. Mientras que la yuxtaposición de tejidos que expresan de forma diferencial a los genes *Bar* en estadios más tardíos da lugar a la aparición de las fronteras

segmentales de los tarsos distales, incluyendo la frontera tarso-pretarso (Kojima y col. 2000).

BarH1 y *BarH2* se coexpresan de forma circular en los 3 tipos de discos imaginales de pata. Ambos genes son funcionalmente redundantes, por lo que se refieren de forma conjunta como *Bar*. Los mutantes para *Bar* se caracterizan por la frecuente fusión parcial de los segmentos tarsales 2-5 (Kojima y col. 2000).

La segmentación de las zonas distales de la pata es un proceso multi-etapa que implica varios aspectos del desarrollo, siendo *BarH1* y *BarH2* esenciales para que este proceso morfogenético tenga lugar.

Tal como se indicó en el apartado 2.4.2., los clones de células homocigotas en pata para *ash-2¹* producían entre otros efectos la fusión de los segmentos más distales. Aunque los resultados son preliminares, por estos fenotipos se puede pensar que *ash-2* podría tener un papel en la formación y/o especificación de los segmentos distales de las patas de *Drosophila*.

2.3. *ash-2* como regulador de los genes homeóticos

Tal como era de esperar, nuestros alelos (I(3)112411 y *ash-2¹*) se comportan como los alelos clásicos de *ash-2*, presentando algunas transformaciones homeóticas características de un miembro del grupo *trx*. Se detecta una transformación parcial del halterio a ala a muy baja frecuencia, así como una transformación del primer segmento torácico en segundo.

En nuestros experimentos, así como en los realizados por el Dr. Shearn, se aprecia que los alelos de *ash-2* son capaces de modificar el fenotipo asociado con el alelo de ganancia de función de *Antp Nasobemia* (*Antp^{Ns}*). En este alelo, la alteración del promotor P2 es la responsable de los niveles elevados de la proteína *Antp* que aparecen en el disco imaginal de ojo-antena y que provoca el fenotipo mutante. A partir de nuestros resultados, se puede pensar que *ash-2* estaría implicado en regular la represión del promotor P2 de *Antp*. Esta hipótesis encajaría con los resultados obtenidos al estudiar el patrón de expresión de *Antp* en un fondo homocigoto mutante *ash-2¹*. Así, la pérdida de represión del promotor P2 de *Antp* produciría la desregulación del patrón de expresión detectado en el disco imaginal de ala. Esta regulación del promotor podría ser tanto directa como indirecta, sin

embargo, es más factible pensar que esta regulación se realiza de manera indirecta, ya que hasta el momento no existe ninguna evidencia que demuestre que Ash-2 se une específicamente al ADN, pero sí se ha comprobado que Ash-2 forma parte de un complejo de 500 KDa (Papoulias y col. 1998) que podría estar implicado en esta regulación.

Por otro lado, hemos visto que los alelos de *ash-2* no modifican el fenotipo asociado con el alelo de ganancia de función *Antp*^{73b}, donde la alteración del promotor P1 de *Antp* es la responsable del fenotipo. Estos resultados ponen de manifiesto que *ash-2* no estaría implicado en la regulación del promotor P1 de *Antp*.

Tanto los resultados obtenidos al estudiar el patrón de expresión de *Ubx* en un fondo homocigoto mutante para *ash-2*¹, como el estudio de expresión de *Ubx* en mosaicos genéticos ponen de manifiesto que *ash-2* regula de forma positiva la expresión de *Ubx* en el halterio y la pata.

2.4. Organización genómica del gen *ash-2* y caracterización molecular del alelo *ash-2*¹

Al secuenciar la región genómica que contiene al gen *ash-2* observamos que el gen estaba formado por 8 exones y 7 intrones, resultado que no coincide con los datos publicados sobre *ash-2* (6 exones y 5 intrones) (Adamson y Shearn 1996). Nuestros datos se vieron corroborados posteriormente con los obtenidos a partir del proyecto de secuenciación del genoma de *Drosophila melanogaster*.

Adamson y Shearn había situado la metionina inicial en la posición 728 (Figura 27). Sin embargo, se puede comprobar que la región situada más a 5' de esta metionina inicial sigue estando en pauta y a 153 nucleótidos se localiza otra metionina, por lo que la localización de la metionina inicial parece no estar totalmente resuelta.

Los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que en el alelo *ash-2*¹ se sucedieron una serie de eventos durante los cuales el elemento *P-lacW* se escindió de forma precisa, se reinsertó y después se escindió de manera imprecisa provocando las modificaciones presentadas en el Apéndice. Se realizaron estudios

de complementación con genes que mapan en la misma región que *ash-2* (96A11-16) para descartar la posibilidad de haber afectado a un gen vecino durante el proceso de escisión del elemento *P-lacW*. Y para descartar posibles mutaciones en otras zonas del gen, toda la región genómica que incluye al gen *ash-2* fue amplificada en el mutante *ash-2^{l1}* mediante la utilización de diversas combinaciones de cebadores específicos. En ningún caso se detectó una diferencia en el tamaño de las bandas esperadas entre un ADN control y el de nuestro mutante. Por supuesto hay que dejar abierta la posibilidad de mutaciones puntuales o reorganizaciones que no serían detectadas en un gel de agarosa. Por este motivo se secuenció prácticamente todo el gen en el mutante *ash-2^{l1}* y no se encontraron otras alteraciones a parte de las ya descritas en el cuarto intrón. Por lo que por el momento, todo apunta a que estas modificaciones en el intrón son las responsables de todos los fenotipos asociados a este nuevo alelo del gen *ash-2*.

PARTE III. PERSPECTIVAS DE FUTURO

Esta tesis constituye el inicio del estudio del gen *ash-2* en nuestro laboratorio. En particular nos hemos centrado en entender el papel de este gen en los procesos de proliferación y diferenciación celular en los que hemos visto que está implicado. Sin embargo, existen aún muchas lagunas que deben ser resueltas para conseguir un mayor entendimiento de todos los procesos afectados en estos mutantes.

Antes de continuar realizando más experimentos es imprescindible corroborar que el alelo *ash-2¹* es un alelo nulo y que las modificaciones presentadas en esta tesis son las únicas alteraciones presentes en este mutante. Para ello, las aproximaciones son diversas (ya sea a nivel de ADN, ARN o proteína), entre ellas:

- Acabar de secuenciar el alelo *ash-2¹*.
- Una manera indirecta de comprobar que la única alteración presente en el alelo *ash-2¹* es debida a la escisión del elemento *P-lacW* podría ser el estudio en mosaicos genéticos de otro alelo de *ash-2* previamente descrito como un alelo nulo, como por ejemplo el alelo *ash-2¹*. La presencia de fenotipos equivalentes en ambos casos nos indicaría que nuestra hipótesis es correcta.
- Realizar hibridaciones *in situ* de *ash-2* sobre discos imaginales homocigotos para el alelo *ash-2¹*.
- Realizar una inmunotinción con un anti-Ash2 sobre discos homocigotos para el alelo *ash-2¹*. En la actualidad se está generando un anticuerpo contra Ash-2 en ratones a partir de péptidos sintéticos seleccionados a partir de su posible reacción inmunogénica. La obtención de dicho anticuerpo permitiría detectar los niveles de Ash-2 en diferentes fondos genéticos de interés.
- El anticuerpo contra Ash-2 permitiría detectar la presencia o ausencia de diferentes formas de la proteína en nuestros mutantes mediante un Western. Recordemos que los estudios previos presentados por el Dr. Shearn indicaban la presencia de dos formas proteicas, responsables de los fenotipos asociados con nuestros mutantes.
- Caracterizar la presencia o ausencia de ARN en nuestros mutantes.

En este estudio nos hemos centrado en un único miembro del grupo *trithorax*. Sería interesante estudiar el comportamiento de otros miembros del grupo para ver si también presentan esta dualidad funcional. Por un lado actuando como reguladores de los genes homeóticos y por otro implicados en procesos de proliferación y diferenciación celular. De manera equivalente, se podría ampliar el estudio a los miembros del grupo *Polycomb*, que como ya se comentó en la introducción se encargan de realizar un papel de control sobre los genes homeóticos opuesto al realizado por el grupo *trithorax*.

Sería también interesante intentar averiguar el papel evolutivo del gen *ash-2* en el patrón de venación de las alas. Para ello sería necesario la realización de un estudio comparativo con otros insectos para intentar encontrar algún tipo de relación entre la localización de las venas transversales ectópicas presentes en nuestros mutantes y los patrones de venación de otras especies (de especial interés serían los estudios comparativos con neurópteros, que se caracterizan por presentar un número muy elevado de venas transversales).

En esta tesis, todos los estudios funcionales se han centrado en la pérdida de función del gen *ash-2*, motivo por el cual sería interesante generar moscas transgénicas que nos permitieran conocer los efectos que provoca la sobreexpresión del gen.

En esta primera aproximación al gen *ash-2* no nos hemos centrado en profundidad en los problemas de diferenciación que presentan los tricomas de las células del ala. En la condición salvaje estas células se caracterizan por producir un único tricoma orientado distalmente que deriva de una extensión celular llamada pre-tricoma que contiene abundantes filamentos de actina y microtúbulos (Fristrom y col. 1993, Wong y Alder 1993). Este pre-tricoma se localiza típicamente en el vértice más distal de las células del ala pupal y se sabe que la disrupción del citoesqueleto de microtúbulos provoca el desarrollo de múltiples pre-tricomas en la periferia apical de las células (Turner y Alder 1998). Ya que muchos mutantes que afectan al citoesqueleto de las células presentan fenotipos similares al de nuestros mutantes, esta sería otra posible vía de estudio.

Tampoco se ha profundizado en los estudios del tamaño celular. Como se indicó en el Capítulo 2, las células que constituyen las alas de las moscas mutantes para I(3)112411 y las células de los clones homocigotos mutantes para *ash-2^{l1}* son de mayor tamaño. Se sabe que un bloqueo en la progresión del ciclo celular tiene como consecuencia la aparición de ciclos endoreduplicativos que provocan el crecimiento celular y la aparición de problemas de diferenciación (Hayashi 1996, Weigmann y col. 1997), por lo que sería interesante realizar estudios sobre el ciclo celular en estos mutantes para poder caracterizar de forma más precisa este fenotipo.

El estudio del papel de *ash-2* en la formación y/o especificación de los segmentos distales de las patas es otro tema que podría esclarecer muchos aspectos relacionados con el funcionamiento de *ash-2*.

Consideramos que continuar el estudio del gen *ash-2*, así como el de otros miembros de los grupos *Polycomb* y *trithorax* puede aportar muchos datos nuevos sobre el papel funcional de estos genes en los procesos de proliferación y diferenciación celular, más allá de sus funciones como reguladores de genes homeóticos.

CONCLUSIONES

1. El mutante I(3)112411 de *Drosophila melanogaster*, semiletal y estéril, presenta toda una serie de fenotipos asociados, que se localizan fundamentalmente en el ala, el halterio y la pata. Las alas son de menor tamaño, presentan venas transversales ectópicas y en ocasiones pierden parcialmente el margen posterior. Además se detectan transformaciones parciales del halterio a ala y del primer segmento torácico en segundo.
2. El elemento *P-lacW*, responsable de la mutación, se encuentra insertado en el intrón de mayor tamaño del gen *absent, small or homeotic discs-2 (ash-2)*. El mutante I(3)112411 es un alelo hipomorfo, mientras que el alelo *ash-2^{l1}*, letal en fase de pupa, es probablemente un alelo de falta de función (nulo).
3. El análisis clonal de los alelos I(3)112411 y *ash-2^{l1}* demuestra que los clones homocigotos para estas mutaciones en el ala provocan una reducción drástica de las regiones de intervena, un ensanchamiento de las venas (a excepción de la vena L4), la disrupción de la morfología de las células del borde del ala y la aparición de efectos no autónomos celulares. En muchos casos, los tricomas que presentan las células que constituyen el clon son múltiples. Los clones homocigotos para la mutación en la pata provocan la desaparición de los peines tarsales, la reducción en la longitud e incremento de la amplitud de la extremidad y anomalías en las articulaciones de las patas.
4. *ash-2* parece estar implicado en el mantenimiento de la condición de intervena, actuando de forma directa o indirecta sobre la expresión de *blistered* e interaccionando con las rutas de los genes *plexus* y *crossveinless-2*.
5. Los alelos I(3)112411 y *ash-2^{l1}* se comportan como alelos clásicos de *ash-2*, modificando el fenotipo asociado al alelo *Antp^{Ns}* y regulando de forma positiva la expresión de *Ubx*.

En conjunto, los datos muestran que el gen *absent, small or homeotic discs-2* es requerido para regular procesos de diferenciación celular, además de regular genes homeóticos.

BIBLIOGRAFÍA

A

Abu-Shaar M. y Mann R.S. (1998). Generation of multiple antagonistic domains along the proximodistal axis during *Drosophila* leg development. *Development* **125**: 3821-3830.

Adams M.D., Celniker S.E., Holt R.A., Evans C.A., Gocayne J.D., Amanatides P.G., Scherer S.E., Li P.W., Hoskins R.A., Galle R.F., George R.A., Lewis S.E., Richards S., Ashburner M., Henderson S.N., Sutton G.G., Wortman J.R., Yandell M.D., Zhang Q., Chen L.X., Brandon R.C., Rogers Y.H.C., Blazej R.G., Champe M., Pfeiffer B.D., Wan K.H., Doyle C., Baxter E.G., Helt G., Nelson C.R., Gabor Miklos G.L., Abril J.F., Agbayani A., An H.J., Andrews-Pfannkoch C., Baldwin D., Ballew R.M., Basu A., Baxendale J., Bayraktaroglu L., Beasley E.M., Beeson K.Y., Benos P.V., Berman B.P., Bhandari D., Bolshakov S., Borkova D., Botchan M.R., Bouck J. y col. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**: 2185-2195.

Adamson A.L. y Shearn A. (1996). Molecular genetic analysis of *Drosophila ash2*, a member of the *trithorax* group required for imaginal disc pattern formation. *Genetics* **144**: 621-633.

Affolter M., Montagne J., Walldorf U., Groppe J., Kloter U., LaRosa M. y Gehring W.J. (1994). The *Drosophila* SRF homolog is expressed in a subset of tracheal cells and maps within a genomic region required for tracheal development. *Development* **120**: 743-753.

Akam M. (1987). The molecular basis for metameric pattern in the *Drosophila* embryo. *Development* **101**: 1-22.

Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. y Lipman D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.

Aza-Blanc P. y Kornberg T.B. (1999). Ci a complex transducer of the Hedgehog signal. *Trends in Genetics* **15**: 458-462.

Aza-Blanc P., Ramírez-Weber F.A., Laget M.P., Schwartz C. y Kornberg T.B. (1997). Proteolysis that is inhibited by Hedgehog targets Cubitus interruptus protein to the nucleus and converts it to a repressor. *Cell* **89**: 1043-1053.

B

Barrio R., Shea M.J., Carulli J., Lipkow K., Gaul U., Frommer G., Schuh R., Jäckle H. y Kafatos F.C. (1996). The *spalt-related* gene of *Drosophila melanogaster* is a member of an ancient gene family, defined by the adjacent, region-specific homeotic gene *spalt*. *Dev. Genes Evol.* **206**: 315-325.

Basler K. y Struhl G. (1994). Compartment boundaries and the control of *Drosophila* limb pattern by Hedgehog protein. *Nature* **368**: 208-214.

Bate M. y Martínez-Arias A. (1991). The embryonic origin of imaginal discs in *Drosophila*. *Development* **112**: 755-761.

Beachy P.A., Helfand S.L. y Hogness D.S. (1985). Segmental distribution of Bithorax complex proteins during *Drosophila* development. *Nature* **313**: 545-551.

Bel S., Coré N., Djabali M., Kieboom K., van der Lugt N., Alkema M.J. y van Lohuizen M. (1998). Genetic interactions and dosage effects of *Polycomb* group genes in mice. *Development* **125**: 3543-3551.

Bergson C. y McGinnis W. (1990). An autoregulatory enhancer element of the *Drosophila* homeotic gene *Deformed*. *The EMBO Journal* **9**: 4287-4297.

Biehs B., Sturtevant M.A. y Bier E. (1998). Boundaries in the *Drosophila* wing imaginal disc organize vein-specific genetic programs. *Development* **125**: 4245-4257.

Bienz M. y Müller J. (1995). Transcriptional silencing of homeotic genes in *Drosophila*. *BioEssays* **17**: 775-784.

Bier E. (2000). Drawing lines in the *Drosophila* wing: initiation of wing vein development. *Current Opinion in Genetics & Development* **10**: 393-398.

Bier E., Vaessin H., Shepherd S., Lee K., McCall K., Barbel S., Ackerman L., Carretto R., Uemura T., Grell E., Jan L.Y. y Jan Y.N. (1989). Searching for pattern and mutation in the *Drosophila* genome with a *P-lacZ* vector. *Genes & Development* **3**: 1273-1287.

Bishop S.A., Klein T., Martínez-Arias A. y Couso J.P. (1999). Composite signalling from *Serrate* and *Delta* establishes leg segments in *Drosophila* through *Notch*. *Development* **126**: 2993-3003.

Blair S.S. (1995). Compartments and appendage development in *Drosophila*. *BioEssays* **17**: 299-309.

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.

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.

Breen T.R. (1999). Mutant alleles of the *Drosophila trithorax* gene produce common and unusual homeotic and other developmental phenotypes. *Genetics* **152**: 319-344.

Brook W.J. y Cohen S.M. (1996). Antagonistic interactions between Wingless and Decapentaplegic responsible for dorsal-ventral pattern in the *Drosophila* leg. *Science* **273**: 1373-1377.

C

Carlson M. y Laurent B.C. (1994). The SNF/SWI family of global transcriptional activators. *Current Opinion in Cell Biology* **6**: 396-402.

Carroll S.B. (1995). Homeotic genes and the evolution of arthropods and chordates. *Nature* **376**: 479-485.

Carroll S.B. (1998). From pattern to gene, from gene to pattern. *Int. J. Dev. Biol.* **42**: 305-309.

Chinwalla V., Jane E.P. y Harte P.J. (1995). The *Drosophila* Trithorax protein binds to specific chromosomal sites and is co-localized with *Polycomb* at many sites. *The EMBO Journal* **14**: 2056-2065.

Chou T.B. y Perrimon N. (1992) Use of a yeast site-specific recombinase to produce female germline chimeras in *Drosophila*. *Genetics* **131**: 643-653.

Chuang P.T. y Kornberg T.B. (2000). On the range of Hedgehog signaling. *Current Opinion in Genetics & Development* **10**: 515-522.

Cohen S.M. (1993). Imaginal disc development. En "The development of *Drosophila melanogaster*" Vol. II (Ed. M. Bate y A. Martínez Arias). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. **13**: 747-841.

Cohen S.M., Brönner G., Küttner F., Jürgens G. y Jäckle H. (1989). *Distal-less* encodes a homeodomain protein required for limb development in *Drosophila*. *Nature* **338**: 432-434.

Collins R.T., Furukawa T., Tanese N. y Treisman J.E. (1999). Osa associates with the Brahma chromatin remodeling complex and promotes the activation of some target genes. *The EMBO Journal* **18**: 7029-7040.

Collins R.T. y Treisman J.E. (2000). Osa-containing Brahma chromatin remodeling complexes are required for the repression of Wingless target genes. *Genes & Development* **14**: 3140-3152.

Condie J.M., Mustand J.A. y Brower D.L. (1991). Generation of anti-Antennapedia monoclonal antibodies and Antennapedia protein expression in imaginal discs. *Drosophila Inf. Serv.* **70**: 52-54.

Conley C.A., Silburn R., Singer M.A., Ralston A., Rohwer-Nutter D., Olson D.J., Gelbart W. y Blair S.S. (2000). Crossveinless 2 contains cysteine-rich domains and is required for high levels of BMP-like activity during the formation of the cross veins in *Drosophila*. *Development* **127**: 3947-3959.

Coré N., Bel S., Gaunt S.J., Aurrand-Lions M., Pearce J., Fisher A. y Djabali M. (1997). Altered cellular proliferation and mesoderm patterning in *Polycomb-M33*-deficient mice. *Development* **124**: 721-729.

Couso J.P. y Bishop S.A. (1998). Proximo-distal development in the legs of *Drosophila*. *Int. J. Dev. Biol.* **42**: 345-352.

Cubas P., de Celis J.F., Campuzano S. y Modolell J. (1991). Proneural clusters of *achaete-scute* expression and the generation of sensory organs in the *Drosophila* imaginal wing disc. *Genes & Development* **5**: 996-1008.

D

Deák P., Omar M.M., Saunders R.D.C., Pál M., Komonyi O., Szidonya J., Maróy P., Zhang Y., Ashburner M., Benos P., Savakis C., Siden-Kiamos I., Louis C., Bolshakov V.N., Kafatos F.C., Madueno E., Modolell J. y Glover D.M. (1997). *P*-element insertion alleles of essential genes on the third chromosome of *Drosophila melanogaster*: correlation of physical and cytogenetic maps in chromosomal region 86E-87F. *Genetics* **147**: 1697-1722.

de Celis J.F. (1997). Expression and function of *decapentaplegic* and *thick veins* during the differentiation of the veins in the *Drosophila* wing. *Development* **124**: 1007-1018.

de Celis J.F. (1998). Positioning and differentiation of veins in the *Drosophila* wing. *Int. J. Dev. Biol.* **42**: 335-343.

de Celis J.F. y Barrio R. (2000). Function of the *spalt/spalt-related* gene complex in positioning the veins in the *Drosophila* wing. *Mechanisms of Development* **91**: 31-41.

de Celis J.F., Barrio R. y Kafatos F.C. (1996). A gene complex acting downstream of *dpp* in *Drosophila* wing morphogenesis. *Nature* **381**: 421-424.

de Celis J.F. y Bray S. (1997). Feed-back mechanisms affecting Notch activation at the dorsoventral boundary in the *Drosophila* wing. *Development* **124**: 3241-3251.

de Celis J.F., Bray S. y García-Bellido A. (1997). Notch signalling regulates *veinlet* expression and establishes boundaries between veins and interveins in the *Drosophila* wing. *Development* **124**: 1919-1928.

de Celis, J.F. y García-Bellido A. (1994). Roles of the *Notch* gene in *Drosophila* wing morphogenesis. *Mechanisms of Development* **46**: 109-122.

de Celis, J.F., Llimargas M. y Casanova J. (1995). *ventral veinless*, the gene encoding the Cf1a transcription factor, links positional information and cell differentiation during embryonic and imaginal development in *Drosophila melanogaster*. *Development* **121**: 3405-3416.

de Celis, J.F., Marí-Beffa M. y García-Bellido A. (1991). Cell-autonomous role of Notch, an epidermal growth factor homologue, in sensory organ differentiation in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 632-636.

de Celis J.F., Tyler D.M., de Celis J. y Bray S.J. (1998). Notch signalling mediates segmentation of the *Drosophila* leg. *Development* **125**: 4617-4626.

Denell R.E., Brown S.J. y Beeman R.W. (1996). Evolution of the organization and function of insect homeotic complexes. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **7**: 527-538.

Díaz-Benjumea F.J., Cohen B. y Cohen S.M. (1994). Cell interaction between compartments establishes the proximal-distal axis of *Drosophila* legs. *Nature* **372**: 175-179.

Díaz-Benjumea F.J. y Cohen S.M. (1993). Interaction between dorsal and ventral cells in the imaginal disc directs wing development in *Drosophila*. *Cell* **75**: 741-752.

Díaz-Benjumea F.J. y García-Bellido A. (1990). Genetic analysis of the wing vein pattern of *Drosophila*. *Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology* **198**: 336-354.

Díaz-Benjumea F.J. y Hafen E. (1994). The sevenless signalling cassette mediates *Drosophila* EGF receptor function during epidermal development. *Development* **120**: 569-578.

Djabali M., Selleri L., Parry P., Bower M., Young B.D. y Evans G.A. (1992). A *trithorax*-like gene is interrupted by chromosome 11q23 translocations in acute leukaemias. *Nature genetics* **2**: 113-118.

E

Elfring L.K., Daniel C., Papoulas O., Deuring R., Sarte M., Moseley S., Beek S.J., Waldrip W.R., Daubresse G., DePace A., Kennison J.A. y Tamkun J.W. (1998). Genetic analysis of *brahma*: The *Drosophila* homolog of the yeast chromatin remodeling factor SWI2/SNF2. *Genetics* **148**: 251-265.

F

Farkas G., Leibovitch B.A. y Elgin S.C.R. (2000). Chromatin organization and transcriptional control of gene expression in *Drosophila*. *Gene* **253**: 117-136.

Freeman M., Klämbt C., Goodman C.S. y Rubin G.M. (1992). The *argos* gene encodes a diffusible factor that regulates cell fate decisions in the *Drosophila* eye. *Cell* **69**: 963-975.

Fristrom D. y Fristrom J.W. (1975). The mechanism of evagination of imaginal discs of *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology* **43**: 1-23.

Fristrom D. y Fristrom J.W. (1993). The metamorphic development of the adult epidermis. En "The development of *Drosophila melanogaster*" Vol. II (Ed. M. Bate y A. Martínez Arias). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. **14**: 843-897.

Fristrom D., Gotwals P., Eaton S., Kornberg T.B., Sturtevant M., Bier E. y Fristrom J.W. (1994). *blistered*: a gene required for vein/intervein formation in wings of *Drosophila*. *Development* **120**: 2661-2671.

Fristrom D., Wilcox M. y Fristrom J. (1993). The distribution of PS integrins, laminin A and F-actin during key stages in *Drosophila* wing development. *Development* **117**: 509-523.

G

García-Bellido A. (1977). Inductive mechanisms in the process of wing vein formation in *Drosophila*. *Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology* **182**: 93-106.

García-Bellido A., Cortés F. y Milán M. (1994). Cell interactions in the control of size in *Drosophila* wings. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 10222-10226.

García-Bellido A. y de Celis J.F. (1992). Developmental genetics of the venation pattern of *Drosophila*. *Annual Rev. Genet.* **26**: 277-304.

García-Bellido A. y Merriam J.R. (1971). Parameters of the wing imaginal disc development of *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology* **24**: 61-87.

García-Bellido A. y Ripoll P. (1978). Cell lineage and differentiation. En: Genetics and Cell Differentiation. Editado por W. Gehring, *Springer-Verlag*: 119-156.

García-Bellido A., Ripoll P. y Morata G. (1973). Developmental compartmentalisation of the wing disc of *Drosophila*. *Nature New Biology* **245**: 251-253.

Gatti M. y Baker B.S. (1989). Genes controlling essential cell-cycle functions in *Drosophila melanogaster*. *Genes & Development* **3**: 438-453.

Gaunt S.J. y Singh P.B. (1990). Homeogene expression patterns and chromosomal imprinting. *Trends in Genetics* **6**: 208-212.

Gellon G. y McGinnis W. (1998). Shaping animal body plans in development and evolution by modulation of *Hox* expression patterns. *BioEssays* **20**: 116-125.

Ghysen A. y Dambly-Chaudière C. (1989). Genesis of the *Drosophila* peripheral nervous system. *Trends in Genetics* **5**: 251-255.

Golic K.G. (1991). Site-specific recombination between homologous chromosomes in *Drosophila*. *Science* **252**: 958-961.

Golic K.G. y Lindquist S. (1989). The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome. *Cell* **59**: 499-509.

Gómez-Skarmeta J.L., Diez del Corral R., de la Calle-Mustienes E., Ferrés-Marcó D. y Modolell J. (1996). *araucan* and *caupolican*, two members of the novel Iroquois complex, encode homeoproteins that control proneural and vein-forming genes. *Cell* **85**: 95-105.

Gómez-Skarmeta J.L. y Modolell J. (1996). *araucan* and *caupolican* provide a link between compartment subdivisions and patterning of sensory organs and veins in the *Drosophila* wing. *Genes & Development* **10**: 2935-2945.

González-Crespo S., Abu-Shaar M., Torres M., Martínez-A C., Mann R.S. y Morata G. (1998). Antagonism between *extradenticle* function and Hedgehog signalling in the developing limb. *Nature* **394**: 196-200.

González-Gaitán M., Capdevila M.P. y García-Bellido A. (1994). Cell proliferation patterns in the wing imaginal disc of *Drosophila*. *Mechanisms of Development* **40**: 183-200.

González-Gaitán M., Micol J.L. y García-Bellido A. (1990). Developmental genetic analysis of *Contrabithorax* mutations in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **126**: 139-155.

Goodrich J., Puangsomlee P., Martin M., Long D., Meyerowitz E.M. y Coupland G. (1997). A *Polycomb*-group gene regulates homeotic gene expression in *Arabidopsis*. *Nature* **386**: 44-51.

Gould A. (1997). Functions of mammalian *Polycomb* group and *trithorax* group related genes. *Current Opinion in Genetics & Development* **7**: 488-494.

Gu Y., Nakamura T., Alder H., Prasad R., Canaani O., Cimino G., Croce C.M. y Canaani E. (1992). The t(4;11) chromosome translocation of human acute leukemias fuses the *ALL-1* gene, related to *Drosophila trithorax*, to the *AF-4* gene. *Cell* **71**: 701-708.

H

Hafen E., Levine M. y Gehring W.J. (1984). Regulation of *Antennapedia* transcript distribution by the *bithorax* complex in *Drosophila*. *Nature* **307**: 287-289.

Hammerschmidt M., Brook A. y McMahon A.P. (1997). The world according to *hedgehog*. *Trends in Genetics* **13**: 14-21.

Hartenstein V. y Posakony J.W. (1989). Development of adult sensilla on the wing and notum of *Drosophila melanogaster*. *Development* **107**: 389-405.

Hayashi S. (1996). A Cdc2 dependent checkpoint maintains diploidy in *Drosophila*. *Development* **122**: 1051-1058.

Held L.I.Jr. (1995). Axes, boundaries and coordinates: the ABCs of fly leg development. *BioEssays* **17**: 721-732.

Henikoff S. (1990). Position-effect variegation after 60 years. *Trends in Genetics* **6**: 422-426.

Huppert S.S., Jacobsen T.L. y Muskavitch M.A.T. (1997). Feedback regulation is central to Delta-Notch signalling required for *Drosophila* wing vein morphogenesis. *Development* **124**: 3283-3291.

I

Ikegawa S., Isomura M., Koshizuka Y. y Nakamura Y. (1999). Cloning and characterization of *ASH2L* and *Ash2l*, human and mouse homologs of the *Drosophila ash-2* gene. *Cytogenet. Cell Genet.* **84**: 167-172.

Ingham P.W. (1981). *trithorax*: a new homeotic mutation of *Drosophila melanogaster*. II The role of *trx*⁺ after embryogenesis. *Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology* **190**: 365-369.

Ingham P.W. (1985). A clonal analysis of the requirement for the *trithorax* gene in the diversification of segments in *Drosophila*. *J. Embryol. exp. Morph.* **89**: 349-365.

Ingham P.W. (1988). The molecular genetics of embryonic pattern formation in *Drosophila*. *Nature* **335**: 25-34.

Ingham P.W. (1998a). Transducing Hedgehog: the story so far. *The EMBO Journal* **17**: 3505-3511.

Ingham P.W. (1998b). *trithorax* and the regulation of homeotic gene expression in *Drosophila*: a historical perspective. *Int. J. Dev. Biol.* **42**: 423-429.

Irvine K.D., Botas J., Jha S., Mann R.S. y Hogness D.S. (1993). Negative autoregulation by *Ultrabithorax* controls the level and pattern of its expression. *Development* **117**: 387-399.

J

Jacobs J.J.L., Kieboom K., Marino S., DePinho R.A. y van Lohuizen M. (1999). The oncogene and *Polycomb*-group gene *bmi-1* regulates cell proliferation and senescence through the *ink4a* locus. *Nature* **397**: 164-168.

Jan Y.N. y Jan L.Y. (1990). Genes required for specifying cell fates in *Drosophila* embryonic sensory nervous system. *TINS* **13**: 493-498.

Janning W. (1997). *FlyView*, a *Drosophila* image database, and other *Drosophila* databases. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **8**: 469-475.

Johnson R.L., Grenier J.K. y Scott M.P. (1995). *patched* overexpression alters wing disc size and pattern: transcriptional and post-transcriptional effects on *hedgehog* targets. *Development* **121**: 4161-4170.

Johnston D. St. y Nüsslein-Volhard C. (1992). The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell* **68**: 201-219.

K

Kalderon D. (1997). Hedgehog signalling: Ci complex cuts and clasps. *Current Biology* **7**: R759-R762.

Kelley M.R., Kidd S., Berg R.L. y Young M.W. (1987). Restriction of *P*-element insertions at the *Notch* locus of *Drosophila melanogaster*. *Molecular and Cellular Biology*. **April**: 1545-1548.

Kennison J.A. (1993). Transcriptional activation of *Drosophila* homeotic genes from distant regulatory elements. *Trends in Genetics* **9**: 75-79.

Kennison J.A. (1995). The Polycomb and Trithorax group proteins of *Drosophila*: Trans-regulators of homeotic gene function. *Annual Rev. Genetics* **29**: 289-303.

Kennison J.A. y Tamkun J.W. (1988). Dosage-dependent modifiers of *Polycomb* and *Antennapedia* mutations in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 8136-8140.

Kiss I., Bencze G., Fekete E., Fodor A., Gausz J., Maróy P., Szabad J. y Szidonya J. (1976). Isolation and characterization of X-linked lethal mutants affecting differentiation of the imaginal discs in *Drosophila melanogaster*. *Theoretical and Applied Genetics* **48**: 217-226.

Kojima T., Sato M. y Saigo K. (2000). Formation and specification of distal leg segments in *Drosophila* by dual *Bar* homeobox genes, *BarH1* and *BarH2*. *Development* **127**: 769-778.

Kühnlein R.P., Frommer G., Friedrich M., González-Gaitán M., Weber A., Wagner-Bernholz J.F., Gehring W.J., Jäckle H. y Schuh R. (1994). *spalt* encodes an evolutionarily conserved zinc finger protein of novel structure which provides homeotic gene function in the head and tail region of the *Drosophila* embryo. *The EMBO Journal* **13**: 168-179.

L

LaJeunesse D. y Shearn A. (1995). Trans-regulation of thoracic homeotic selector genes of the *Antennapedia* and *bithorax* complexes by the *trithorax* group genes: *absent*, *small*, and *homeotic discs 1* and *2*. *Mechanisms of Development* **53**: 123-139.

Lawrence P.A. y Struhl G. (1996). Morphogens, compartments, and pattern: lessons from *Drosophila*?. *Cell* **85**: 951-961.

Lecuit T. y Cohen S.M. (1997). Proximal-distal axis formation in the *Drosophila* leg. *Nature* **388**: 139-145.

Lewis E.B. (1955). Some aspects of position pseudoallelism. *The American Naturalist* **89**: 73-89.

Lewis E.B. (1963). Genes and developmental pathways. *American Zoologist* **3**: 33-56.

Lewis E.B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* **276**: 565-570.

Lewis E.B. (1998). The *bithorax* complex: the first fifty years. *Int. J. Dev. Biol.* **42**: 403-415.

Leyns L., Gómez-Skarmeta J.L. y Dambly-Chaudière C. (1996). *iroquois*: a prepattern gene that controls the formation of bristles on the thorax of *Drosophila*. *Mechanisms of Development* **59**: 63-72.

Lindsley D.L. y Zimm G.G. (1992). The genome of *Drosophila melanogaster*. *Academic Press, Inc., San Diego*.

Llimargas M. y Casanova J. (1997). *ventral veinless*, a POU domain transcription factor, regulates different transduction pathways required for tracheal branching in *Drosophila*. *Development* **124**: 3273-3281.

Look A.T. (1997). Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* **278**: 1059-1064.

Lunde K., Biehs B., Nauber U. y Bier E. (1998). The *knirps* and *knirps-related* genes organize development of the second wing vein in *Drosophila*. *Development* **125**: 4145-4154.

M

Martín-Blanco E., Roch F., Noll E., Baonza A., Duffy J.B. y Perrimon N. (1999). A temporal switch in DER signaling controls the specification and differentiation of veins and interveins in the *Drosophila* wing. *Development* **126**: 5739-5747.

Matakatsu H., Tadakoro R., Gamo S. y Hayashi S. (1999). Repression of the wing vein development in *Drosophila* by the nuclear matrix protein Plexus. *Development* **126**: 5207-5216.

Micchelli C.A., Rulifson E. y Blair S.S. (1997). The function and regulation of *cut* expression on the wing margin of *Drosophila*: Notch, Wingless and a dominant negative role for Delta and Serrate. *Development* **124**: 1485-1495.

Milán M., Campuzano S. y García-Bellido A. (1996a). Cell cycling and patterned cell proliferation in the wing primordium of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 640-645.

Milán M., Campuzano S. y García-Bellido A. (1996b). Cell cycling and patterned cell proliferation in the *Drosophila* wing during metamorphosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 11687-11692.

Milán M. y Cohen S.M. (2000a). Temporal regulation of Apterous activity during development of the *Drosophila* wing. *Development* **127**: 3069-3078.

Milán M. y Cohen S.M. (2000b). Subdividing cell populations in the developing limbs of *Drosophila*: Do wing veins and leg segments define units of growth control?. *Developmental Biology* **217**: 1-9.

Mohler J., Seecoomar M., Agarwal S., Bier E. y Hsai J. (2000). Activation of *knot* (*kn*) specifies the 3-4 intervein region in the *Drosophila* wing. *Development* **127**: 55-63.

Mohler J.D. y Swedberg G.S. (1964). Wing vein development in *crossveinless-like* strains of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **50**: 1403-1419.

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

Morata G. y García-Bellido A. (1976). Developmental analysis of some mutants of the Bithorax system of *Drosophila*. *Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology* **179**: 125-143.

Morata G. y Lawrence P.A. (1975). Control of compartment development by the *engrailed* gene in *Drosophila*. *Nature* **255**: 614-617.

Morata G. y Ripoll R. (1975). *Minutes*: Mutants of *Drosophila* autonomously affecting cell division rate. *Developmental Biology* **42**: 211-221.

Müller J., Gaunt S. y Lawrence P.A. (1995). Function of the Polycomb protein is conserved in mice and flies. *Development* **121**: 2847-2852.

Mullor J.L., Calleja M., Capdevila J. y Guerrero I. (1997). Hedgehog activity, independent of Decapentaplegic, participates in wing disc patterning. *Development* **124**: 1227-1237.

N

Nestoras K., Lee H. y Mohler J. (1997). Role of *knot* (*kn*) in wing patterning in *Drosophila*. *Genetics* **147**: 1203-1212.

Neumann C. y Cohen S.M. (1997). Morphogens and pattern formation. *BioEssays* **19**: 721-729.

Nussbaumer U., Halder G., Groppe J., Affolter M. y Montagne J. (2000). Expression of the *blistered/DSRF* gene is controlled by different morphogens during *Drosophila* trachea and wing development. *Mechanism of Development* **96**: 27-36.

Nusse R. (1996). Patching up Hedgehog. *Nature* **384**: 119-120.

O

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.

Orenic T.V., Slusarski D.C., Kroll K.L. y Holmgren R.A. (1990). Cloning and characterization of the segment polarity gene *cubitus interruptus* Dominant of *Drosophila*. *Genes & Development* **4**: 1053-1067.

Orlando V., Jane E.P., Chinwalla V., Harte P.J. y Paro R. (1998). Binding of Trithorax and Polycomb proteins to the *bithorax* complex: dynamic changes during early *Drosophila* embryogenesis. *The EMBO Journal* **17**: 5141-5150.

Orlando V. y Paro R. (1995). Chromatin multiprotein complexes involved in the maintenance of transcription patterns. *Current Opinion in Genetics & Development* **5**: 174-179.

P

Palka J., Schubiger M. y Schwaninger H. (1990). Neurogenic and antineurogenic effects from modifications at the *Notch* locus. *Development* **109**: 167-175.

Papoulas O., Beek S.J., Moseley S.L., McCallum C.M., Sarte M., Shearn A. y Tamkun J.W. (1998). The *Drosophila* Trithorax group proteins Brm, Ash-1 and Ash-2 are subunits of distinct protein complexes. *Development* **125**: 3955-3966.

Paro R. (1990). Imprinting a determined state into the chromatin of *Drosophila*. *Trends in Genetics* **6**: 416-421.

Paro R. (1993). Mechanisms of heritable gene repression during development of *Drosophila*. *Current Opinion in Cell Biology* **5**: 999-1005.

Patel N.H., Martín-Blanco E., Coleman K.G., Poole S.J., Ellis M.C., Kornberg T.B. y Goodman C.S. (1989). Expression of Engrailed proteins in arthropods, annelids, and chordates. *Cell* **58**: 955-968.

Peterson C.L. y Workman J.L. (2000). Promoter targeting and chromatin remodeling by the SWI/SNF complex. *Current Opinion in Genetics & Development* **10**: 187-192.

Phillips R.G., Roberts I.J.H., Ingham P.W. y Whittle J.R.S. (1990). The *Drosophila* segment polarity gene *patched* is involved in a position-signalling mechanism in imaginal discs. *Development* **110**: 105-114.

Pirrotta V. (1986). Cloning *Drosophila* genes. En Roberts DB (ed). *Drosophila: a practical approach*. IRL Press: 334-351.

Pirrotta V. (1997a). Chromatin-silencing mechanisms in *Drosophila* maintain patterns of gene expression. *Trends in Genetics* **13**: 314-318.

Pirrotta V. (1997b). Pc-G complexes and chromatin silencing. *Current Opinion in Genetics & Development* **7**: 249-258.

Pirrotta V. (1998). Polycomb the genome: Pc-G, *trx-G*, and chromatin silencing. *Cell* **93**: 333-336.

Pirrotta V. y Rastelli L. (1994). *white* gene expression, repressive chromatin domains and homeotic gene regulation in *Drosophila*. *BioEssays* **16**: 549-556.

Podos S.D. y Ferguson E.L. (1999). Morphogen gradients new insights from Dpp. *Trends in Genetics* **15**: 396-402.

Posakony L.G., Raftery L.A. y Gelbart W.M. (1991). Wing formation in *Drosophila melanogaster* requires *decapentaplegic* gene function along the anterior-posterior compartment boundary. *Mechanisms of Development* **33**: 69-82.

R

Roch F. y Akam M. (2000). *Ultrabithorax* and the control of cell morphology in *Drosophila* halteres. *Development* **127**: 97-107.

Roch F., Baonza A., Martín-Blanco E. y García-Bellido A. (1998a). Genetic interactions and cell behaviour in *blistered* mutants during proliferation and differentiation of the *Drosophila* wing. *Development* **125**: 1823-1832.

Roch F., Serras F., Cifuentes F.J., Corominas M., Alsina B., Amorós M., López-Varea A., Hernández R., Guerra D., Cavicchi S., Baguñá J. y García-Bellido A. (1998b). Screening of larval/pupal *P*-element induced lethals on the second chromosome in *Drosophila melanogaster*: clonal analysis and morphology of imaginal discs. *Mol. Gen. Genet.* **257**: 103-112.

Rodríguez I. y Basler K. (1997). Control of compartmental affinity boundaries by Hedgehog. *Nature* **389**: 614-618.

Rong Y.S. y Golic K.G. (2000). Gene targeting by homologous recombination in *Drosophila*. *Science* **288**: 2013-2018.

Rørth P. (1996). A modular misexpression screen in *Drosophila* detecting tissue-specific phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 12418-12422.

Rørth P., Szabo K., Bailey A., Lavery T., Rehm J., Rubin G.M., Weigmann K., Milán M., Benes V., Ansorge W. y Cohen S.M. (1998). Systematic gain-of-function genetics in *Drosophila*. *Development* **125**: 1049-1057.

S

Salser S.J. y Kenyon C. (1994). Patterning *C. elegans*: homeotic cluster genes, cell fates and cell migrations. *Trends in Genetics* **10**: 159-164.

Salzberg A., Prokopenko S.N., He Y., Tsai P., Pál M., Maróy P., Glover D.M., Deák P. y Bellen H.J. (1997). *P*-element insertion alleles of essential genes on the third chromosome of *Drosophila melanogaster*: Mutations affecting embryonic PNS development. *Genetics* **147**: 1723-1741.

Sanicola M., Sekelsky J., Elson S. y Gelbart W.M. (1995). Drawing a stripe in *Drosophila* imaginal discs: Negative regulation of *decapentaplegic* and *patched* expression by *engrailed*. *Genetics* **139**: 745-756.

Sawamoto K., Okano H., Kobayakawa Y., Hayashi S., Mikoshiba K., y Tanimura T. (1994). The function of *argos* in regulating cell fate decisions during *Drosophila* eye and wing vein development. *Developmental Biology* **164**: 267-276.

Schnepp B., Grumbling G., Donaldson T. y Simcox A. (1996). Vein is a novel component in the *Drosophila* epidermal growth factor receptor pathway with similarity to the neuregulins. *Genes & Development* **10**: 2302-2313.

Schubiger M. y Palka J. (1987). Changing spatial patterns of DNA replication in the developing wing of *Drosophila*. *Developmental Biology* **123**: 145-153.

Schumacher A. Faust C. y Magnuson T. (1996). Positional cloning of a global regulator of anterior-posterior patterning in mice. *Nature* **383**: 250-253.

Schumacher A. y Magnuson T. (1997). Murine *Polycomb*- and *trithorax*-group genes regulate homeotic pathways and beyond. *Trends in Genetics* **13**: 167-170.

Schweitzer R., Howes R., Smith R., Shilo B.Z. y Freeman M. (1995). Inhibition of *Drosophila* EGF receptor activation by the secreted protein Argos. *Nature* **376**: 699-702.

Schweitzer R. y Shilo B.Z. (1997). A thousand and one roles for the *Drosophila* EGF receptor. *Trends in Genetics* **13**: 191-196.

Serrano N. y O'Farrell P.H. (1997). Limb morphogenesis: connections between patterning and growth. *Current Biology* **7**: R186-R195.

Shearn A. (1974). Complementation analysis of late lethal mutants of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **77**: 115-125.

Shearn A. (1989). The *ash-1*, *ash-2* and *trithorax* genes of *Drosophila melanogaster* are functionally related. *Genetics* **121**: 517-525.

Shearn A. y Garen A. (1974). Genetic control of imaginal disc development in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**: 1393-1397.

Shearn A., Hersperger E. y Hersperger G. (1987). Genetic studies of mutations at two loci of *Drosophila melanogaster* which cause a wide variety of homeotic transformations. *Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology* **196**: 231-242.

Shearn A., Rice T., Garen A., y Gehring W. (1971). Imaginal disc abnormalities in lethal mutants of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**: 2594-2598.

Shilatifard A., Lane W.S., Jackson K.W., Conaway R.C. y Conaway J.W. (1996). An RNA polymerase II elongation factor encoded by the human *ELL* gene. *Science* **271**: 1873-1876.

Simcox A.A., Grumbling G., Schnepf B., Bennington-Mathias C., Hersperger E. y Shearn A. (1996). Molecular, phenotypic, and expression analysis of *vein*, a gene required for growth of the *Drosophila* wing disc. *Developmental Biology* **177**: 475-489.

Smith R.F., Wiese B.A., Wojzynski M.K., Davidson D.B., Worley K.C. (1996). BCM Search Launcher – an integrated interface to molecular biology data base search and analysis services available on the World Wide Web. *Genome Res.* **6**: 454-462.

Spradling A.C., Stern D., Beaton A., Rhem E.J., Lavery T., Mozden N., Misra S. y Rubin G.M. (1999). The Berkeley *Drosophila* genome project gene disruption

project: Single *P*-element insertions mutating 25% of vital *Drosophila* genes. *Genetics* **153**: 135-177.

Spradling A.C., Stern D.M., Kiss I., Roote J., Lavery T. y Rubin G.M. (1995). Gene disruptions using *P* transposable elements: An integral component of the *Drosophila* genome project. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 10824-10830.

Steller H. y Pirrotta V. (1985). A transposable *P* vector that confers selectable G418 resistance to *Drosophila* larvae. *The EMBO Journal* **4**: 167-171.

Stern C. (1936). Somatic crossing over and segregation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **21**: 625-730.

Stewart M., Murphy C. y Fristrom J.W. (1972). The recovery and preliminary characterization of X chromosome mutants affecting imaginal discs of *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology* **27**: 71-83.

Strigini M. y Cohen S.M. (1997). A Hedgehog activity gradient contributes to AP axial patterning of the *Drosophila* wing. *Development* **124**: 4697-4705.

Struhl G. (1981). A homeotic mutation transforming leg to antenna in *Drosophila*. *Nature* **292**: 635-638.

Struhl G. (1982). Genes controlling segmental specification in the *Drosophila* thorax. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 7380-7384.

Strutt H. y Paro R. (1997). The Polycomb group protein complex of *Drosophila melanogaster* has different compositions at different target genes. *Molecular and Cellular Biology* **17**: 6773-6783.

Sturtevant M.A., Biehs B., Marin E. y Bier E. (1997). The *spalt* gene links the A/P compartment boundary to a linear adult structure in the *Drosophila* wing. *Development* **124**: 21-32.

Sturtevant M.A. y Bier E. (1995). Analysis of the genetic hierarchy guiding wing vein development in *Drosophila*. *Development* **121**: 785-801.

Sturtevant M.A., O'Neill J.W. y Bier E. (1994). Down-regulation of *Drosophila Egf-r* mRNA levels following hyperactivated receptor signaling. *Development* **120**: 2593-2600.

Sturtevant M.A., Roark M. y Bier E. (1993). The *Drosophila rhomboid* gene mediates the localized formation of wing veins and interacts genetically with components of the EGF-R signaling pathway. *Genes & Development* **7**: 961-973.

Sudarsanam P. y Winston F. (2000). The *Swi/Snf* family. Nucleosome-remodeling complexes and transcriptional control. *Trends in Genetics* **16**: 345-350.

T

Tabata T. y Kornberg T.B. (1994). Hedgehog is a signaling protein with a key role in patterning *Drosophila* imaginal discs. *Cell* **76**: 89-102.

Takahara Y., Tomotsune D., Shirai M., Katoh-Fukui Y., Nishii K., Motaleb M.A., Nomura M., Tsuchiya R., Fujita Y., Shibata Y., Higashinakagawa T. y Shimada K. (1997). Targeted disruption of the mouse homologue of the *Drosophila polyhomeotic* gene leads to altered anteroposterior patterning and neural crest defects. *Development* **124**: 3673-3682.

Talbert P.B. y Garber R.L. (1994). The *Drosophila* homeotic mutation *Nasobemia* (*Antp^{Ns}*) and its revertants: an analysis of mutational reversion. *Genetics* **138**: 709-720.

Tamkun J.W. (1995). The role of Brahma and related proteins in transcription and development. *Current Opinion in Genetics and Development* **5**: 473-477.

Tkachuk D.C., Kohler S. y Cleary M.L. (1992). Involvement of a homolog of *Drosophila* Trithorax by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias. *Cell* **71**: 691-700.

Török T., Tick G., Alvarado M. y Kiss I. (1993). *P-lacW* insertional mutagenesis on the second chromosome of *Drosophila melanogaster*: Isolation of lethals with different overgrowth phenotypes. *Genetics* **135**: 71-80.

Turner C.M. y Alder P.N. (1998). Distinct roles for the actin and microtubule cytoskeletons in the morphogenesis of epidermal hairs during wing development in *Drosophila*. *Mechanisms of Development* **70**: 181-192.

V

van der Lugt N.M.T., Alkema M., Berns A. y Deschamps J. (1996). The *Polycomb*-group homolog Bmi-1 is a regulator of murine *Hox* gene expression. *Mechanisms of Development* **58**: 153-164.

van Lohuizen M. (1999). The *trithorax*-group and *Polycomb*-group chromatin modifiers: implications for disease. *Current Opinion in Genetics & Development* **9**: 355-361.

Vervoort M. (2000). *hedgehog* and wing development in *Drosophila*: a morphogen at work?. *BioEssays* **22**: 460-468.

Vervoort M., Crozatier M., Valle D. y Vincent A. (1999). The COE transcription factor Collier is a mediator of short-range Hedgehog-induced patterning of the *Drosophila* wing. *Current Biology* **9**: 632-639.

von Kalm L., Fristrom D., Fristrom J. (1995). The making of a fly leg: a model for epithelial morphogenesis. *BioEssays* **17**: 693-702.

W

Wade P.A. y Wolffe A.P. (1999). Transcriptional regulation: SWItching circuitry. *Current Biology* **9**: R221-R224.

Weatherbee S.D. y Carroll S.B. (1999). Selector genes and limb identity in arthropods and vertebrates. *Cell* **97**: 283-286.

Weatherbee S.D., Halder G., Kim J., Hudson A. y Carroll S. (1998). Ultrabithorax regulates genes at several levels of the wing-patterning hierarchy to shape the development of the *Drosophila* haltere. *Genes & Development* **12**: 1474-1482.

Weatherbee S.D., Nijhout H.F., Grunert L.W., Halder G., Galant R., Selegue J. y Carroll S. (1999). *Ultrabithorax* function in butterfly wings and the evolution of insect wing patterns. *Current Biology* **9**: 109-115.

Weigmann K., Cohen S.M. y Lehner C.F. (1997). Cell cycle progression, growth and patterning in imaginal discs despite inhibition of cell division after inactivation of *Drosophila* Cdc2 kinase. *Development* **124**: 3555-3563.

White R.A.H. y Wilcox M. (1984). Protein products of the Bithorax complex in *Drosophila*. *Cell* **39**: 163-171.

Williams J.A. y Carroll S.B. (1993). The origin, patterning and evolution of insect appendages. *BioEssays* **15**: 567-577.

Williams J.A., Paddock S.W., Vorwerk F. y Carroll S.B. (1994). Organization of wing formation and induction of a wing-patterning gene at the dorsal/ventral compartment boundary. *Nature* **368**: 299-305.

Winston F. y Carlson M. (1992). Yeast SNF/SWI transcriptional activators and the SPT/SIN chromatin connection. *Trends in Genetics* **8**: 387-391.

Wolper L., Beddington R., Brockes J., Jessell T., Lawrence P. y Meyerowitz E. (1998). Principles of Development. *Oxford University Press*.

Wong L.L. y Adler P.N. (1993). Tissue polarity genes of *Drosophila* regulate the subcellular location for prehair initiation in pupal wing cells. *The Journal of Cell Biology* **123**: 209-221.

Wu J. y Cohen S.M. (1999). Proximodistal axis formation in the *Drosophila* leg: subdivision into proximal and distal domains by Homothorax and Distal-less. *Development* **126**: 109-117.

X

Xu T. y Rubin G.R. (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* **117**: 1223-1237.

Y

Yu B.D., Hess J.L., Horning S.E., Brown G.A.J. y Korsmeyer S.J. (1995). Altered *Hox* expression and segmental identity in *Mil*-mutant mice. *Nature* **378**: 505-508.

Yu K., Sturtevant M.A., Biehs B., François V., Padgett R.W., Blackman R.K. y Bier E. (1996). The *Drosophila decapentaplegic* and *short gastrulation* genes function antagonistically during adult wing vein development. *Development* **122**: 4033-4044.

Z

Zecca M., Basler K. y Struhl G. (1995). Sequential organizing activities of *engrailed*, *hedgehog* and *decapentaplegic* in the *Drosophila* wing. *Development* **121**: 2265-2278.

Zink B. y Paro R. (1989). *In vivo* binding pattern of a *trans*-regulator of homeotic genes in *Drosophila melanogaster*. *Nature* **337**: 468-471.

ABREVIATURAS

<i>ab</i>	<i>abrupt</i>
<i>abd-A</i>	<i>abdominal-A</i>
<i>Abd-B</i>	<i>Abdominal-B</i>
<i>ac</i>	<i>achaete</i>
<i>ALL-1</i>	homólogo humano del gen <i>trx</i> , también conocido como <i>HRX</i> , <i>MLL</i> y <i>HTRX1</i>
<i>Antp</i>	<i>Antennapedia</i>
<i>Antp^{Ns}</i>	<i>Nasobemia</i> , alelo de ganancia de función de <i>Antp</i>
<i>ANTP-C</i>	complejo <i>Antennapedia</i>
<i>aos</i>	<i>argos</i>
<i>ap</i>	<i>apterous</i>
<i>ara</i>	<i>araucan</i>
<i>ash-1</i>	<i>absent, small or homeotic discs-1</i>
<i>ash-2</i>	<i>absent, small or homeotic discs-2</i>
<i>Ax</i>	<i>Abruptex</i>
<i>bld</i>	<i>bold</i>
<i>brm</i>	<i>brahma</i>
<i>bs</i>	<i>blistered</i>
<i>BX-C</i>	complejo <i>bithorax</i>
<i>caup</i>	<i>caupolican</i>
<i>ci</i>	<i>cubitus interruptus</i>
<i>clf</i>	<i>curly leaf</i>
<i>col</i>	<i>collier</i>
<i>cut</i>	<i>cut</i>
<i>cv-2</i>	<i>crossveinless-2</i>
<i>dac</i>	<i>dachshund</i>
<i>DER</i>	receptor del factor de crecimiento epidérmico de <i>Drosophila</i>
<i>Dfd</i>	<i>Deformed</i>
<i>DI</i>	<i>Delta</i>
<i>DII</i>	<i>Distal-less</i>
<i>dpp</i>	<i>decapentaplegic</i>
<i>en</i>	<i>engrailed</i>

Abreviaturas

<i>E(spl)</i>	<i>Enhancer of split</i>
<i>exd</i>	<i>extradenticle</i>
<i>f</i>	<i>forked</i>
<i>hh</i>	<i>hedgehog</i>
<i>Hom</i>	conjunto de genes homeóticos de <i>Drosophila</i>
<i>Hox</i>	conjunto de genes homeóticos
<i>hth</i>	<i>homothorax</i>
<i>iro</i>	<i>iroquois</i>
<i>iro-C</i>	<i>complejo iroquois</i>
<i>kn</i>	<i>knot</i>
<i>kni</i>	<i>knirps</i>
<i>kni-C</i>	<i>complejo knirps</i>
<i>knrl</i>	<i>knirps-related</i>
<i>lab</i>	<i>labial</i>
<i>lacZ</i>	gen que codifica para la β -Galactosidasa bacteriana
<i>M</i>	<i>Minute</i>
<i>Mad</i>	<i>Mothers against dpp</i>
<i>N</i>	<i>Notch</i>
<i>osa</i>	<i>osa</i>
<i>pb</i>	<i>proboscipedia</i>
<i>Pc</i>	<i>Polycomb</i>
<i>Pc-G</i>	<i>grupo Polycomb</i>
<i>ptc</i>	<i>patched</i>
<i>px</i>	<i>plexus</i>
<i>ro</i>	<i>rhomboid</i>
<i>salm</i>	<i>spalt-major</i>
<i>sal-C</i>	<i>complejo spalt-major/spalt-related</i>
<i>salr</i>	<i>spalt-related</i>
<i>Sb</i>	<i>Stubble</i>
<i>sc</i>	<i>scute</i>
<i>Scr</i>	<i>Sex combs reduced</i>

<i>sd</i>	<i>scalloped</i>
<i>Ser</i>	<i>Serrate</i>
<i>slo</i>	<i>slowpore</i>
<i>smo</i>	<i>smoothened</i>
<i>spi</i>	<i>spitz</i>
<i>Swi 2</i>	También conocido como <i>Snf 2</i> , <i>Gam 1</i> y <i>Tye 3</i>
<i>Tb</i>	<i>Tubby</i>
<i>tkv</i>	<i>thick veins</i>
<i>tld</i>	<i>tolloid</i>
<i>tok</i>	<i>tolkin</i>
<i>trx</i>	<i>trithorax</i>
<i>trx-G</i>	<i>grupo trithorax</i>
<i>tsh</i>	<i>teashirt</i>
<i>tx</i>	<i>taxi</i>
<i>Ubx</i>	<i>Ultrabithorax</i>
<i>ve</i>	<i>veinlet</i>
<i>vg</i>	<i>vestigial</i>
<i>vn</i>	<i>vein</i>
<i>vvl</i>	<i>ventral veinless</i>
<i>w</i>	<i>white</i>
<i>wg</i>	<i>wingless</i>
<i>y</i>	<i>yellow</i>

La nomenclatura utilizada en esta tesis es la siguiente: los nombres de los genes se han escrito en cursiva (y en mayúsculas o minúsculas en función de si la mutación es dominante o recesiva) y en mayúsculas y sin cursiva los nombres de los productos génicos para los que codifican.

Otras abreviaturas utilizadas:

A	anterior
ACV	<i>sensilla</i> de la vena transversal anterior
ADN	ácido desoxiribonucleico
ADNc	ácido desoxiribonucleico complementario
ALL	leucemia linfoblástica aguda
AML	leucemia mieloide aguda
ARN	ácido ribonucleico
°C	grados centígrados
cv-a	vena transversal anterior
cv-p	vena transversal posterior
D	dorsal
FLP	flipasa recombinasa de levadura
FRT	secuencia de reconocimiento de la FLP (del inglés “flippase recombination target”)
GAL4	factor de transcripción de levaduras GAL4
hs	choque térmico (del inglés “heat shock”)
KDa	Kilo Dalton
LI, LII, LIII	etapas larvarias
L1 a L6	venas longitudinales
PEV	variegación por efecto de posición (del inglés “position effect variegation”)
P	posterior
<i>P-lacW</i>	elemento <i>P</i> del tipo <i>lacW</i>
PRE	elemento de respuesta a Polycomb (del inglés “Polycomb response element”)
P2	promotor 2 de <i>Antp</i>
SMC	célula madre sensorial, del inglés “sensory mother cells”
TM6C	balanceador del cromosoma III de <i>Drosophila melanogaster</i>
TRE	elemento de respuesta a Trithorax (del inglés “Trithorax response element”)

TSM1	del inglés “twin sensilla 1”
T3	tercer segmento torácico
UAS	secuencia activadora por el factor de transcripción GAL4 (del inglés “upstream activating sequence”)
V	ventral