

Tesis de Licenciatura

Genética molecular del desarrollo embrionario y evolución de los ojos compuestos de la mosca Drosophila melanogaster; estudio de los genes sine oculis Dcvc

López-Schier, Hernán

Tesis presentada para obtener el grado de Licenciado en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis de licenciatura de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Six-Year Bachelor's Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

López-Schier, Hernán. (). Genética molecular del desarrollo embrionario y evolución de los ojos compuestos de la mosca Drosophila melanogaster; estudio de los genes sine oculis Dcvc. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000543_LopezSchier

Cita tipo Chicago:

López-Schier, Hernán. "Genética molecular del desarrollo embrionario y evolución de los ojos compuestos de la mosca Drosophila melanogaster; estudio de los genes sine oculis Dcvc". Tesis de Licenciado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires..

http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000543_LopezSchier

EXACTAS

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Departamento de Ciencias Biológicas,
Facultad de Ciencias Exactas Y Naturales,
Universidad de Buenos aires;
Buenos Aires, Argentina.

**Genética molecular del desarrollo embrionario y
evolución de los ojos compuestos de la mosca
Drosophila melanogaster; estudio de los genes
sine oculis y *Dcvc*.**

Hernán López-Schier

Tesis presentada para optar al título de “Licenciado en Ciencias Biológicas”

Tutor

Dr. Claude Desplan
Head of the Laboratory of Molecular Genetics
Associate Investigator
Howard Hughes Medical Institute
Associate Professor
The Rockefeller University
New York; U.S.A.

Coordinador

Dr. Esteban Hasson
Investigador
Grupo de Investigaciones en Biología Evolutiva
Profesor
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires
Buenos Aires; Argentina.

Buenos Aires, Septiembre de 1997.

Nº 543

Reconocimientos.

Quisiera agradecer en primer término a los miembros de mi comité evaluador por su tiempo y excelente predisposición para evaluar esta Tesis de Licenciatura. También al Dr. Esteban Hasson por su confianza al coordinar este trabajo.

Agradezco muy especialmente al Dr. Federico Welsch y al Departamento de Asuntos Internacionales del National Cancer Institute, National Institutes of Health (USA), por su generosa contribución en el financiamiento de mi estadía en los Estados Unidos durante la realización de este trabajo.

Mi reconocimiento también para todos los miembros del laboratorio del Dr. Claude Desplan por su paciencia, entusiasmo y apoyo; particularmente a Guojun Sheng por enseñarme, con extrema paciencia (china ;-) todo lo que he aprendido en el tiempo que pasé en la Rockefeller University; no solo en cuanto a lo experimental, sino también al pensamiento crítico sobre la ciencia y la vida en general. También a Carolina Mailhos, Lori Zeltser, Ernst Wimmer y Céline Loss. No puedo omitir mi especial reconocimiento a Susie Jun, sin su contribución esto jamás hubiese sucedido.

También reconozco a aquellos investigadores que de una u otra forma han contribuido a la realización del trabajo, Steve DiNardo y Ulrike Gaul (Rockefeller University), Larry Zipursky (UCLA) y Herb Samuels (NYU).

Quiero agradecer especialmente a tres de mis profesores, ya que de ellos he recibido más que de nadie en todos estos años de carrera; en primer lugar a Daniel Goldstein por su entusiasmo e incansable espíritu de búsqueda de “lo mejor” en lo referente a la ciencia; a Mirtha Flawiá por su apoyo y consejos y por haberse hecho siempre de un tiempo para atender mis más que frecuentes requisitorias; y no ya especialmente, sino eternamente, a Claude Desplan, por su energía, entusiasmo y su inmensa confianza; por haberme hecho un lugar en su laboratorio, por darme los mejores

consejos y la mayor de las libertades en mi trabajo, por todo lo que he aprendido durante mi estancia en New York, por ayudarme y seguir preocupándose (aún hoy) por mi futuro académico y, más que nada, por ser un verdadero amigo.

Finalmente muchas gracias a mi familia (a quién más si no) y mis amigos, Claudia, Gisela, Luli, Claudio y Susana, Sergio, Luisa, Diego, Ramiro, MaJu y Juan. A *mein liebe* Natalie muy especialmente y a los “Turderos” por estar siempre cerca mío y por su infinita paciencia. Y... no se han inventado aún las palabras para expresar mi agradecimiento hacia Daniel “Renoir”; él sabe...

Hernán López Schier, 1997.

A
Stefy Harasimowicz-Schier
y
Rudolph Schier

Tabla de Contenidos

Resumen	1
Capítulo 1 Introducción	
Biología del desarrollo y evolución.	2
Genes controladores del desarrollo.	7
Genes controladores involucrados en la formación del ojo.	10
Los ojos compuestos de <i>Drosophila</i> : un modelo fundamental para estudios embriológicos y evolutivos.	18
<i>Drosophila</i> como modelo de estudio.	23
Objetivos específicos.	23
Capítulo 2 Materiales y Métodos	
Clonado y preparación de las proteínas.	25
Protocolo de selección.	26
Método para fabricar sondas radioactivas.	29
Ensayo de Gel-shift.	29
Protocolo de colección y fijado de los embriones.	30
Hibridación <i>in situ</i> .	31
Capítulo 3 Resultados: Unión del homeodominio al ADN.	
Identificación de las secuencias óptimas de reconocimiento	32
Condiciones del ensayo de selección.	32
Secuencias seleccionadas.	
Primer SELEX.	35
Selección del homeodominio de <i>sine oculis</i> .	36
Selección del dominio Six + homeodominio de <i>sine oculis</i> .	36
Selección del dominio Six de <i>sine oculis</i> .	38
Selección del dominio CVC de <i>Chx-10</i> .	38
Segundo SELEX.	38
Unión del SixD+HD a los oligonucleótidos seleccionados.	40
Unión del soHD al sitio P3K.	42
Capítulo 4 Resultados: Clonado molecular y caracterización de <i>Dcvcl</i> y <i>Dcvc2</i> .	
Clonado de <i>Dcvcl</i> y <i>Dcvc2</i> .	43
Caracterización molecular.	47
El patrón embrionario de la expresión de <i>Dcvc2</i> .	47
Capítulo 5 Discusión	
El residuo 50 del HD y la especificidad de unión al ADN.	50
Sitios óptimos de unión al ADN por parte de diferentes HDs.	51

Determinantes específicos de unión al ADN.	55
Homeodomelios cuyos sitios de unión específicos no contiene a la secuencia TAAT.	56
<i>Dcvc</i> y la jerarquía genética general en el desarrollo del ojo.	57
Conclusiones	
Preferencias de unión por parte de los diferentes dominios.	58
Desarrollo y evolución de los ojos.	60
Perspectivas.	65
Capítulo 6 Bibliografía.	67

Resumen:

En esta tesis se analiza la habilidad del homeodominio (HD) y del dominio Six (SixD) del gen *sine oculis* (*so*) de *Drosophila melanogaster* y del dominio CVC (CVCD) del gen *Chx-10* de ratón, para reconocer secuencias específicas en el ADN.

Se describe el mecanismo de unión al ADN por parte de estos dominios conservados, en forma individual y en combinación, así como las secuencias específicas reconocidas. El HD de *so* reconoce una secuencia que es diferente del sitio canónico reconocido por la mayoría de los HDs; este HD podría interactuar con el SixD para obtener un reconocimiento más específico de secuencias en el ADN.

Finalmente se describen dos nuevos genes en *Drosophila melanogaster*, *Dcvcl* y *Dcvcl2*, los cuales pertenecen a la familia de genes *Chx-10/Vsx-1/ceh-10* y que tienen una gran homología de secuencia con ellos en la región del CVCD.

Capítulo 1: Introducción

"Le plus grande service qu'on puisse rendre à la science est d'y faire place nette avant d'y rien construire."

Georges Cuvier.

Biología del Desarrollo y Evolución.

Para aquéllos que están de acuerdo con el concepto de *scala naturae*, todos los organismos son parte de una sola escala lineal de perfección siempre creciente. Este concepto es tan simple y tan obvio para nosotros que es difícil de creer que Charles Darwin fuese la primera persona en haberlo adoptado de forma consistente.

Quizá la consecuencia más importante en asumir, después de Darwin, la teoría del descendiente común, fue el cambio en la posición del “Hombre” en el mundo natural. Ernst Haeckel, Thomas H. Huxley y Darwin demostraron concluyentemente que ese hombre debe de haber evolucionado de un antepasado similar a un mono actual, poniéndolo así directamente en el árbol filogenético del reino animal. La prueba final de esto, por supuesto, no llegó sino hasta nuestros días, cuando fue demostrado indudablemente que incluso los organismos no eucariotas tienen (casi) el mismo código genético que animales y plantas.

Después de abandonar el “*escencialismo*”, que había dominado el pensamiento científico por más de dos mil años desde Platón y a la luz del concepto antemencionado, muchos evolucionistas se enfocaron en los procesos que dieron lugar a los organismos altamente diversificados y también, en especial, origen a los órganos complejos de esos organismos; la hipótesis de las mutaciones al azar y la selección natural vino a resolver muchos problemas pero, al mismo tiempo, generó muchas más discordancias. Al principio, incluso Darwin fue superado en cierta forma por la idea. En “*El Origen de las Especies*” bajo el título *Organos de extrema perfección y complicación*, él comenta: “Suponer que el ojo, con todas sus invenciones inimitables para ajustar el enfoque a diferentes distancias, para admitir diferentes cantidades de luz y para corregir las

aberraciones esféricas y cromáticas, pudo haber sido formado por selección natural, parece, lo confieso libremente, absurdo en el grado más alto" (Edn 1, pág. 186; Edn 4 (1886), pág. 215).

La aceptación del gradualismo fue el primer cambio hacia la solución del problema del descendiente común y la multiplicación de las especies. Las mutaciones al azar y el gradualismo, junto con la selección natural y los cambios adaptativos son los conceptos principales que apoyan la existencia de tantos y tan diversificados organismos y, en particular, la aparición y desarrollo de los diferentes órganos y estructuras del cuerpo (Bendall, 1983).

Garstang en 1922 fue el primero en sugerir que los cambios adaptativos en la fase larval acoplados con cambios en el tiempo de duración del desarrollo (heterocronía) teóricamente podrían producir cambios radicales en la morfología del adulto, posiblemente dando lugar al origen de los taxones mayores; esta última idea fue posteriormente estimulada por el rechazo al concepto dogmático de la recapitulación de Haeckel.

El problema fundamental en la comprensión de la evolución y del desarrollo de órganos y estructuras con funciones específicas, es comprender cómo es que aparecieron por primera vez. El zoólogo e historiador de la ciencia E.R. Russell resumió brillantemente una de las grandes controversias biológicas de la primera mitad del siglo decimonoveno: "¿Es la función el resultado mecánico de la forma, o es la forma meramente la manifestación de una función o actividad? ¿Cuál es el sentido de la vida... organización o actividad?". Mientras Georges Cuvier fundó la escuela "funcionalista" de la biología de los organismos, con su insistente idea del animal como un todo funcionalmente integrado, Étienne Geoffroy St. Hilaire continuó con la tradición más "formalista" de la biología, que había empezado con Buffon y fue continuada por Goethe, Jean-Baptiste Lamarck y otros. En su libro *Philosophie anatomique* de 1818, St. Hilaire se pregunta: "¿Podrá ser que la organización corporal de los vertebrados sea concebida como un solo tipo uniforme?". St. Hilaire vió a todos los vertebrados como a modificaciones de un solo arquetipo, una sola forma. Los órganos rudimentarios y las

transformaciones embrionarias no servirían para propósito funcional alguno, pero indicarían la derivación común de los animales de su arquetipo.

Los eventos evolutivos más interesantes son aquéllos que han llevado a cambios especializados en la organización anatómica de los animales. ¿Cómo aparecieron nuevas estructuras durante la evolución y cómo el desarrollo embrionario puede ser tan estable como para producir un resultado consistente en cada generación?

En términos de formas y organización, un buen ejemplo es la aparición del metamerismo, es decir, el plan segmentario del cuerpo; según ciertos esquemas filogenéticos esto ha ocurrido por lo menos tres veces en la historia. Desde el punto de vista de la función y la actividad, un ejemplo fascinante es la aparición y evolución de la percepción.

Una célula puede reconocer estímulos del ambiente que pueden ser señales químicas, físicas o mecánicas y entonces, en respuesta, desarrollar una reacción que dependerá de la naturaleza del estímulo. La quimiorrecepción, por ejemplo, ha sido descripta desde las bacterias hasta los animales superiores; lo mismo pasa para algunos estímulos físicos; en particular, la emergencia de la fotorecepción es una de las cuestiones más interesantes.

La fotorecepción se desarrolló y ha evolucionado para aprovechar la información proporcionada sobre el mundo por el amplio espectro de longitudes de onda emitido por el sol. La fotorecepción en el reino animal juega más de un papel; por ejemplo, uno de ellos es la simple detección de la luz. Incluso los organismos más simples, como las bacterias, tienen moléculas que están específicamente involucradas en la detección de la luz; estas, a su vez, también se acoplan a otras proteínas, lo cual significa que después que la luz es absorbida por estas proteínas (llamadas opsinas), se activa una cascada bioquímica que lleva a cambios en la tasa de crecimiento, la estructura del cuerpo e incluso la expresión de genes en el individuo. Las respuestas a la luz pueden asumir una variedad de modalidades y el resultado neto es una fototaxis negativa o positiva; estas respuestas evolutivas adquiridas tienen un altísimo valor de supervivencia.

El modelo de fotorreceptor más simple asume que todo lo que se necesita para la fototaxis es una simple mancha del pigmento fotosensible, superficialmente localizada en

la célula y que de algún modo transmita una señal cuantitativa al aparato locomotor, para que cuando la célula gira, su misma sombra provoque una atenuación de la señal lumínica; como puede verse fácilmente, éste es un tipo de dispositivo sumamente pobre. La situación mejora cuando el organismo puede rodar en su eje direccional (la rotación es frecuente en protozoarios motiles) y el resultado neto es que la célula realiza un movimiento helicoidal alrededor de su eje de dirección.

Los animales más complejos usan la luz para guiarse, teniendo capacidades fotoreceptoras que les permiten reconocer diferentes niveles lumínicos, regulando así su conducta. La forma en que un animal responde a la información dada por la luz dependerá finalmente de su repertorio de respuestas unitarias. Muchos animales que pertenecen a phyla más bajos tienen uno o más tipos de órganos de fotopercepción; algunos sólo pueden detectar la presencia o ausencia de luz, pero otros pueden detectar la dirección de la luz. Los niveles de luz a largo plazo también tienen papeles fisiológicos regulando los ritmos biológicos en muchos phyla.

Más interesantes son las formas vivientes que pueden ver, esto quiere decir que pueden reconocer diferentes longitudes de onda y formar imágenes. Este tipo de percepción se ha encontrado en los grupos más sofisticados, artrópodos, cefalópodos y vertebrados. Estos animales usan la luz para regular su conducta, evaluar el ambiente y para muchos otros propósitos.

Varios autores han demostrado que 21 de 34 phyla tienen ojos o estructuras similares durante alguna fase de su ciclo de vida; un análisis extensivo de la existencia de fotoreceptores y estructuras oculares entre la mayoría de los organismos ha dado lugar a la descripción de varios tipos. Son discernibles 10 sistemas ópticos diferentes, incluidos el ojo "pinhole" del nautilus, el ojo construido como un telescopio reflectante, dos tipos de ojo lente de cámara y varios tipos de ojo compuesto (Salvini-Plawen & Mayr, 1977; Land y Fernald, 1992).

Los *Protista* normalmente tienen varias manchas oculares (eyespots) relacionadas con un cloroplasto y/o con la base del flagelo; *Porifera*, tiene algunos fotorreceptores unicelulares en la fase larval de ciertas especies. Los animales más primitivos con estructuras oculares son los cnidarios, algunos tienen ojos simples carentes de lentes,

pero otros han desarrollado ojos bien formados en los bordes de sus campanas (Raff, 1996). Como diploblastos, los cnidarios son la rama más profunda del árbol de los metazoos, pero aún así, la complejidad de algunos de sus ojos es sorprendente.

Platyhelminthes comprenden varias clases primitivas y muy variadas, entre estas, tienen fotoreceptores *Turbellaria* y *Trematoda*, todos muy simples y que parecen estar involucrados en dos tipos de fotosensitividad: desplazamiento y orientación, por una lado y eclosión y control de los ritmos de las fases larvales, por otro. Los ojos de estos gusanos bien podrían representar al fotorreceptor primitivo básico y arquetípico de los animales bilaterales (Ali, 1984).

Mollusca despliegan la mayor diversidad en la diferenciación de los ojos entre todos los grupos de animales, yendo desde ojos muy simples hasta los ojos con lentes en gastrópodos y en bivalvos. Los calamares han desarrollado sistemas visuales con capacidad para ver colores y formar imágenes (Raff, 1996).

Arthropoda tiene tres tipo de ojos cefálicos, ocelos simples, ocelos complejos con lente y ojos compuestos; este último es capaz de formar imágenes, aunque de una manera diferente que un ojo simple. Los ojos compuestos son muy antiguos entre los artrópodos, habiendo registro fósil de ellos en los primeros trilobites Cámbricos (Salvini-Plawen & Mayr, 1977).

Los ojos de los vertebrados incluyen el más versátil y eficaz de los sistemas visuales en la naturaleza. Los ojos de los vertebrados vivientes más primitivos, las lampreas, son similares en construcción a aquéllos de los vertebrados más avanzados. La retina de los vertebrados contiene dos tipo de células del fotorreceptoras, varillas y conos. La visión en colores depende de los conos, con rodopsinas de los tres diferentes máximos de absorción, azul, verde y rojo.

El más antiguo de los vertebrados primitivos, tenía dos tipo de ojos, un par principal lateral en la cara y un par mediales (los ojos pineales en la parte central de la bóveda del cráneo). Algunos vertebrados vivientes todavía tienen ese ojo en la cima del cráneo. En lagartos, el ojo parietal se desarrolla bien, incluso con córnea, lente y retina; los ojos mediales pudieron haber tenido una función visual en los vertebrados más

primitivos cuyos cráneos fósiles muestran grandes aberturas en la zona central superior del cráneo.

Después de un análisis anatómico muy cuidadoso y de la filogénesis de las estructuras fotoreceptoras entre todos los phyla, Salvini-Plawen y Mayr concluyeron que las estructuras oculares aparecieron por lo menos 40 veces durante la evolución (Salvini-Plawen y Mayr, 1977). Incluso los ojos muy relacionados estructuralmente, los pertenecientes a los vertebrados y a los cefalópodos, son de naturaleza diferente, particularmente desde el punto de vista de la ontogénesis. Estos dos tipos de ojo fueron siempre vistos como estructuras análogas en lugar de homólogas y durante muchos años un fueron ejemplo típico de libro de texto de la noción (Dodson).

Por otro lado, la morfología del ojo compuesto de una mosca y la de los ojos monolente de los vertebrados y moluscos es tan diferente que no podría reconocerse homología estructural alguna entre ellos, o bien presente en un antepasado común. Muchos autores están de acuerdo con la idea, pero ciertos descubrimientos recientes han desafiado este concepto (Quiring y col., 1994; Zucker, 1994; Zuckerkandl, 1994; Halder y col., 1995(a); (b); Gehring, 1996; Tomarev y col., 1997; MacDonald, 1996).

Genes controladores del desarrollo:

Las mutagénesis de saturación llevadas a cabo a fin de identificar mutaciones que afectan el plan segmentario del cuerpo de los animales, revelaron la existencia de una jerarquía de regulación en el establecimiento de los ejes anterior-posterior (A-P), dorsal-ventral (D-V) y de las regiones terminales del embrión en vías de desarrollo (Nüsslein-Volhard y Wieschaus, 1980). Los mutantes descubiertos se clasificaron en distintos grupos según el fenotipo mutante que se observó; se establecieron dos grandes categorías, los genes de efecto materno y los genes zigóticos; los primeros se pusieron en evidencia en los embriones cuando la mutación es llevada por la madre y los segundos cuando las mutaciones son llevadas por los embriones mismos (Bate y Martinez-Arias, 1993; Slack, 1991).

A lo largo del eje A-P, se observó una jerarquía de regulación en la que en primer lugar se establecen regiones anchas de expresión de estos genes, y entonces, dentro de

esas regiones, se especifican subdivisiones más refinadas. Los genes que regulan esta formación segmentaria fueron acomodados dentro en la jerarquía genética, según: los genes de efecto materno, como *bicoid* (*bcd*) (Driever y Nüsslein-Volhard, 1988) establecen la polaridad global del embrión a través de un gradiente morfogenético. Los genes “gap”, como *hunchback* (*hb*) (Driever y Nüsslein-Volhard, 1988; St. Johnston y Nüsslein-Volhard, 1992), responden a los genes de efecto materno y establecen amplias regiones a lo largo del eje A-P del embrión. Los genes de la regla par, como *paired* (*prd*), responden a los genes gap para subdividir aún más estas regiones; luego, los genes de polaridad del segmento, como *engrailed* (*en*), en respuesta a los genes de la regla par, refinan todavía más estas regiones, estableciéndose los segmentos. Estos genes fueron luego clonados y el análisis molecular de su expresión reflejó las observaciones genéticas. Los genes gap se expresan en regiones anchas que cubren varios segmentos; los productos de los genes de los genes gap regulan la expresión de los genes de la regla par en regiones más refinadas y con una periodicidad de dos segmentos. Los productos de los genes de la regla par, a su vez, regulan y refinan la expresión de los genes de polaridad de los segmentos, formando rayas de expresión con una periodicidad de un segmento (Gilbert, 1994; Bate y Martinez-Arias, 1993; Lawrence, 1992; Slack, 1991).

Casi todos los productos de estos genes son factores de transcripción que forman una red regulatoria muy compleja que finalmente establece los campos de información de posición en el embrión en vías de desarrollo.

La regulación de la transcripción se identificó primero como un mecanismo importante en procariotas para regular genes en el operón lac y en el ciclo de vida del bacteriófago lambda. Los reguladores de la transcripción tienen dos funciones básicas, actuar como activadores o represores de la producción de proteínas, llevándolas a cabo mediante su unión a secuencias específicas en el ADN; estas proteínas son modulares y tienen distintos dominios de activación o de represión de la transcripción y distintos dominios de unión al ADN (Ptashne, 1988).

La modularidad de los factores de transcripción ha llevado a la evolución de familias de factores que comparten un dominio de unión al ADN muy conservado junto con diferentes dominios de activación o de represión. Los reguladores del desarrollo

pertenecen a varias familias de proteínas que contienen y son caracterizadas por un dominio de unión al ADN muy conservado (Pabo y Sauer, 1992; Wingender, 1990), como por ejemplo hélice-vuelta-hélice (HTH), los dedos de zinc (Zn fingers), la hélice-bucle-hélice básica (bHLH), el homeodominio (HD), el dominio paired (PD) y otros. Entre todos ellos, el HD es el paradigma de muchos reguladores del desarrollo, en organismos que van desde la levadura hasta el ser humano (McGinnis y col., 1984; Scott y Weiner, 1984; Carrasco, 1984; Shashikant y col., 1991).

El HD fue inicialmente identificado hace más de una década como un dominio muy conservado de 60 aminoácido cuyos portadores están involucrados en el desarrollo de *Drosophila* (McGinnis y col., 1984; Scott y Weiner, 1984). Se demostró posteriormente que se trata de un dominio específico de unión al ADN (Desplan y col., 1985; Scott y col., 1989), y que para ello reconoce una secuencia canónica TAATNN en el ADN blanco (Desplan y col., 1988; Hoey y Levine, 1988). La estructura cristalina y la NMR (Kissinger y col., 1990; Qian y col., 1989; Otting y col., 1990; Billeter y col., 1990) demostró que el HD tiene una estructura muy conservada y que se compone de tres hélices. Las segunda y tercera hélice del HD están relacionadas en estructura al dominio HTH de procariotas (Laughon y Scott, 1984). La hélice de reconocimiento (RH) del HD hace contactos específicos a las secuencias del ADN blanco en su surco mayor, pero en forma diferente a la del HTH procariótico, que usa la parte del N-terminal de la RH; el HD hace contacto con el ADN a través del centro de la RH. La gran conservación estructural del HD parece dar lugar también a una función muy conservada (Carrasco, 1984; McGinnis y Kuziora, 1994; Gehring, 1987; Holland y Hogan, 1986).

Tabla 1-1

Alineación de las secuencias de aminoácido de varios homeodomorfos. Las secuencias de aminoácidos para los HDs se alinearon manualmente a la secuencia de *Antp*, basándose en las relaciones de las secuencias. Los guiones indican que el aminoácido es idéntico al aminoácido correspondiente en *Antp*. Se indican solo las diferencias en las secuencias.

		Hélice I	Hélice II	Vuelta	Hélice III
Clase Hox:					
Homeotíco	Antp	RKRGGRQTYTR YOTLELEKEF HFNRVYLTRRR RIEIAHALCL TERQIKIWFQ NRRMKWKKE			
Homeotíco	Ubx	-R----- -T-H----- --M----- ---L---			
Homeotíco	AbdA	LR----- F----- --H----- -----L---			
Regla par	Ftz	S-T----- -----I---- D-N-S- S----- ---S-D			
Homeotíco	Dfd	P--Q-TA-- H-I----- Y----- T-V- S----- ---D			
Polaridad	Caudal	KDKY-VV--D F-R-----Y CTS--I-I-- KS-L-QT-S- S---V----- --A-ERTS			
Clase Engrailed:					
Polaridad de Segmentos en ratón	En	E--P-TAFSS E-LAR-KR-- NE-----E-- -QQLSSE-G- N-A----- -K-A-I--S			
	En-1	D--P-TAF-A E-LQR-KA-- QA---I-EQ- -QIL-QE-S- N-S----- -K-A-			
Clase III:					
Homeotíco	Lab	NNS--INF-N K-LT----- -----A-----NT-Q- N-T-V----- Q--R			
Desarrollo del ojo en <i>Drosophila</i>	Rough	QR-Q-T-FST E---R-V-- R-E-IS-S- -F-L-ET-R- --T----- --A-D-RI			
	Msh	NRKP-TPF-T Q-L-S---K- REKQ---SIAE -A-FSSS-R- --T-V----- --A-A-RL			
Clase Pfd/Pax:					
Regla par	Paired	QR-C-T-FSA S-LD---RA- ERTQ-PDIYT -E-L-QRIN- --AR-QV--S ---ARLR-Q			
Polaridad de Segmentos ratón	Gsb	QR-S-T-F-A E-LEA---RA- SRTQ-PDVYT -E-L-QTTA- --AR-QV--S ---ARLR-H			
ratón	Pax-3	QR-S-T-FTA E-LE---RA- ERTH-PDIYT -E-L-QRAK- --ARVQV--S ---AR-R-Q			
ratón	Pax-7	QR-S-T-FTA E-LE---KA- ERTH-PDIYT -E-L-QRTK- --AFVQV--S ---AR-R-Q			
<i>Drosophila</i>	Pax-6	LQ-N-TSFTQ E-IEA----- ERTH-PDVFA -ERL-AKID- P-AR-QV--S ---A--RR-			
<i>Drosophila</i>	Lune	FR-N-T-FSP E-LE----- DSH-PCVST -ERLSSRTS- S-ARVQV--S ---A--RRE			
Humano	Phox1	QR-N-T-FNS S-LEA---RV- ERTH-PDAFV -EDL-RRVM- --ARVQV--- --A-FRRM			
<i>Drosophila</i>	Aristaless	QR-Y-T-F-S F-LE---A- SRTQ-PDVFT -E-L-MKIG- --ARIQV--- --A--R-Q			
Nematodo	Ceh-10	KR-H-TIF-Q --ID---A- QDSH-PDIYA -EVL-QKIE- Q-DR-QV--- --A--R-T			
ratón	Chx10	KR-H-TIF-S --LE---A- NEAH-POVYA -EML-MKTE- P-DR-QV--- --A--R-R			
ratón	Otp	Q--H-TRF-P A-LN---RS- ARTH-PDIFM -E-L-LRIO- --SRVQV--- --A---R			
<i>Drosophila</i>	Repo	K-KT-T-FTA --LE---RA- ERAP-PDVFA -E-L-1K-N- S-SRVQV--- --A--R-H			
Xenopus	Mix-1	QR-K-TFF-Q A-LDI---QF- QT-M-PDIHI -E-L-RHIYI P-SR-QV--- --A-VRRQ			
<i>Drosophila</i>	Esh-1	T--V-TFF-E E-LQV-QAN- QIDSNPQDQD LER- SVTQ- SK-VTQV--- S-ARQ--H			
Xenopus	Goosecoid	KR-H-TIF-D ELQ--L-NL- QETK-PDVGAT -EQL-RRVH- R-EKVEV--K ---A--RQK			
Gen Gap céfálicos	Otd	QR--PT-F-- A-LDV---AL- GKT---PDIFM -E-V-LKIN- P-SRVQV--K ---A-CRQK			
ratón	Ptx-1	QR-QPIHF-S Q-LQ---AT- QR---PDMSM -E---VWIN- --PRVRV--K ---A--R-R			
HDs tipo POU:					
Humano	Oct-1	-RKK-TSIET NIRVA---S- LE-QKP-SEE ITM---DQ-NM EKEV-RV--C ---Q-E-RI			
Humano	Oct-2	-RKK-TSIET NVRFA---S- LA-QKP-SEE ILL---EQ-HM EKEV-RV--C ---Q-E-RI			

Genes controladores involucrados en la formación del ojo:

Del trabajo de Gehring y sus colaboradores (Halder, y col., 1995(a); 1995(b); Quiring, y col., 1994) y Zipursky y colaboradores (Cheyette, y col., 1994) y otros (Nilsson, 1994; Oliver, y col., 1995; Serikaku y O'Tousa, 1994; Cvekl y Pitiagorsky, 1996; Grindley, 1995; Sheng y col., 1997; MacDonald, 1996), se ha propuesto que los ojos simplemente podrían haber aparecido una sola vez en la evolución y que estos órganos en organismos tan diversos como el humano y la mosca son estructuras

verdaderamente homólogas. La idea del origen monofilético es apoyada por el hallazgo de una cascada genética común que gobierna la morfogénesis de los ojos y que involucra a genes como *Pax-6* y *sine oculis*, entre otros. Particularmente es el caso de *Pax-6* que se ha encontrado casi en cualquier animal en el que ha sido buscado, desde los humanos (*aniridia*) y ratón (*small eye*), hasta las moscas (*eyeless*) y también en pájaros, peces, calamares, nemertines, nematodos y ascidios; indicando su existencia general en por lo menos los phyla triploblásticos (Quiring y col., 1994; Chisholm y Horovitz, 1995; Zhang y Emmons, 1995; Nilsson , 1994).

Pax-6 , *Small eye (sey)* y *eyeless (ey)* son genes que pertenecen a la clase de los genes *Pax*, los cuales están involucrados en muchos procesos del desarrollo embrionario, de neurogénesis, de formación del esqueleto, de organogénesis renal, de desarrollo immunológico y hasta de formación de tumores (Strachan y Read, 1994; Goulding y col., 1993; Baldwin y col., 1992; Tassabehji y col., 1992; Grindley y col., 1995; Ton y col., 1991; Jordan y col., 1992; Glaser y col., 1992; Hanson y col., 1993; 1995; Hill., 1991; Matsuo y col., 1993; Tremblay y Gruss, 1994).

Los genes *Pax* forman una familia de reguladores muy importantes del desarrollo y son caracterizados por un dominio de unión al ADN evolutivamente muy conservado, el dominio paired (PD) (Bopp y col., 1986; Treisman y col., 1991). En *Drosophila* existen siete genes *Pax*, incluyendo *paired (prd)* y *ey* (Frigerio y col., 1986), en el ratón y el humano se encontraron hasta el momento nueve genes *Pax* (*Pax-1* a *Pax-9*) (Tremblay y Gruss, 1994; Chalepakis y col., 1993; Stapleton y col., 1993; Walther y col., 1991). Aproximadamente la mitad de los genes del *Pax* también poseen un homeodominio (HD) del tipo *paired*, que hace pensar en una interacción potencial entre los dos dominios de unión al ADN.

La función básica de las proteínas *Pax* como reguladores de la transcripción depende de la integridad estructural y funcional del PD (Treisman y col., 1991). Varios alelos mutantes de genes *Pax* que causan un fenotipo con pérdida de la función del gen tienen mutaciones sin sentido en el PD y afectan a la unión de la proteína al ADN (para la revisión ver Xu y col., 1995). Se ha demostrado que el PD se pliega en forma de dos

subdominios que han sido llamados PAI (N-terminal) y RED (C-terminal), respectivamente (PAI + RED = PD).

Muchos autores estudiaron el reconocimiento específico del ADN por parte de una variedad de PDs (Czerny y col., 1993; Epstein y col., 1994; Xu y col., 1995; Jun y col., 1996) y demostraron que diferentes PDs reconocen secuencias de ADN similares. Esto es consistente con el hecho que otros dominios de unión al ADN muy conservados también reconocen secuencias nucleotídicas similares; esto, más que resolver las preguntas, genera la siguiente paradoja: ¿Cómo es que dominios estructuralmente similares que reconocen secuencias de ADN similares logran una diversidad funcional suficiente como para ejecutar programas de desarrollo tan diferentes?

Los genes *ey*, *so* y sus homólogos se expresan en muchos lugares, antes y después del desarrollo del ojo; en vertebrados *Pax-6* toma parte en la formación temprana del tubo neural, del ojo y del epitelio olfativo. Después, también se expresa en varias partes del cerebro y de nuevo tanto en la parte nerviosa y epidérmica del ojo en vías de desarrollo. En *Drosophila*, el homólogo de *Pax-6* (*ey*) se expresa tanto en el sistema nervioso embrionario, como en el disco imaginal que dará lugar al ojo; en tanto que el ocelo medio que contiene células del mismo tipo que las del ojo compuesto, parece desarrollarse sin necesidad de *ey*.

Se ha propuesto que el papel de *pax-6* en la regulación del desarrollo del ojo estaría conservado entre los insectos y los mamíferos (Halder y col., 1995(a); (b)). Esto estaría diciendo que algunos de los componentes de la cascada genética gatillada por *pax-6* y *ey* también estarían conservados entre estas especies y deberían haber estado presentes en el antecesor común de los insectos y los vertebrados. En *Drosophila*, tanto *ey*, *sey* y *pax-6* de moluscos son suficientes para iniciar la cascada de eventos a través de los cuales los discos imaginarios formarán ojos compuestos con ommatidios normalmente constituidos (Halder y col., 1995(b); Tomarev y col., 1997).

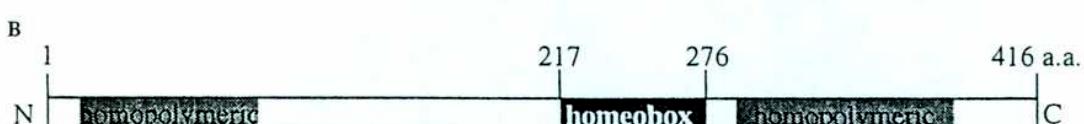
El gen *sine oculis* (*so*) también ha sido clonado en *Drosophila* (Cheyette y col., 1994; Serikaku y O'Tousa, 1994) y más recientemente se han encontrado cinco homólogos diferentes en el ratón y uno de ellos, *Six-3*, se expresa en el primordio del ojo (Oliver y col., 1995). El locus *so* codifica para una proteína con homeodominio que se

expresa en el epitelio del disco imaginal anteno-ocular justo antes de la morfogénesis y que es fundamental para el desarrollo de todo el sistema visual en la mosca (Figura 1.1).

So tiene un HD que además posee varios rasgos distintivos; so tiene el aminoácido lisina (K) en la posición 9 de la tercera hélice del HD, la llamada hélice de reconocimiento (RH). Se ha demostrado que este aminoácido es en gran medida el determinante del reconocimiento de las secuencias específicas de ADN para los HDs (Treisman y col., 1992).

Figura 1.1:

(A) Secuencia de nucleótidos del ADNc y secuencia probable de aminoácidos del gen *sine oculis* tipo salvaje de *Drosophila*. (B) Representación esquemática del producto del gen *so*. (C) Comparación del HD de *so* con otros dos HD para los que la estructura cristalina ha sido resuelta (Cheyette y col., 1994).



expresa en el epitelio del disco imaginal anteno-ocular justo antes de la morfogénesis y que es fundamental para el desarrollo de todo el sistema visual en la mosca (Figura 1.1).

So tiene un HD que además posee varios rasgos distintivos; *so* tiene el aminoácido lisina (K) en la posición 9 de la tercera hélice del HD, la llamada hélice de reconocimiento (RH). Se ha demostrado que este aminoácido es en gran medida el determinante del reconocimiento de las secuencias específicas de ADN para los HDs (Treisman y col., 1992).

Figura 1.1:

(A) Secuencia de nucleótidos del ADNc y secuencia probable de aminoácidos del gen *sine oculis* tipo salvaje de *Drosophila*. (B) Representación esquemática del producto del gen *so*. (C) Comparación del HD de *so* con otros dos HD para los que la estructura cristalina ha sido resuelta (Cheyette y col., 1994).

En los mutantes *so*⁻, las células sufren apoptosis. Estos hallazgos dan lugar a la interpretación que *so* juega un papel esencial en el control de los eventos iniciales de formación del disco imaginal del ojo. *So* también es necesario para el desarrollo del resto del sistema visual de la mosca, incluso de los lóbulos ópticos; *so* se expresa en el primordio del lóbulo óptico justo antes a su invaginación a partir del ectodermo embrionario; en *so*⁻, el primordium del lóbulo óptico no puede invadir.

Otro alelo caracterizado, *somda* (*sine oculis-medusa*), es el resultado de una inserción de un elemento P en el gen; *somda* causa un desarrollo aberrante de los fotoreceptores larvarios (el órgano de Bolwig) y del primordio del lóbulo óptico en el embrión (Figura 1.2).

También se ha encontrado una mutación en el gen *so*, *Droplet* (*so^D*) y este alelo parece comportarse como un dominante negativo. Este alelo es el resultado de una mutación puntual dentro del HD, cambiando una valina conservada en la posición 201 por una asparagina (Larry Zipursky, comunicación personal).

Figura 1.2:

Micrografía electrónica de barrido de un ojo compuesto tipo salvaje de *D. melanogaster* y de un mutante *so* con una pérdida parcial de la función del gen. De Cheyette y col., 1994.

En el ratón, *Six3* es el gen homólogo de *so*. Su expresión se restringe a la placa neural anterior, incluyendo varias regiones que después darán lugar a varias estructuras derivadas ectodérmicas y nerviosas. El ARNm de *Six3* también se encuentra en estructuras derivadas de la placa nerviosa anterior: el ectodermo de la cavidad nasal, la placa olfativa y la vesícula de Rathke; también en el hipotálamo y las vesículas ópticas. Basándose en la localización cromosómica y del patrón de expresión del gen *Six3* en el ratón, el *Six3* humano podría ser un buen candidato para ser el gen homólogo de por lo menos uno de los genes mutados en pacientes con holoprosencefalía tipo 2, debida a una delección intersticial en 2p21-p22. Esta región comparte cierta homología con la región distal del cromosoma 17 de ratón, precisamente donde se ha mapeado a *Six3* (Oliver y col., 1995); también se han encontrado homólogos en pollo (Bonavolonta, 1996).

Chx-10 es otro gen con HD involucrado en el desarrollo del ojo en el ratón (Liu y col., 1994); este gen pertenece a la familia de genes *ceh-10/vsx-1/chx-10* los cuales tienen una glutamina (Q) en la posición 9 de la hélice de reconocimiento (RH), además de otro dominio acompañante muy conservado llamado CVCD. La secuencia aminoacídica del HD de CHX-10 es idéntica en un 82 % a la de la proteína CEH-10 (proteína del nematodo *C. elegans*) y un 92% con la proteína VSX-1 (del pez dorado *Carassius auratus*) (Svendsen y col., 1995). En el ratón en vías de desarrollo, la transcripción de *chx-10* se produce en la vesícula óptica anterior y en todo el neuroblasto de la copa óptica; también se caracterizó cierta transcripción de *Chx10* en varias regiones del tálamo en vías de desarrollo, el cerebro interno y la cuerda espinal ventral. Un alelo nulo de *chx-10* causa el fenotipo de “retardo ocular” en ratones, produciendo una disminución de la proliferación de las células progenitoras de la retina y de la diferenciación de las células bipolares (Burmeister y col., 1996). Se demostró además que el homólogo de esta familia, presente en el pollo, es transcripto específicamente por las futuras células bipolares (Belecky-Adams y col., 1997).

Ceh-10 se expresa en un reducido número de neuronas en la parte anterior de *C. elegans*, precisamente en las interneuronas llamadas AIY. AIY recibe las entradas sinápticas provenientes de las células sensoriales, de la misma forma que lo hacen las neuronas bipolares de la retina de los vertebrados (las cuales expresan *chx-10* o *vsx-1*,

según sea el caso). *C. elegans* no tiene fotorreceptores y no parece que tenga fototaxis, aunque si despliega cierta respuesta a la luz.

Vsx-1, en el carasius adulto, se expresan en la retina nerviosa; su ARNm se sintetiza en un subconjunto de células diferenciadas en la capa nuclear interna en la retina central madura, en una forma típica a la de las células bipolares. En la retina inmadura, *vsx-1* se expresa en un subconjunto relativamente más grande de células postmitóticas, pero luego deja de hacerlo en algunas de estas células para entonces formar el patrón de expresión de la retina madura. Si se produce una lesión en la retina, durante la fase temprana de su regeneración *vsx-1* se sintetiza en células en la capa nuclear interna y se expresa *de novo* en varias células fuera de esta capa. Se especuló que *Vsx-1* pueden funcionar estabilizando el estado diferenciado de cierto subconjunto de células en la capa nuclear interna y podría estar involucrado en la diferenciación celular durante el desarrollo de la retina y durante su regeneración. Figura 1.3 (Levine y col., 1993; 1994).

La inactivación del gen *alx*, homólogo en el pez zebrita, usando oligonucleótidos antisentido, produjo malformaciones oculares semejantes al fenotipo que presentan los ratones con retardo ocular (Barabino y col., 1997).

Figura 1.3:

Características conservadas de los tres genes. Alineamiento aminoacídico del HD y el dominio CVC para *ceh-10*, *vsx-1* y *chx-10*.

HOMEODOMINIO

Ceh-10 136 KRRHRTIFTQYQIDELEKAFQDSHYPPDIYAREVLAGKTELQEDRIQVWFQNRRAKWRKTE 195

Chx-10 148 KRRHRTIFTSYQLEELEKAFNEAHYPDVYAREMLAMKTELPEDRIQVWFQNRRAKWRKRE 207

VSX-1 148 KRRHRTVFTSHQLEELEKAFHEAHYPDVYAREMLAMKTELPEDRIQVWFQNRRAKWRKRE 207

DOMINIO CVC

Ceh-10 194 TEKTWGKSTIMAEGLYGAMVRHSLPLPETITKSAEAADPQQSAAPWLL---GMHKKSMEAAA 253

Chx-10 206 REKCWGRSSVMAEYGLYGAMVRHSIPLPESILKSAK-DGIMDSCAPWLL---GMHKKSLEAAA 264

VSX-1 207 REKCWGRSSVMAEYGLYGAMVRHSIPLPESIINSAK-NGMMGSCAPWLLGEAGMHKKSLEIGK 268

Toda esta evidencia y la caracterización de otros dos genes en *Drosophila melanogaster*, pertenecientes a la familia *ceh-10/vsx-1/chx-10* (esta tesis), aumentan en cierta medida la incertidumbre sobre el origen de los ojos.

Los ojos compuestos de *Drosophila*: un modelo fundamental para estudios del desarrollo y evolutivos:

Los ojos compuestos de *Drosophila* consisten en una serie hexagonal de aproximadamente 800 facetas u ommatidios; cada ommatido está compuesto por 8 células fotorreceptoras y 12 células del accesorias (Figura 1.4). A pesar de sus similitudes generales, las células fotorreceptoras pueden agruparse en tres clases funcionales (R1-R6, R7 y R8) en base a la morfología, forma de proyección de sus axones y sensibilidad espectral. Cada célula fotorreceptora posee una membrana microvellosa, llamada rhabdómero, donde se encuentran los pigmentos fotosensibles; los 8 rhabdómeros se encuentran organizados en forma trapezoidal asimétrica. El grupo de 8 fotorreceptores está rodeado por células pigmentadas que aislan ópticamente al grupo.

Este arreglo estereotipado de los diferentes tipos celulares en el ommatido se genera durante la última fase larval y las fases pupales.

Figura 1.4:

Estructura del ojo compuesto de *Drosophila*. Micrografía electrónica de barrido de un ojo de una mosca del tipo salvaje; y sección histológica sagital a través de la región distal de un ojo normal.

La morfogénesis del ojo se inicia a partir del margen posterior del disco imaginal anteno-ocular el cual, antes de que comience este proceso, es una simple monocapa epitelial de células en división. A partir del tercer estadio larvario el epitelio sufre entre 4 y 5 rondas de división celular que incrementan el número de células precursoras de ommatidios desde las 1300 iniciales a alrededor de 9700 (cerca de 12 células para cada uno de los 800 ommatidios de cada ojo). El patrón ocular propiamente dicho se forma a partir de una muesca o surco a lo ancho del disco imaginal, llamada “surco morfogenético”, el cual se mueve a través del epitelio desde la parte posterior del disco hacia la parte anterior, llegando a formar, entonces, los grupos de precursores comprometidos y no proliferativos (Thomas y Zipursky, 1994; Bate y Martinez-Arias, 1993).

La estructura precisa y repetitiva del ojo permite una fácil identificación de las células ommatidiales individuales muy tempranamente en el desarrollo. Los ommatidios se forman a lo largo del surco morfogenético a medida que el ojo crece y este surco se mueve, dando la impresión de una onda que viaja a través de la capa epitelial. Este “movimiento” es en realidad causado por la acumulación de ommatidios por detrás del surco, además del acortamiento que estas células sufren, en su eje apical-basal, al entrar en el surco. El movimiento de este surco morfogenético está gobernado por varias moléculas: *hedgehog (hh)*, que se expresa inmediatamente posterior al surco (Heberlein y col., 1993), *decapentaplegic (dpp)*, un miembro de la familia del TGF- β , que se expresa exactamente en las células que están dentro del surco (Penton y col., 1997; Pignoni y Zipursky, 1997), una proteína cinasa dependiente del AMPc (Tio, 1996; Heberlein y col., 1995); también *roughex (rux)*, *schnurri (shn)*, *saxophone (sax)*, *punt (put)*, *ultraspiracle (usp)* etc (Penton y col., 1997; Zelhof y col., 1997; Tomlinson y Ready, 1987(a); Thomas y Zipursky, 1994; Tomlinson, 1985; Tomlinson y col., 1988; Freeman, 1997).

La forma celular periódica que se puede apreciar en primera instancia una vez que pasó el surco morfogenético es una estructura tipo roseta formada por un anillo de 10 a 15 células uniformes alrededor de otras 4 o 5 células centrales. Las rosetas se transforman luego en arcos, formados por 6 o 7 células, los futuros fotoreceptores, más una o dos células llamadas “células misteriosas”. Los fotoreceptores se diferencian

secuencialmente: R8 expresa los antígenos neurales primero y es luego seguido por el par R2/R5, después por el par R3/R4, y finalmente por el par R1/R6; R7 es la última célula que expresa los antígenos neurales. Es importante notar que la expresión de los antígenos neurales se produce después que el destino de una célula pueda ser reconocido por su posición relativa respecto de las vecinas. El patrón de expresión de los antígenos neurales se correlaciona estrechamente con el ensamblado secuencial del ommatidio (Figura 1.5) (Dickson y Hafen, 1993; Bate y Martinez-Arias; 1993).

Figura 1.5:

Vista lateral y secciones correspondientes tomadas por debajo de la superficie apical correspondientes a seis fases secuenciales del desarrollo del ommatidio. Las flechas indican la dirección del movimiento. El movimiento coordinado de los núcleos contribuye al establecimiento de la simetría temprana del ojo en desarrollo.

El ojo compuesto de *Drosophila* es un modelo fundamental en el cual estudiar embriológicamente las preguntas evolutivas. La complejidad del ojo compuesto de la mosca de fruta y la simplicidad del organismo es una combinación poderosa y muy atractiva; por otro lado, es posible correlacionar muchos de los mecanismos descriptos para este insecto con otras formas vivientes, desde los nematodos a los humanos.

***Drosophila* como modelo de estudio:**

Those who can hold conversation with animals can best judge what is like to be the range of their moral feelings;...

Hibberd, 1863.

Drosophila melanogaster es un organismo ejemplar para estudiar el desarrollo embrionario; aunque se usó durante muchos años para estudiar las leyes de la genética, desde el trabajo seminal de Edward Lewis, Christiane Nüsslein-Volhard, Eric Wieschaus y otros científicos durante los años sesenta y setenta, esta mosca se ha tornado un modelo óptimo para los biólogos del desarrollo (Roush, 1995).

Es un organismo sumamente conveniente para el análisis genético, debido a su ciclo de vida corto, con sólo cuatro cromosomas y al hecho que pueden trazarse mutaciones directamente en los cromosomas que son politénicos en las glándulas salivales. Existen numerosas y poderosas herramientas moleculares, como los elementos P, que han permitido a una caracterización molecular extensiva del genoma de este animal (Lawrence, 1992; Bate y Martínez-Arias, 1993; Slack, 1991).

Objetivos específicos:

A fin de avanzar sobre el estudio del desarrollo y evolución de los ojos se decidió analizar molecularmente los genes *sine oculis* (*so*) y *chx-10*. Se estudió la función de los homeodomelios y de los dominios acompañantes de los productos del gen *so* y *chx-10*.

La primera parte de este trabajo está consagrada en el estudio y caracterización de las secuencias de ADN que es específicamente reconocidas por los HD, SixD y CVCD. Para esto se usó un método general desarrollado a fin de aislar y determinar fácilmente

sitios óptimos de reconocimiento por parte de dominios protéicos de unión específica al ADN.

La identificación de tales sitios de unión por parte de factores de transcripción específicos facilitaría enormemente la definición de los promotores blanco para estas proteínas reguladoras. Varios métodos, tales como el llamado “footprinting” y el método de protección a las ADNasas, pueden ser útiles para identificar regiones blanco en ciertos promotores; sin embargo, en muchos casos estos promotores blanco para los factores de trabscripción no se conocen.

Secuencias óptimas de unión para factores protéicos pueden seleccionarse fácilmente a partir de una biblioteca de oligonucleótidos de secuencias variables a partir de un procedimiento comunmente llamado SELEX (Tuerk y Gold, 1990). El Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX), dará la información necesaria para facilitar la búsqueda racional de sitios de unión en promotores candidatos (Wilson, 1995; Sheng y col., 1997; Ekker y col., 1991). Además, facilitará el análisis e interpretación de las distintas secuencias preferidas por cada dominio protéico y así iluminar los aspectos estructurales de la interacción de las proteínas con el ADN.

A travez de esta técnica se analizaron todos estos dominios y se identificó el sitio de reconocimiento óptimo para el *so* HD y SixD+HD.

En una segunda parte, se caracterizaron parcialmente dos genes homologos en *D. melanogaster* de los genes *Chx-10/vsx-1/ceh-10*. A partir en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se clonaron los dominios CVC de dos genes (*Dcvcl* y *Dcvcl2*), que tienen una alta homología aminoacídica en la región del dominio CVC con la familia de proteínas *Chx-10/vsx-1/ceh-10*. Finalmente se usó la secuencia del *Dcvcl2* como sonda para realizar una hibridación *in situ* de ácido nucléico en embriones de *Drosophila* a fin de reconocer su patrón de expresión durante el desarrollo.

Capítulo 2: Materiales y Métodos

Clonado y preparación de las proteínas:

Los cDNA del homeodominio (HD), el dominio Six (SixD) y el HD más el SixD (HD+SixD) del gen *sine oculis* (*so*) (provistos por Anne Goriely) fueron suclonados insertando los fragmentos amplificados por en un sitio BamHI en el vector pGEX-2T (Pharmacia). En forma similar, el CVCD del gen *chx-10* fue subclonado en un sitio SmaI y un sitio BamHI en el vector pGEX-3T (Pharmacia). Después del clonado se transformaron células de *E.coli* competentes (DH5.1) a fin de amplificar los plásmidos con los insertos.

Los cebadores usados para la amplificación son los siguientes:

5'SoSixD	5' CTAGGGATCCGGCTTCACCCAGGAGCAGGTGGCC 3'
3'SoSixD	5' CTAGGGATCCATCCCAGATGGTGCAGGGCAA 3'
5'SoHD	5' CTAGGGATCCATCTGGGATGGCGAGGAGACGAGC 3'
3'SoHD	5' CTAGGGATCCGTCTTGTTGTCAGCTCG 3'
5'Chx-10CVCD	5' AGATCGGATCCGAAGTGCTGGGGCCGGAGCAGCGTC 3'
3'Chx-10CVCD	5' CTAGGGATCCGCTGCTGCCTCCAGCGACTTTGTG 3'

Varios clones fueron luego seleccionados y secuenciados usando la técnica de Sanger y aquellos cuya orientación y secuencia fueron correctas se usaron para producir las proteínas fusionadas a la gutación S transferasa (GST).

Las proteínas de fusión fueron expresadas al transformar bacterias *E. coli* BL21 e induciéndolas con 0.2 mM de IPTG (Sigma). Las células fueron lisadas en y sonicadas durante 15 minutos; después se centrifugó el producto de la lisis durante 10 ' a 15,000 rpm, se tomó el sobrenadante contenido y luego se purificaron las proteínas fusión a travez de partículas de glutathione agarose. La suspensión de las proteínas se guardó a 4°C.

Protocolo de selección (Selex):

Se sintetizó una biblioteca de oligonucleótidos de secuencia variable (Operon Technologies) y se usó un cebador 3' como para la extensión a fin de hacer la biblioteca doblecatenaria (ds). Una pequeña fracción del fragmento cebador 3' se marcó en un extremo con gamma-32-P-ATP a fin de cuantificar la eficacia de la extensión.

En la primera ronda de la selección, 100 ng de la biblioteca de oligonucleótidos ds fueron mezclados con 10 ng de las proteínas fusionadas a la GST y unidas a las partículas de agarosa (10 µl); la mezcla fue rotada durante 1 hora a 4°C y en 500 µl del buffer del SELEX, según Wilson, y col., 1995 (20 mM Tris pH8.0, 10% el glicerol, 50 mM KCl, 0.5 mM EDTA, 20 µg/ml BSA, 1mM DTT y 2 µg/ml de polydIdC). Después la mezcla se centrifugó durante 2 ' a 5,000 rpm y el pellet se lavó dos veces con 0.5 ml del buffer del SELEX. El pellet fue resuspendido en 30 µl de agua, se lo calentó durante 10 ' y se lo centrifugó rápidamente. En la reacción subsecuente de PCR, 10 µl de este sobrenadante se usó como una matriz con 10 µl del buffer de PCR, 10mM Tris pH8.0, 50 mM KCl, 200 µM de cada dNTP, 10 µg/ml de cada cebador y 50 U/ml de la enzima *Taq* polimerasa (Roche), en un volumen total de 100 µl; la reacción de PCR consistió de 20 ciclos de amplificación de 94°C (30"), 44°C (30"), 72°C (30"), con un ciclo final de 10'a 72°C. En cada una de las siguientes rondas de selección, 10 µl de la reacción de la PCR de la ronda anterior se mezclaron con 10 µl de la suspensión de la proteína en las mismas condiciones; cada ronda de selección fue seguida por una amplificación (Figura 2.1).

Después de la ronda final de selección, una fracción de la reacción final de PCR, los oligonucleótidos individuales se extrajeron con fenol/cloroformo, precipitados con 2,5 volúmenes de alcohol etílico frío y cortados con 40u de EcoRI a 37°C durante 1 hora. Fueron posteriormente clonados en el vector pCRII (Invitrogen) y secuenciados con el cebador T7 usando el método de Sanger. Las secuencias fueron alineadas y de allí se derivaron las secuencias consenso (Figura 2.3).

Figura 2.1:

Representación esquemática del SELEX; según lo descripto en Wilson (1995).

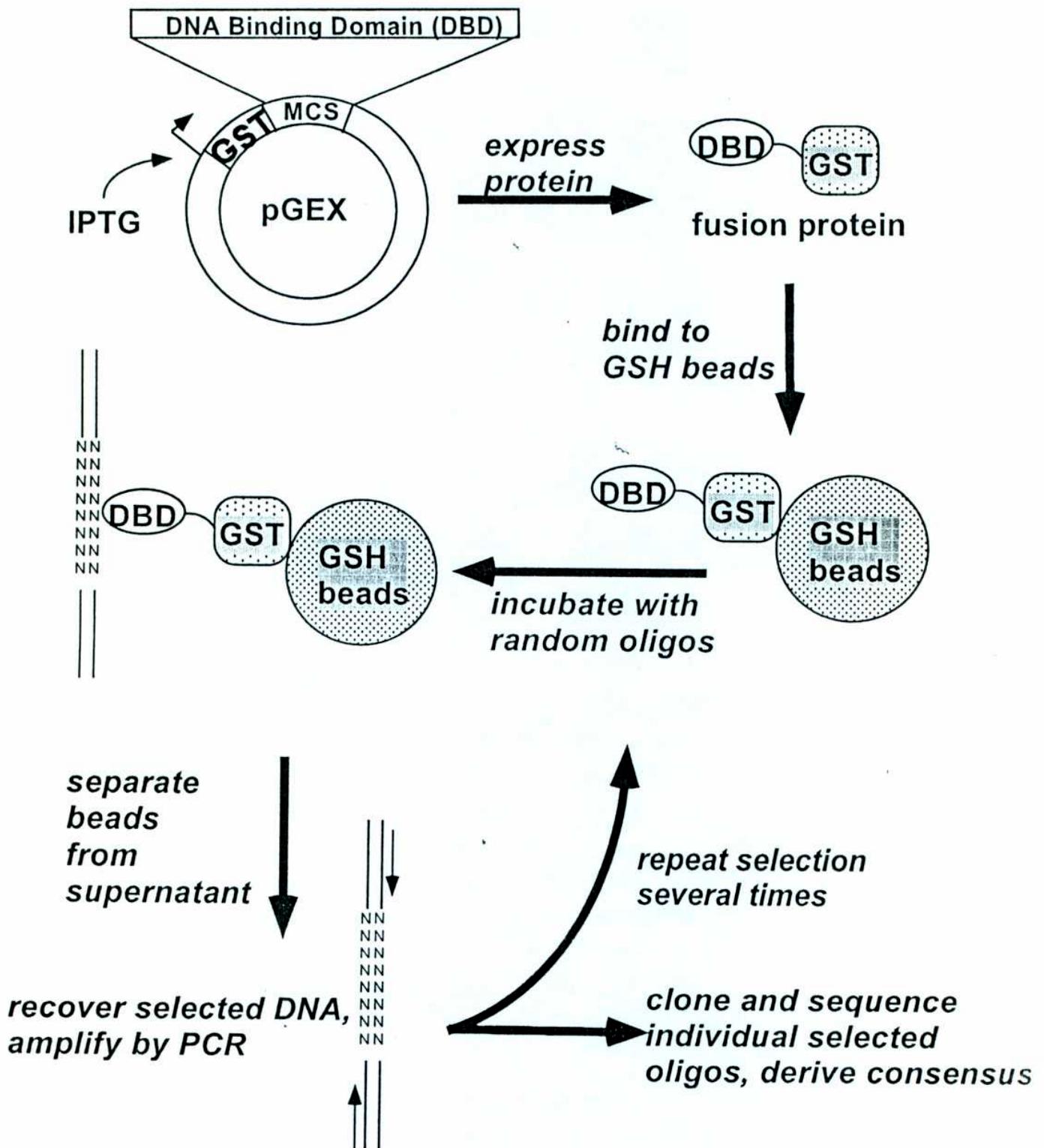


Figura 2.2:

Esquema y secuencia de los oligonucleótidos cebadores dirigidos contra las regiones flanqueantes fijas y de la biblioteca de secuencias variables usada en la selección(R30A):

5'R30A 5' CTAGGATCCGATACTCTC 3'
3'R30A 5' GCAGGATCCACTGCACTT 3'

R30A 5' CTAGGATCCGATACTCTCAGA (N30) CACAAGTGCAGTGGATCCTCG 3'

Operon Technologies, Inc., Alameda, CA 94501,
purificados por HPLC.

Figura 2.3:

Alineación de los oligonucleótidos seleccionados a partir de los cuales se derivaron las secuencias consenso.

33 34 36 41 42 23 31	1 5 10 15 20 25 30	CAGTGGATCCTCGCC <u>CTAGGATCC</u> GATACT AGGGCTGGTTGTGGG <u>CTCGGATCC</u> TCTCCC GCAGGCAAGCATNC <u>CTCGGATCC</u> CTACTT GCAGTGGATCCTCGT <u>CTAGGATCC</u> GATACT AGGGCTGGANGNGGGNT <u>CGGATCC</u> TCTCCC <u>GGACCGGATCC</u> AGCTTAGC GGCTGCACGATCGTCAAGG <u>CTCGGATCC</u> CG
--	--	--

GGGCTGGTTGTGGG**CTCGGATCC**NCTCC

Método para marcar radioactivamente los oligonucleótidos seleccionados:

Se hace una reacción de PCR 6x (300μl volumen del total dividido en 3 tubos), usando uno de los oligonucleótidos seleccionados como una matriz

Ciclo 1:

5min 94
1min 44
1min 72

Los siguientes 5 ciclos deben ser idénticos a aquéllos del procedimiento de la selección.

Después de la PCR, se extraen con fenol/cloroformo, se lleva la solución a 0.3M de acetato de sodio (AcNa), se adicionan 2.5 volúmenes alcohol etílico (EtOH), se precipita a -70°C, se lava con agua bidestilada, se seca en rotación al vacío y a temperatura de laboratorio durante 5', se resuspende en 20μl de agua y finalmente se los somete a una electroforesis en gel de agarosa al 4%. La banda correspondiente se purifica cortando el gel y extrayendo el ADN por centrifugación. Finalmente se purifica este ADN dos veces en fenol/cloroformo y se precipita como ántes y se resuspende en agua bidestilada; se mide la concentración a una OD260.

Ensayo de Gel-shift:

Todos los oligonucleótidos usados en los gel-shifts fueron purificados en gel y fueron ds. Las sondas se marcaron con la Klenow y α-32-P-dATP. En 20 μl, la proteína se diluyó con el siguiente buffer (20 mM Tris pH7.5, 10% de glicerol, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0.5 mg/ml BSA); luego se premezcló con el buffer GS (20 mM de Tris pH7.5, 10% de glicerol, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0.5 mg/ml BSA, 100μg/ml de polydIdC y ssDNA) durante 10 minutos en hielo. Después la proteína fue mezclada con 100 pg de la sonda marcada (en 20 mM Tris pH7.5, 10% de glicerol, 50 mM KCl, 100 μg/ml de polydIdC y 0.1% NP-40) durante 25 minutos a temperatura de laboratorio (RT).

La mezcla (20 μl) fue cargado en un gel de acrilamida no-desnaturalizante al 5% (29:1, poliacrilamida : bis-acrilamida) hecho en buffer TBE al 1.25X y finalmente se realizó la electroforesis a 12-15 Volts durante 2-2.5 horas. El gel se fija en una solución 10% de ácido acético (Hac) y 10% de EtOH durante 15 ', se seca a 80°C durante 1-1.5 horas y se expone a una pantalla de PHOSPHOIMAGER (Molecular Dinamics) y/o a una

película fotográfica (Kodak). Las cuantificaciones del gel-shift se hicieron usando el programa ImageQuant (Molecular Dinamics) .

El oligonucleótido seleccionado usado como sonda para el gel-shift fue:

SoHD y SoSixD+HD:

5' CTAGGATCCGATACTCTCAGAAGGGCTGGTGTGGGCTCGGATCCTCTCC
CACAAAGTGCAGTGGATCCTCG 3'

Protocolo de colección y fijado de los embriones:

- 1) coleccionar los embriones a partir de la placa de ovoposición usando un cepillo fino humedecido en el buffer PBTween.
- 2) descargar los embriones en un tamiz pequeño sumergido en el buffer PBTween.
- 3) lavar los embriones en hipoclorito de sodio durante aproximadamente 3 a 4 minutos.
- 4) lavar los embriones cuidadosamente en el tamiz con agua DDL.
- 5) preparar un tubo de vidrio grande con 1-Heptano (1 ml) y PBTween (0,6 ml); agregar los embriones a esta solución usando un cepillo fino (los embriones permanecerán en la interfase formada entre los dos líquidos).
- 6) agregar formaldehído (10%) hasta una concentración final de 4% (~ 0,25 ml).
- 7) rotar todo a RT durante 25 ' a 30 '.
- 8) extraer toda la fase inferior y agregar Metanol frío (1 ml).
- 9) agitar vigorosamente durante aproximadamente 1 ' a fin de desvitelinar los embriones (los que estén apropiadamente desvitelinados irán al fondo del tubo).
- 10) extraer toda la solución intentando no perturbar los embriones.
- 11) lavar dos veces con Metanol frío y, después de eso, guardar los embriones en Metanol a -20°C hasta su uso (normalmente se pueden mantener durante 2 a 4 días).

Hibridación *in situ*:

Los embriones fueron decorionizados en 100% de hipoclorito de sodio y se fijaron en una mezcla 1:1:2 de 1X PBS: 10% el formaldehído: heptano. Se hicieron sondas de ADN usando el uracilo marcado con digoxigenina usando el kit Genius (Boehringer) y se hibridaron a los embriones.

Los embriones se hibridaron con una sonda de ADN de 171 nucleótidos contra el dominio CVC del gen *Dcv2* de *Drosophila*. Se usaron anticuerpos anti digoxigenina que se acoplaron a la fosfatasa alcalina a fin de detectar la sonda. Se realizó un control positivo de la técnica usando el gen *eyeless* tamaño completo.

Figura 2.4:

Secuencia nucleotídica de la sonda usada para la hibridación *in situ* correspondiente al gen *Dcv2*.

5' acggagaaaatgctggggccacagcacaaaaatggccgaatacggattgtatggagcg
atggtgaggcattcgctgccactgccggagaccatcatcaagtgcggccaaggaggac
gagtccgtggcgccgtggctgctggaaatgcacaaaaagtctctagaagccgcagca
agccg 3'

Capítulo 3: Resultados

Unión de los homeodomelios al ADN

Identificación de las secuencias óptimas de reconocimiento:

Condiciones del ensayo de selección

La genética bacteriana ha permitido la identificación de los factores de transcripción y de sus operadores; posteriormente fue demostrado que muchos factores de transcripción también están presentes y poseen importantes funciones durante el desarrollo de los animales más avanzados; los análisis genéticos en los animales no han sido capaces de identificar las regiones de reconocimiento para tales reguladores. Se cree que la razón de esto se debe a la gran redundancia que hay dentro de los promotores de los genes eucariotas. Este hecho ha dificultado la identificación de las secuencias blanco biológicamente relevantes dentro del ADN para las proteínas reguladoras. Las proteínas con homeodomelio (HD) se han transformado casi en el paradigma de los factores de transcripción, habiéndose identificado extensivamente las secuencias específicas de unión por parte de los HDs. Pero las secuencias son muy similares y esto dificulta la interpretación de los papeles individuales de las distintas proteínas con HD.

Tomando estos dos nuevos genes que están involucrados en el desarrollo del ojo, decidí determinar las secuencias de ADN óptimas que pudiesen interactuar con sus HDs y la relación con la secuencia consenso para otros HDs. Esta pregunta se relaciona con la cuestión general de cómo el HD ha hecho para desarrollar semejante cantidad de actividades biológicas distintas.

Para esto empleé el ensayo conocido como SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) (Tuerk y Gold, 1990); la técnica intenta aislar a representantes raros a partir de bibliotecas de oligonucleótidos complejas basándose en una selección a partir de la unión selectiva de la proteína sobre el ADN. Los ácidos nucleicos que sean reconocidos con mayor afinidad irán siendo aislados sistemáticamente y luego podrán reproducirse (amplificarse) directamente *in vitro* usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Tuerk y Gold, 1990); (ver Figura

2.1 en Materiales y Métodos). Muchos sitios óptimos de ADN para distintas proteínas reguladoras se han aislado de esta manera (Wilson, 1995; Jun, 1995).

En este ensayo, las proteínas de fusión formadas por los diferentes dominios de las proteínas mencionadas (So y Chx-10) y la glutatión S transferasa (GST), se unieron a partículas de glutatión agarosa. Estos complejos se incubaron luego con una biblioteca de oligonucleótidos con una secuencia variable consecutivo de 30 nucleótidos (N30) flanqueadas por secuencias arbitrarias fijas. Se diseñaron cebadores dirigidos contra estas secuencias flanqueantes para amplificar los oligonucleótidos seleccionados después de cada ronda de incubación usando la PCR. El ADN amplificado resultante se usó como punto de partida para la siguiente ronda de selección.

Cada selección empezó con 100ng de la biblioteca de oligonucleótidos doblecatenarios contenido aproximadamente 10^{12} moléculas, asumiendo que cada fragmento contiene potencialmente sólo un sitio para el ligando. El sitio de unión esperado es realmente más corto que la longitud de la secuencia variable dentro de cada oligonucleótido y por consiguiente se espera que el número real de sitios de unión que se encuentran en 100ng de la biblioteca sea muy alto. Por ejemplo, si el sitio reconocido esperado fuese de 10bp de largo; entonces, en una biblioteca de oligonucleótido con 30nt consecutivas de secuencia variable, el número de sitios de unión igualaría al número de moléculas, multiplicado por nueve.

El ensayo de selección está compuesto de tres pasos. El primer paso es el paso de la selección en el que el dominio protéico que reconoce al ADN se une a los oligonucleótidos que tengan secuencias similares a las óptimas específicas él. La proteína se incuba con el ADN durante noventa minutos a fin de asegurar que tuvo contacto con la biblioteca entera. La mezcla se mantiene en agitación constante para asegurar una mezcla adecuada, ya que las partículas tienden a concentrarse y precipitar. Además de los 100ng de la biblioteca de oligonucleótidos, también se agregó 1 μ g de polydIdC para evitar la unión inespecífica al ADN por parte de las partículas, el GST o cualquier otra interacción inespecífica general de la proteína reguladora con el ADN. La incubación se realizó a 4°C para inhibir la acción de proteasas contaminantes residuales de la fracción protética.

Se hicieron varias suposiciones sobre el dominio protéico y las secuencias de unión que seleccionará este ensayo. Se supone que el dominio protéico se unirá a un ADN doblecatenario; también se supone que las contribuciones de cada par de bases específico a la afinidad de la unión global son aditivas. Basándose en esto, se espera que dentro de la biblioteca inicial haya algunas secuencias de alta afinidad y muchos elementos de afinidad media y baja. Se espera que los oligonucleótidos de alta afinidad sean muy similares a la secuencia consenso de reconocimiento. Los elementos de afinidad media y baja no serían muy similares unos con otros y no derivarán en un consenso.

El segundo paso de la selección es la división (partición) de los oligonucleótidos unidos de los libres. La función principal de este paso es la separación eficaz de los oligonucleótidos unidos de los libres a fin de eliminar los fragmentos unidos inespecíficamente al tubo, o a la GST, o las partículas soporte. Las partículas se centrifugan y el sobrenadante se desecha. La proporción del volumen de reacción (500 μ l) al volumen de las partículas conteniendo las proteínas (10 μ l) fue aumentado al máximo para asegurar una partición efectiva de los oligonucleótidos, según Wilson (1995). Las partículas centrifugadas se lavan con 1ml del mismo buffer de reacción, que además contiene 1 μ g de polydIdC. Los oligonucleótidos que se unieron inespecíficamente serán eliminados en su mayor parte durante este lavado. Las partículas se mezclan vigorosamente con esta solución de lavado para asegurar que toda la proteína haya sido expuesta al buffer. Las partículas se centrifugan de nuevo y posteriormente se lavan con 1ml del buffer de reacción con 1 μ g de poly dIdC. Despues del primer lavado se centrifuga por unos segundos y al eliminar el sobrenadante de la centrifugación quedará un volumen residual de buffer de aproximadamente 30 μ l; el segundo lavado ayuda a diluir la concentración de oligonucleótidos libres que pudiesen estar presentes en este volumen residual. Cualquier oligonucleótido que permanezca unido a las partículas será amplificado posteriormente.

El tercer paso del ensayo de selección es la amplificación de los oligonucleótidos seleccionados. Las partículas que contienen la proteína fusión unidas a los oligonucleótidos se calientan por 5 minutos a 100°C en 30 μ l de agua a fin soltar la

proteína y el ADN de las partículas. Todo se centrifugan de nuevo rápidamente para que solo el ADN permanezca en solución. Una alícuota de la solución con los oligonucleótidos seleccionados se usa como matriz de amplificación para la reacción de PCR. Se usan como cebadores en la reacción de la PCR unos oligonucleótidos dirigidos contra las secuencias fijas que flanquean a la secuencia variable interna. Después de 20 rondas de amplificación, que puede generar una amplificación de hasta 1,000,000 veces, se realiza una ronda final de extensión de diez minutos para asegurar que los oligonucleótidos queden doblecatenarios y estén listos para la próxima etapa de la selección. La preocupación principal de este paso de amplificación es disminuir al máximo cualquier contaminación, porque todo oligonucleótido contaminante agregado en este paso se amplificará y podrá enmascarar los resultados de la selección.

El rendimiento del máximo de la PCR está cerca de 1 μ g, basándose en las cantidades de cebadores y oligonucleótidos libres iniciales y de observaciones experimentales previas (Wilson, 1995). Serán necesarias varias rondas de selección para reducir la complejidad de la biblioteca. En las rondas finales de la selección, el dominio protéico de unión al ADN estará discriminando entre las secuencias por las que tiene pequeñas diferencias de afinidad. Si la concentración inicial de la proteína en la primera ronda de selección es incapaz de seleccionar los oligonucleótidos con bastante alta afinidad, entonces aún después de muchas rondas de selección la biblioteca no convergirá en una secuencia consenso. Si la cantidad de proteína en cada ronda de selección es demasiado alta, entonces se requerirán muchas rondas de selección antes que la biblioteca converja en una secuencia consenso.

Secuencias seleccionadas:

Los oligonucleótidos seleccionados son luego clonados, amplificados en bacterias y secuenciados. A fin de determinar la posible existencia de una secuencia consenso seleccionada en los oligonucleótidos secuenciados, cada uno de ellos fue ordenado manualmente en base a la mayor homología de secuencias internas posible, pero teniendo en cuenta también la posición de las secuencias flanqueantes comunes a todos los oligonucleótidos; posteriormente se construye una matriz en la que se colocan las

posiciones de cada una de las bases y el número en que estas se presentan en cada caso; esta matriz recibe el nombre de “consensograma” (Wilson y col., 1993; Wilson, 1995).

La secuencia mostrada a lo largo de la parte inferior del consensograma representa la homología general de todos los oligonucleótidos ingresados en el consensograma. Las reglas usadas para determinar el consenso general de secuencias de reconocimiento mostradas para cada consensograma son las siguientes: el nucleotido específico es elegido como el nucleótido consenso en cada posición:

- 1) si el nucleótido está presente en el 75% de los oligonucleótidos seleccionados,
- 2) si el nucleótido más frecuente está presente en menos del 75%, entonces un segundo nucleotido es elegido para esa posición (este segundo nucleótido más frecuente deberá aparecer dos veces más frecuentemente que el tercer nucleótido más frecuente).

Primer SELEX:

Selección del HD de *sine oculis*

El *so* HD, a partir de una biblioteca de oligonucleótidos de secuencia variable de 30 nucleótidos, R30A, seleccionó, después de ocho rondas, un sitio de unión óptimo de 12bps, **GGGCTCGGATCC**. Para la primera selección, los oligonucleótidos individuales fueron clonados y secuenciados a partir de la sexta, séptima y octava rondas de selección. Las secuencias de la sexta ronda fueron difíciles alinear y no convergieron en una secuencia de unión consenso.

Selección del SixD+HD de *sine oculis*

El *so* SixD+HD fue analizado, usando la misma biblioteca de oligonucleótidos de secuencia variable, R30A. Después de ocho rondas, resultó un sitio de óptimo de unión de 12bps, **GGGCTCGGATCC**, idéntico que el del *so*HD. Para la primera selección, los oligonucleótidos individuales fueron clonados y secuenciados a partir de la sexta, séptima y octava rondas de selección.

La Figura 3-1 muestra la alineación de las secuencias seleccionadas después de la última ronda de selección.

Figura 3.1:

Alineación de los fragmentos seleccionados por el *soSixD+HD*.

Selección del SixD de *sine oculis*

El SixD aislado también fue testeado, usando la misma biblioteca de oligonucleótidos de secuencia variable. Después de ocho rondas de selección, los oligonucleótidos individuales fueron clonados y secuenciados solo para la octava ronda de selección. Las secuencias de la última ronda no mostraron secuencia consenso alguna y no pudieron ser alineadas (las secuencias individuales no se muestran).

Selección del domino CVC de *Chx-10*

El dominio CVC de *chx-10* se testeó de la misma forma que los dominios del gen *so* y usando la misma biblioteca de oligonucleótidos de secuencia variable, R30A. Después de ocho rondas de selección, los oligonucleótidos individuales fueron clonados y secuenciados. Las secuencias que se obtuvieron no pudieron ser alineadas ya que no convergieron en una secuencias consenso.

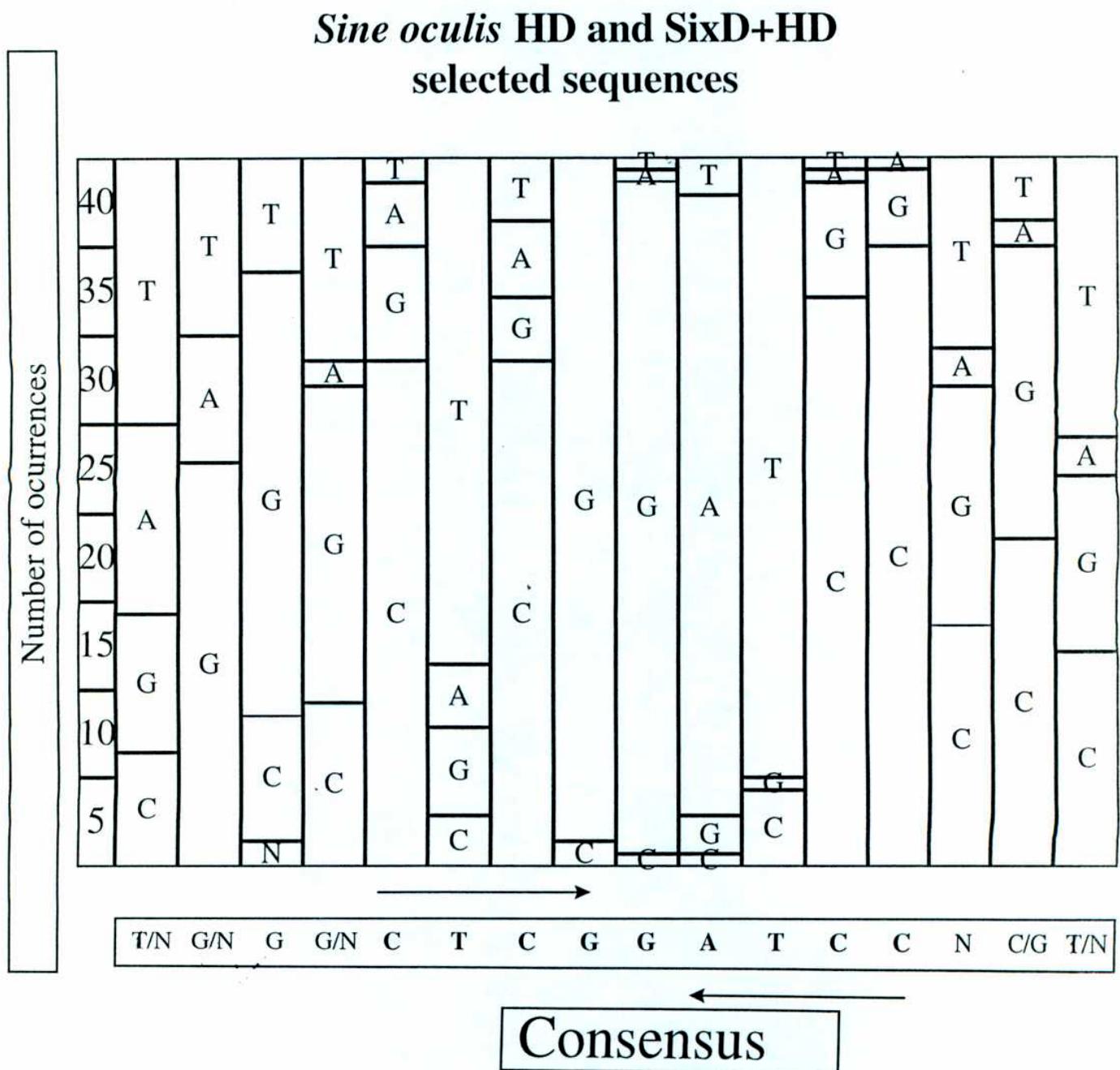
Segundo SELEX:

Se llevó a cabo un segundo ensayo de selección para el *soHD* y el *soSixD+HD*, siguiendo las mismas condiciones que para el primero. Después de ocho rondas de selección, los oligonucleótidos individuales fueron clonados y secuenciados. Las secuencia consenso que se obtuvo para ambos dominios fue igual que para el primer SELEX.

En este caso 40 clones diferentes (ambos para el HD y el SixD+HD) se alinearon y el consensograma derivado es muestra en la siguiente Figura 3.2. El sitio consenso se indica en la parte inferior del gráfico y representa la secuencia óptima de unión.

Figura 3.2:

Alineación 'consensograma' de los fragmentos seleccionados por el *soSixD+HD* y el *soHD*.



Unión del SixD+HD a los oligonucleótidos seleccionados:

Fue realizado un ensayo de gel-shift para probar la especificidad de unión de la proteína SO a los oligonucleótidos portadores de la secuencia consenso seleccionados el SELEX. Sólo se probó una secuencia seleccionada por el SixD+HD, debido a que el soSixD+HD seleccionó ligandos conteniendo la misma secuencia central tanto para el HD como para el SixD+HD. Cada uno de los péptidos fueron subclonados en un vector de expresión pGex-2T que produjo un péptido fusionado a GST. El GST solo fue usado como control para excluir cualquier efecto que este dominio pudiese haber tenido durante la selección para el oligonucleótido marcado que se usa en el gel-shift.

Por otro lado; la sonda marcada radioactivamente se compitió con oligonucleótidos fríos derivados de la biblioteca de secuencias variables (R30A) que se usó como punto de partida para el SELEX; este control fue realizado para determinar si existe alguna unión del so SixD+HD a las secuencias fijas flanqueantes.

Se escogió una sonda para el gel-shift conteniendo el sitio de unión óptimo seleccionado, flanqueado por la secuencia fija. Las sondas doblecatenarias fueron marcadas usando la PCR (Ver Materiales y Métodos). La proteína y la sonda se diluyeron en el buffer GS (15mM Tris pH 7.5, 6.5% el glicerol, 90mM KCl, 0.7mM EDTA, 0.2mM DTT, 0.5mg/ml BSA, 50ng/ μ l polydIdC, 0.5% NP40) y se incubaron juntos durante 20 minutos a temperatura ambiente (RT). La mezcla fue posteriormente sembrada en un gel de acrilamida 5% no-desnaturalizante y se llevó a cabo la electroforesis. El resultado del gel-shift se muestra en la Figura 3.3.

Figura 3.3:

Gel-shift con el usando el oligonucleótido seleccionado como sonda. Este gel-shift demuestra que SO se une específicamente a uno de los fragmentos que seleccionó a partir del SELEX.

Unión del *so* HD al sitio P3K:

Usé un oligonucleótido conteniendo una secuencia de unión óptima para HDs con una K₅₀, a fin de probar la posibilidad de que el *soHD* y el *soSixD* pudiesen reconocer específicamente a la secuencia TAATCC. Se usó el oligonucleótido P3K que contienen la secuencia TAATCCNATTA. SO reconoció con alta afinidad este oligonucleótido; usando una serie de diluciones a a quinta de extractos de la proteína, realicé un gel-shift, el que se muestra en la Figura 3.4. Usé también un control positivo, el *prdHD* que específica y cooperativamente reconoce la secuencia central del ligando P3K.

Figura 3.4:

Gel-shift con el *soHD*, *soSixD* y *prdHD* (control) usando los oligonucleótidos P3K como sonda. Este gel-shift demuestra que aunque el *soHD* seleccionó a partir del SELEX una secuencia que no tiene el TAAT canónico, puede unirse al sitio TAATCCGATTA, probablemente gracias a la secuencia interna subrayada.

Capítulo 4: Resultados

Clonado molecular y caracterización de *Dcvcl* y *Dcvcl*.

Clonado de *Dcvcl* y *Dcvcl*:

A partir de los tres genes pertenecientes a la familia *chx-10/vsx-1/ceh-10*, diseñé unos oligonucleótidos de secuencia degenerada dirigidos contra la porción aminoacídica más conservada en las tres proteínas. Debido a que la característica distintiva de este grupo es la presencia del dominio CVC, fue contra esta parte de la proteína que se diseñaron los cebadores para tratar de amplificar el posible homólogo en *Drosophila* para estos genes. Basado en la reacción PCR y usando los cebadores degenerados, amplifiqué parcialmente dos genes en *D. melanogaster* que son homólogos a la familia de genes *chx-10/vsx-1/ceh-10* (Figura 4.1).

De un extracto de ADN genómico total realicé varias reacciones de PCR y de todos los fragmentos amplificados y separados por electroforesis en gel de agarosa (1%) seleccioné 8 en base a su tamaño estimado, los cuales cloné y sequencie. Dos de los clones tuvieron una secuencia de ADN que, en uno de sus marcos de lectura, dieron una secuencia de aminoácidos conservada y similar al dominio CVC. Estos dos genes han sido llamados *Dcvcl* y *Dcvcl* (*Drosophila chx-10/vsx-1/ceh-10* número 1 y número 2).

En la Figura 4.1a. se muestran las secuencias nucleotídicas de estos dos fragmentos obtenidos en *Drosophila* y en la Figura 4.1b la secuencia de aminoácidos de los dominios CVC de los tres miembros fundadores de la familia y de los dos clones que he obtenido; se indican encuadradas las secuencias con más alto porcentaje de conservación.

Figura 4.1a

Secuencias nucleotídicas del dominio CVC de *Dcvcl*.

5' acggagaaatgctggggccacagcacaaaaatggccgaatacggattgtatggagcgatggta
ggcattcgctgccactgcggagaccatcatcaagtccggccaaggaggacgatcggtggcgcc
gtggctgctggaaatgcacaaaaagtcttagaagccgcagcaagccg 3'

Figura 4.1b

Secuencia de aminoácidos de los dominios CVC de chx-10, ceh-10, vsx-1, Dcvcl y Dcv2.

Chx-10	206	REKCWGRSSVMAEYGLY GAMVRHSIPLPESILKSAK-DGIMDSCAPWLL----GMHKKSLAAA	264
Ceh-10	194	TEKTWGKSTIMA EYGLY GAMVRHSLPLPETITKSAEAADPQQSAAPWLL----GMHKKSMEEAAA	253
Vsx-1	207	REKCWGRSSVMAEYGLY GAMVRHSIPLPESIINSAK-NGMMGSCAPWLLGEPA GMHKKSL EIGK	268
Dcvcl	1	KVWGGSTIMA EYGLY GAMVRXSLPLP	26
Dcv2	1	TEKCGWHSTKMAEYGLY GAMVRHSLPLPETIIKSAK---EDES VAPWLL----GMHKKSLAAA	57

El alto nivel de conservación a lo largo del CVCD podría indicar un papel biológico importante para este dominio, que podría ser un dominio de exportación nuclear, o una secuencia de interacción proteína-proteína, o aunque el ensayo de SELEX no generó ninguna secuencia consenso, este dominio de la proteína también podría estar involucrado en el reconocimiento específico del ADN.

La conservación de las secuencias de *Ceh-10* y *Vsx-1* con *Chx-10* se extiende bastante más allá del dominio CVC, e incluye al homeodominio (Figura 4.2a); una representación esquemática del gen completo se puede ver en la Figura 4.2b.

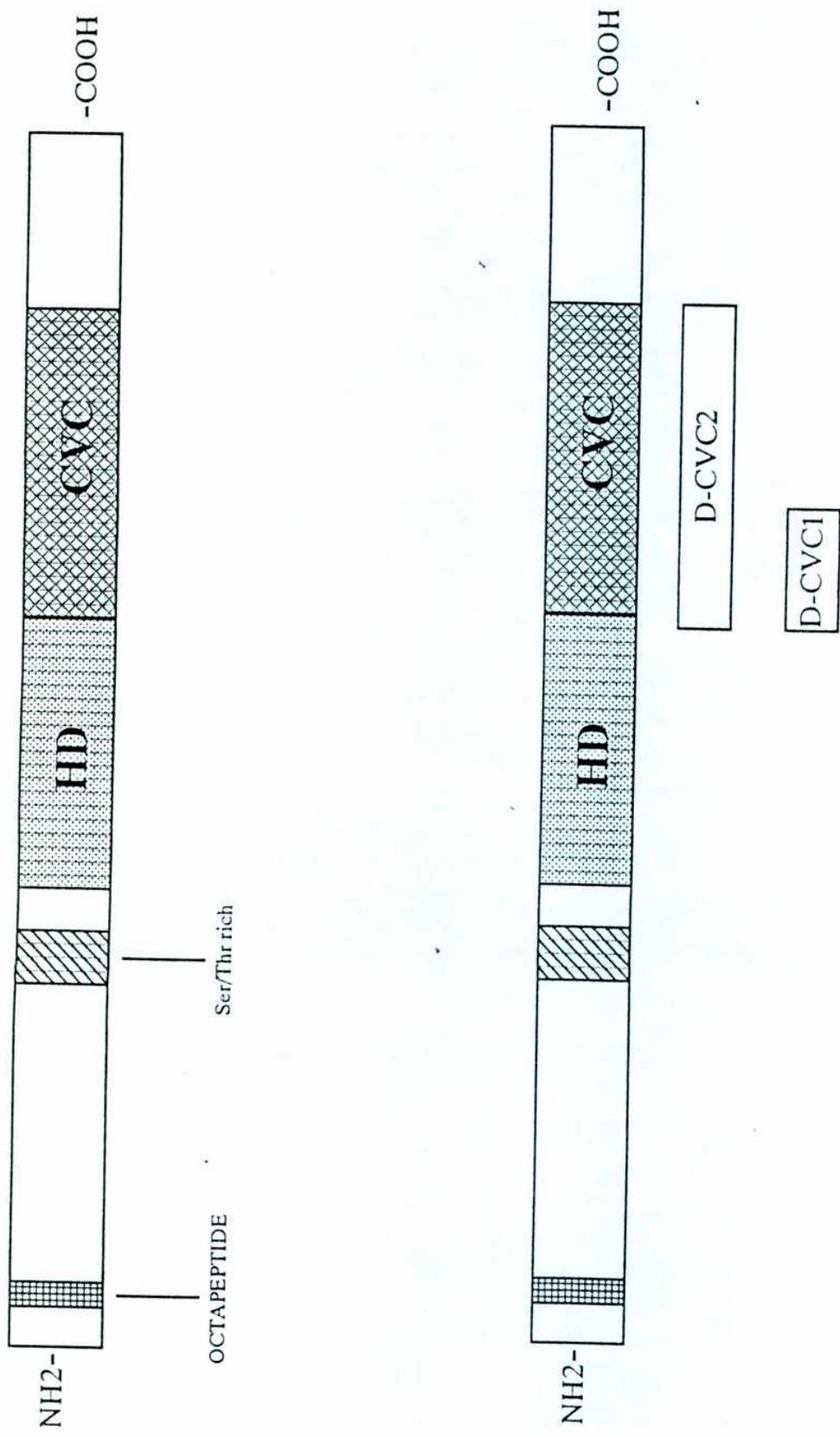
Figura 4.2a:

Secuencia aminoacídica del homeodominio de las proteínas Chx-1, ceh-10 y Vsx-1.

Chx-10	QTKKRKKRRHRTIFTSYQLEELEKAFNEAHYPDVYAREMLAMKTEL PEDRIQVWFQNRR A
ceh-10	KASKRKRRHRTIFTQYQIDELEKAFQDSHYPDIVAREVLAGKTELQEDRIQVWFQNRR A
ceh-10	KRRHRTVFTSHQLEELEKAFHEAHYPDVYAREMLAMKTEL PEDRIQVWFQNRR A

Figura 4.2b:

Representación esquemática de los genes *Chx-1*, *ceh-10*, *Vsx-1* y las porciones de los genes de *Dcvcs* que han sido clonadas.



Caracterización molecular:

Estos dos fragmentos obtenidos fueron analizados cuidadosamente. El fragmento de 26 aminoácidos de largo de la proteína codificada por el gen *Dcvc1* presenta un 77% de homología general con los 26 aminoácidos “homólogos” presentes en la proteína vsx-1, 92% con la ceh-10 y 77% con la chx-10.

El fragmento de 57 aminoácidos de largo representando la totalidad del CVCD correspondiente a la proteína Dcvc2 presenta un 75% de homología general con la vsx-1, 81% con la ceh-10 y con la chx-10. Entre las Dcvc1 y Dcvc2 hay un 85% de homología.

ceh-10 tiene un 74% de homología con chx-10 y un 68% con vsx-1, en el CVCD. chx-10 y vxs-1, ambos de vertebrados, tienen entre sí un 86% de homología en el CVCD.

Las zonas de mayor grado de similitud se señalaron en la Figura 4.1b con un recuadro, esto está de acuerdo a lo informado por Svendsen y Mac Ghee (1995). Este alto nivel de homología entre los genes Dcvc1 y Dcvc2 en el dominio CVC con los otros genes identificados previamente es el aspecto más interesante descubierto y es altamente probable que estos genes de *Drosophila* también posean un HD.

Adicionalmente, otros autores identificaron otros genes en vertebrados que se expresan específicamente en la retina y que también tienen un HD y un CVCD; algunos son el vxs-2 en el pez dorado y miembros en el pez zebrita y en pollo (Svendsen y Mac Ghee, 1995).

El patrón embrionario de la expresión de *Dcvc2*:

Usando el fragmento de 171 nucleótidos amplificado correspondiente al *Dcvc2* se fabricó una sonda a fin de realizar una hibridación *situ en* embriones de *Drosophila* tipo salvaje; la hibridación que se logró muestra que el gen *Dcvc2* presenta un patrón de expresión restringido espacial y temporalmente.

La hibridación más abundante se presentó en la regióncefálica de los embriones inmediatamente después de la retracción de la banda germinal (Figura 4.3a).

Dcvc2 también aparece expresarse en ciertos grupos de neuronas en el SNC o grupos aislados de precursores neuronales o de órganos sensoriales (Figura 4.3b)

(Harteinstein, 1993; Gilbert, 1994; Ernst Wimmer, comunicación personal). La ventana de expresión de *Dcvc2* se extiende entre los estadios 12 y 14 de la embriogénesis de *Drosophila*, según lo determinado por la morfología de los embriones y por el patrón de expresión del gen *eyeless*, usado como control de la técnica de hibridación y marcador de la edad de los embriones (Figura 4.3c).

Our way of looking at Nature, and of speaking about her, varies from year to year; but a fact once seen, a relation of cause and effect once demonstratively apprehended, are possessions which neither change nor pass away, but, on the contrary, form fixed centres, about which other truths aggregate by Natural affinity.

Huxley, 1908.

Figura 4.3a

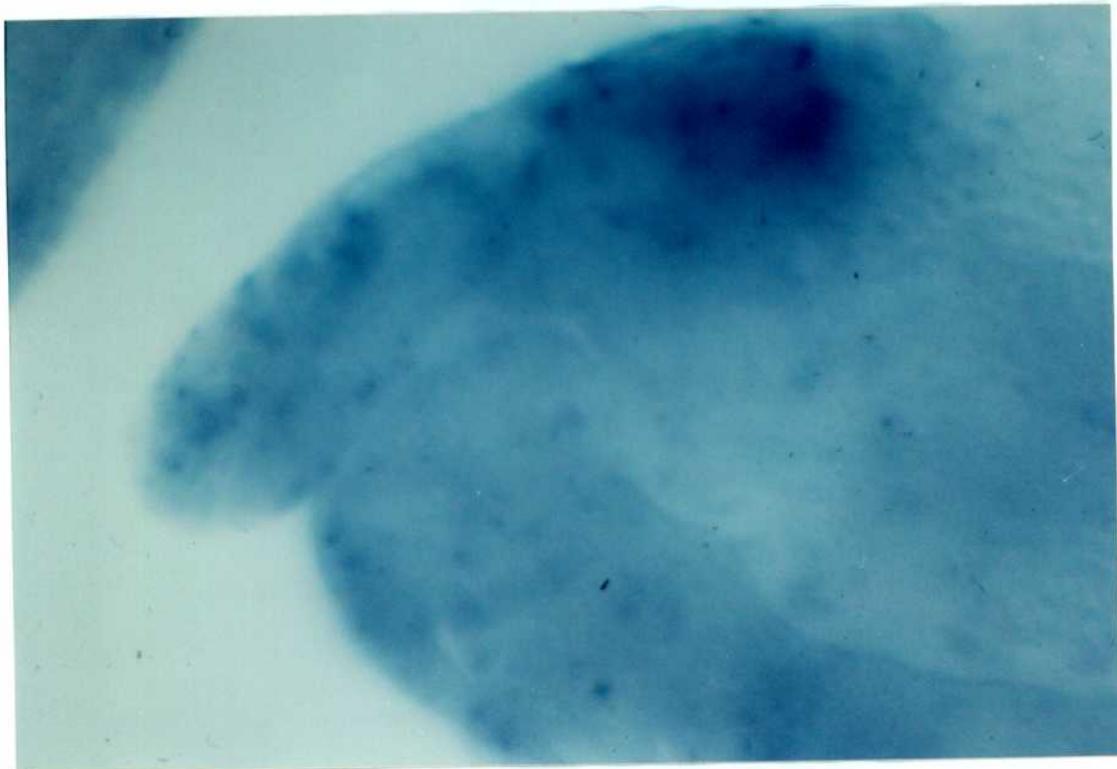


Figura 4.3b

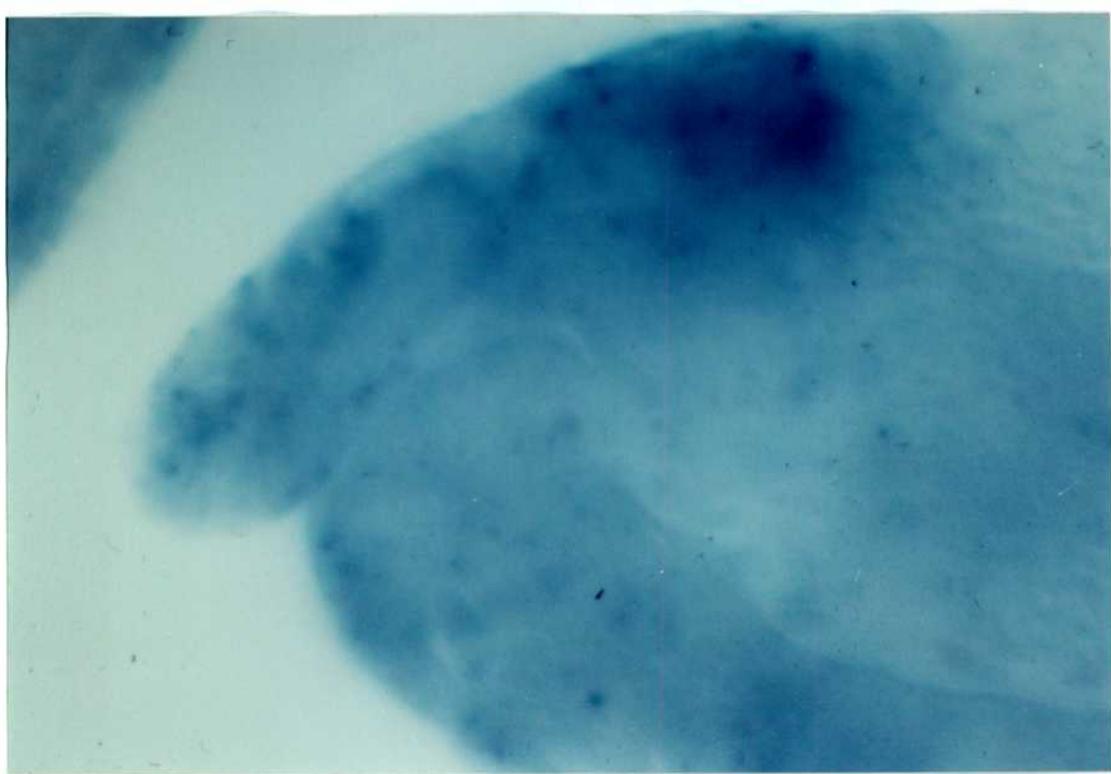


Figura 4.3c



Capítulo 5: Discusión

El residuo 50 del HD y la especificidad de unión al ADN:

Los HDs que dimerizan cooperativamente en el sitio P2, presente en las proteínas codificadas por los genes *prd*, *gsb* y *lune*, poseen una serina (S) en la posición 50 del HD (Wilson, 1995; Jun, 1995). Se vió que esta misma posición en otros HDs interactúa con las pares de bases (bps) inmediatamente 3' a una secuencia central **TAAT** (Kissinger, 1990). Estas bps corresponden al centro de simetría en el sitio palindrómico P2. Me interesó entonces saber cómo se puede interpretar esto hecho en términos de las secuencias que obtuve para el *soHD*, el cual tiene una lisina (K) en esa posición. El SELEX llevado a cabo previamente por David Wilson con el *prd*HD en que la serina en la posición nueve de la RH (equivalente a la posición 50 en el HD) se había mutado al glutamina (Q50) o lisina (K50) seleccionó las secuencias mostradas en la Tabla 5.1.

Todos los oligonucleótidos seleccionados por los *prd*HDs desplegaron una secuencia que contiene dos sucesiones **TAAT** invertidas, cada una seguida por una pirimidina. En el caso del mutante Q50, sin embargo, tres bps separaban al los **TAATs** invertidos, en lugar de las dos bps del *Prd* tipo salvaje.

La mayoría de los HDs que poseen una Q en la posición 9 de su hélice de reconocimiento, como el del gen *Mix-1* de *Xenopus* puede reconocer y unirse a la sucesión **TAATYN**.

Algunos HDs del tipo *prd* llevan naturalmente una lisina (K) en la posición nueve de la hélice de reconocimiento. Un HD mutado cuya S50 se ha cambiado a K50 seleccionó el la secuencia consenso **TAATCC** y su unión se produjo en forma monomérica. Esto sugiere que la presencia de una lisina en la posición 50 del HD puede interferir en la formación de un dímero, o debilitarlo suficientemente como para perjudicar la selección de sitios palindrómicos, que son más largos y por consiguiente en se presentar frecuentemente en las bibliotecas de oligonucleótidos de secuencia variable. El gen *Goosecoid* (*gsc*) de *Xenopus*, un miembro de la clase de HDs tipo *prd* que naturalmente posee una lisina en la posición 50, se comporta de manera similar, reconociendo la secuencia **TAATCC** (Wilson, 1995).

Sine oculis, que naturalmente también posee una lisina en la posición 50 del HD, seleccionó la secuencia **CTCGGATCC**.

Sitios óptimos de unión al ADN por parte de diferentes HDs:

Hay un aspecto importante en cuanto al reconocimiento del ADN por parte de los HDs en general y es que las interacciones específicas de secuencia se producen a través de dos regiones de la proteína, la hélice de reconocimiento y el brazo N-terminal (Kissinger, 1990; Klemm y col. 1994) (Figura 5.1). La hélice de reconocimiento se inserta en el surco mayor del ADN.

Figura 5.1:

Esquema tridimensional del *prd*HD unido a una molécula de ADN.

Otros investigadores han realizado SELEX para varios HDs de varias clases (Wilson, 1995). La mayoría de los HDs tienen una especificidad de unión al ADN muy similar y casi todos tienen secuencias óptimas de unión que incluyen a la secuencia central **TAAT**; este no parece ser el caso para el *soHD* o el *soSixD+HD*.

Se resumen los resultados de las selecciones para varios HDs en la siguiente Tabla 5.1.

Tabla 5.1:

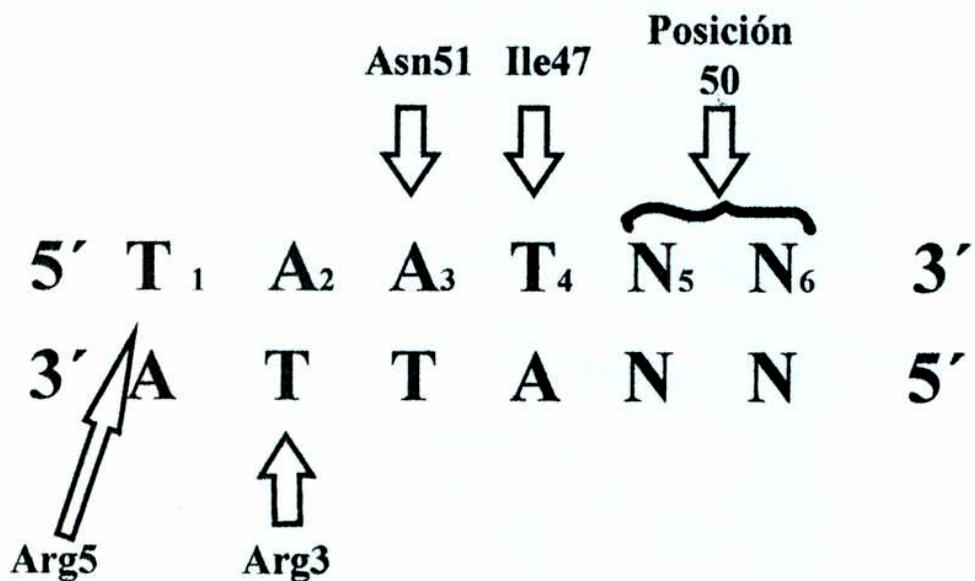
<u>HD Seleccionador</u>	<u>Secuencia óptima</u>	
Ftz	TAATG	(Wilson, 1995)
Oct-1	TAAT(T/G)A	"
Bcd	TAATCC	"
Otd	TAATCC	"
Prd (S50)	TAATYGATTA	"
Prd (Q50)	TAATYNRATTA	"
Prd (K50)	TAATCCGATTA	"
Prd (H50)	TAATTAGRTTA	"
Prd (I50)	TAATYRAGTTA	"
Prd (N50)	TAATGYYATTA	"
Gsc (K59)	TAATCC	"
En (K50)	TAATCC	(Ades y Sauer, 1994)
So (K50)	CTCGGATCC	(Este trabajo)

Se ha demostrado que la posición 50 es crítica para conferir las especificidades de unión al ADN por parte de los HDs. En particular, si se cambia esta posición de una glutamina a una lisina se alteran las bases preferidas en las posiciones 5 y 6, de **TG** a **CC**. El *Prd* HD normalmente posee una serina en esta posición, en tanto que el 84% de todos los HDs conocidos (Wilson, 1995), incluyendo a la mayoría de los HDs tipo *Prd*, tienen una glutamina en esta posición. El análisis del cristalográfico reveló que el brazo N-terminal, que reconoce las bps A/T en el surco menor, puede estar jugando un papel más sustancial en el reconocimiento de la secuencia y podría contribuir al reconocimiento específico del palíndrome central **TAAT** entero (Wilson, 1995). (Figura 5.2.).

Figura 5.2:

Representación esquemática de la tercera hélice de un HD y los aminoácidos específicos que tienen contacto con una secuencia canónica para homeodomódios.

Hélice de reconocimiento, interacción con el surco mayor



Brazo N-terminal, interacción con el surco menor

Determinantes específicos de unión al ADN:

Ya se ha demostrado extensivamente que las lisina, serina y glutamina en la posición 50 son las responsables de la especificidad de reconocimiento para las bps inmediatamente 3' a la sucesión **TAAT**; decidí entonces analizar cuidadosamente las secuencias aminoacídicas de los diferentes HDs que se han descripto más atrás (incluyendo el *soHD*) y las secuencias de ADN reconocidas en cada caso. El sitio de unión óptimo para un HD que funciona en forma homodimérica no es necesariamente simétrico y la identidad de un nucleótido en una posición puede influir sobre la preferencia del HD sobre la secuencia en otra posición. Esto también parece ser cierto para el repressor lambda que también despliega una creciente asimetría hacia el centro del palíndrome.

El HD con K50 reconoce preferentemente a la secuencia **TAATCC**. Ades y Sauer (1994) han informado que el HD de *engrailed (en)* que también lleva una K50 reconoce preferentemente a la secuencia consenso **TAATCC**. El *prdHD* con H50 también parece tener como requisito muy específico ciertas bases en particular inmediatamente 3' al sitio **TAAT**.

El *soHD* tiene naturalmente una lisina (K) en la posición 50 (o 9 de la RH); aunque las secuencias seleccionadas por este dominio no tienen la secuencia central **TAAT**, si tienen un centro **ATCC**. Analizando las secuencias reconocidas por los HDs K50 y el *so* HD es fácil darse cuenta que en todos los casos se encuentra este tetranucleótido (**TAATCC**).

Una inspección de las generaciones más tempranas del SELEX (18 secuencias analizadas) mostró una proporción más baja de oligonucleótidos con esta secuencia; esto indica que realmente se produjo un enriquecimiento sucesivo de la secuencia **ATCC** a medida que se avanzaba en los ciclos de la selección (otros oligonucleótidos no contuvieron secuencia consenso alguna).

Los experimentos bioquímicos llevados a cabo por varios autores sugieren que los residuos en la posición 50 del HD actuarían reconociendo los dos pares de la bases inmediatamente 3' a la secuencia central **TAAT**. A fin de poner los resultados

inmediatamente 3' a la secuencia central **TAAT**. A fin de poner los resultados previamente mencionados en el contexto de esta perspectiva, los HDs que posean una lisina en esta posición, reconocerían específicamente a la secuencia **TAATCC**.

Homeodomelios cuyos sitios de unión específicos no contiene a la secuencia TAAT:

Hay algunos HDs cuyo sitio óptimo de unión al ADN no contiene la sucesión **TAAT**. Esto se ha visto para el HD del gen homeótico selector *Abdominal-B*, que reconoce óptimamente a un sitio que contiene un centro compuesto por la secuencia **TTAT**, en lugar de **TAAT**. Sin embargo este HD posee todos los residuos aminoacídicos semejantes a los que reconocen específicamente a la secuencia central **TAAT**; se vió entonces que los residuos responsables del cambio de a **TTAT** residen en las posiciones 6 y 7 de la RH; incluso, se especuló que otros residuos fuera de la RH puedan estar involucrados en el reconocimiento específico de bases en el ADN blanco.

Otro ejemplo de un HD que no reconocen un sitio de ADN con **TAAT** es el del gen *TTF-1*; este reconoce una secuencia **CAAG**; y esta interacción es estructuralmente análoga a la interacción del **TAAT** a los HDs generales. *TTF-1* poseen todos los aminoácidos específicos que en otros HDs reconocen a la secuencia central **TAAT** y esta nueva especificidad parece depender de algunos aminoácidos no identificados aún y localizados en alguna parte en las regiones N y C-terminal del HD. Estos residuos probablemente modifican la manera en la que los residuos consenso reconocen a las bases del ADN blanco. Adicionalmente se han descripto otros HDs para los que la secuencia óptima de reconocimiento no contiene a la secuencia central **TAAT**; será necesario realizar ensayos de selección para los diferentes HDs para permitir la comparación de todas estas secuencias raras con la **TAAT**.

El HD del factor de transcripción de levadura $\alpha 2$ reconoce una secuencia con un centro **TTAC**, en lugar de **TAAT**. Aunque no se han informado experimentos de selección para este HD, los datos estructural sugieren que la única interacción conservada entre este HD y aquéllos HDs que reconocen la **TAAT**, es entre el Asn51 y la adenina 3; $\alpha 2$ no contienen ninguno de los otros aminoácidos que específicamente reconocen al centro **TAAT** (en especial la isoleucina (N) en la posición 7 de la RH) (Wilson, 1995).

Teniendo en cuenta este análisis, nosotros decidimos testear si el *so* HD puede unir específicamente un oligonucleótido que contienen la secuencia central TAAT seguida por el dinucleótido CC. Realicé un ensayo de gel-shift utilizando el oligonucleótido P3K como sonda radioactiva (**TAATCCGATTA**) y el *soHD*. Este HD demostró ser capáz de reconocer y unirse con alta afinidad a la secuencia P3K (Figura 3.4 en Resultados).

Dcvc y la jerarquía genética general en el desarrollo del ojo:

Si bien la expresión del ARNm de *Dcvc2* detectada en el ensayo de hibridación *in situ* es algo débil, se puede ver claramente que unos grupos celulares estarían transcribiendo activamente este gen y que, por la posición de estas células, podrían perfectamente ser precursores neuronales o células precursoras del lóbulo óptico (Figura 4.3).

Desafortunadamente solo se contó con una sonda de tamaño mínimo estando al límite de resolución de la técnica (Figura 2.3); de tener un clon de mayor tamaño se podría eventualmente lograr una mejor hibridación, disminuyendo el background y posibilitando así una mejor determinación del patrón de expresión de este gen. Por otro lado, la falta de mutantes en este locus hace difícil una mejor interpretación de su acción durante el desarrollo de los ojos y especular respecto de la conservación de la función más allá de la conservación de la secuencia en el CVCD.

Se supone que esta familia de genes se encuentra “rio abajo” de *pax-6* y *sine oculis* en la jerarquía genética. *Dcvc* y sus homólogos podrían ser los genes que controlan directamente la producción de proteínas estructurales y no la de otros genes regulatorios. Estas proteínas estructurales serían entonces proteínas “de trabajo” asociadas con la diferenciación celular, la adhesión celular o proteínas de señalización para que las células interpreten su situación espacial y temporal.

Conclusiones

Preferencias de unión por parte de los diferentes dominios:

El gen *sine oculis* está involucrado en el desarrollo del sistema visual de *Drosophila*; este gen codifica para una proteína de 419 aminoácidos que contiene un homeodominio y un dominio Six. En mamíferos se han identificado cinco genes pertenecientes a esta familia y uno de ellos, el *Six-3*, podría ser el representante homólogo murino de *so* (Oliver y col., 1995). Otro representante identificado en ratón es el *AREC3* (Kawakami y col., 1996). Varios autores reportaron posibles secuencias de unión específicas para SO y para AREC3 (Hazburn y col., 1997; Kawakami y col., 1996).

Utilizando una proteína fusión GST-AREC3, Kawakami y sus colaboradores informaron de un sitio de unión para AREC3 presente en el promotor del gen de la subunidad $\alpha 1$ de la Na,K-ATPasa de ratón, con la secuencia **GGNGNCNGTTGC**. Por otro lado, Hazburn y sus colaboradores, usando un conjugado de la proteína SO con cobre-fenantrolina determinaron, a través de la técnica de footprinting sobre fragmentos del plásmido pUC119, la secuencia **GATA**C como específica para el soHD.

A fin de comparar las especificidades de unión al ADN por parte de los dominios de *so*, determiné la secuencia óptima para el *soHD* y el *soSixD+HD*. Para ello las proteínas fusionadas a la GST fueron mezcladas con una biblioteca de oligonucleótidos de secuencia variable y se llevó a cabo la técnica conocida como SELEX (Figura 2.1). Se hicieron dos ensayos de SELEX con 8 generaciones de selección/amplificación cada uno.

Esta técnica presenta varias ventajas comparativas respecto de las metodologías usadas por los antemencionados autores. En primer lugar, la metodología empleada en esta tesis suprime la necesidad de realizar una exhaustiva purificación de las proteínas a emplear; su naturaleza sencilla permite confinar el procedimiento completo a un solo tubo cerrado, los otros métodos sufren de un mayor riesgo de contaminación. Por otro lado, el SELEX es muy rápido, permitiendo realizar hasta tres generaciones de selección/amplificación por día; la importancia de tener un método rápido es crítica, especialmente cuando es necesario variar mucho las condiciones y determinar las secuencias seleccionadas en cada caso particular (Wilson, 1995; Irvine, 1991).

Para el primer SELEX se secuenciaron y ordenaron siete diferentes oligonucleótidos correspondientes al *soHD* y al *soSixD+HD* y todas ellas pudieron ser alineadas generando una secuencia consenso interna bastante conservada en los siete fragmentos. Debido a que parte de la secuencia tenía una gran similitud con una de las secuencias presentes en las zonas flanqueantes fijas, se decidió llevar a cabo un segundo SELEX conservando las condiciones empleadas para el primero y partiendo de la misma biblioteca original. Luego de ocho generaciones de selección/amplificación, se secuenciaron 50 fragmentos, 40 de los cuales fueron usados para ordenarlos en un consensograma (Figura 3.2); la secuencia consenso generada resultó ser la misma que la que ya había sido obtenida en el primer ensayo e igual para ambos dominios proteicos: 3'CTCGGATCC5'. Los dominios *soSixD* y *chx-10CVCD* no seleccionaron fragmentos con homología reconocible entre ellos y por lo tanto no pudieron ser ordenados en un consensograma.

Ninguna de las secuencias identificadas por los tres grupos presentan homología entre ellas. Los oligonucleótidos que he seleccionado tienen, sin embargo, una reconocible homología interna con la secuencia consenso para los HDs con K50 determinada por varios autores; esta es TAATCC; las secuencias identificadas por los otros dos grupos no solo no presentan homología entre ellas, sino que tampoco pueden ser interpretadas en términos de esta secuencia consenso para los K50HDs. Que la secuencia interna ATCC sea aún más probablemente la secuencia real de unión de esta proteína lo da el hecho que SO conserva, además de la K50.

Los otros aminoácidos involucrados en el contacto específico con las bases de la secuencia central TAATCC y las bases flanqueantes.

Conserva la Asn51 que específicamente reconoce a la adenina 3, en tanto que la Ile47 que reconoce a la timina 4, está reemplazada por una Asn (como en α 2, que, cabe recordar, reconoce TTAC en lugar de TAAT); so conserva la Lis50 que hace contacto con las dos cisteínas finales (5 y 6). Por ello es aún más probable que la secuencia generada a partir de estos ensayos de SELEX sea la de mayor similitud a la secuencia real de unión para esta proteína.

Una conclusión general a la que se puede llegar a partir de todos estos estudios es que la mayoría de los HDs tengan especificidades de unión al ADN muy similares y casi

todos ellos presentan una secuencia óptima de unión con un centro **TAATNN**. El caso de *so* confirma parcialmente esta conclusión.

Al margen de las consideraciones teóricas estructurales, se decidió probar la unión de SO a esta secuencia mediante un ensayo de gel-shift. Uno de los oligonucleótidos seleccionados con la secuencia **CTCGGATCC** fue usado como sonda radioactiva y a partir de él pudo verse que el *soSixD+HD* se unió específicamente a él (Figura 3.3); sin embargo, contrariamente a lo esperado, usando luego un oligonucleótido con la secuencia **TAATCC** (P3K), el *soSixD+HD* también se unió a él con alta afinidad (Figura 3.4); sin embargo, Hazburn y sus colaboradores (1997) mencionaron que a pesar que pUC119 contiene varias secuencias **TAAT**, SO no protegió estas regiones contra la acción de la ADNasa. De esta forma, queda sin contestar la pregunta sobre cómo hacen los diferentes HDs para discriminar los diferentes sitios de unión en los promotores blanco y ejecutar así su gran repertorio de respuestas biológicas.

Desarrollo y evolución de los ojos:

If there is only one efficient solution for a certain functionnal demand, very different gene complexes will come up with the same solution, no matter how different the pathway by which it is achieved. The saying, "Many roads lead to Rome," is as true in evolution as in daily affairs.

Mayr, 1963

La bioquímica básica de la fotorecepción es universal entre los animales; las opsinas son miembros de una familia de receptores de membrana con siete dominios trans-membrana. Las rodopsinas se unen a un cromóforo del retinaldehido para absorver la luz. Una vez que la molécula del rodopsina absovió la luz, interactúa con una proteína G para activar una cascada de segundos mensajeros en el interior de la célula del fotoreceptor. Esta cascada actúa finalmente sobre un canal de sodio y se genera un impulso nervioso. Animales que están ampliamente separados filogenéticamente y con ojos muy diferentes, sin embargo comparten el sistema de activación mediado por la luz, las rodopsinas y los segundos mensajeros generados a partir de la activación de una proteína G.

En cuanto a la genética del desarrollo de los ojos, se ha informado que *Pax-6* puede regular la expresión de gen de la proteína del cristalino (Cvekl y col., 1994; Cvekl y col., 1995(a); Cvekl y Pitiagorsky, 1996; MacDonald, 1996) y más recientemente se informó que *ey* reconoce una secuencia específica en el promotor del gen de la rodopsina-1 de *Drosophila* y además regula su expresión específica en los fotoreceptores (Sheng y col., 1997).

Si *ey*, *so*, *Dcv* y otros genes conservados trabajan de la misma forma, activando el desarrollo del ojo en todos los phyla, entonces es tentador creer que los ojos comparten un origen común.

¿Pero qué sucedería si los ojos en realidad se originaron más de una vez? Además de las diferentes apariencias anatómicas de los ojos entre los distintos phyla, existen otras críticas a los argumentos del origen común de todos los ojos y algunas de ellas llaman la atención.

Ojos de una u otra clase se presentan en la mayoría de los phyla animales, pero su construcción y ontogenia varían enormemente. Una primera distinción se puede hacer entre los ojos con célula fotoreceptoras que se diferencian a partir del sistema nervioso central y aquéllos con células que se diferencian de la epidermis. Los diferentes tipos ópticos de los ojos (simples contra compuestos) también requieren programas de desarrollo fundamentalmente diferentes; incluso algunos ojos del mismo tipo poseen diferencias fundamentales, como la retina "inversa" (o invertida) con los fotoreceptores que enfrentan la parte de atrás del ojo, en los vertebrados y la retina "eversa", con los fotoreceptores hacia adelante, en el caso de los cefalópodos.

Los tejidos y materiales que se utilizaron para construir retinas y lentes varían de un phylum a otro. Los materiales de construcción de estas estructuras no son fundamentalmente únicos para los ojos: las proteínas que constituyen la lente son diferentes en vertebrados y cefalópodos, pero en cambio son idénticas a proteínas que tienen otras funciones en los mismos animales (Land y Fernald, 1992). Parece ser entonces que ciertas estructuras tales como la lente y ojos propiamente dichos han aparecido numerosas veces durante la historia y en cada caso usaron cualquier tejido y

materiales que estuvieron disponibles (Tomarev y Piatigorsky, 1996; Piatigorsky y Wilson, 1991).

La posición de los ojos en el cuerpo de los animales es también muy inconstante; los ojos cefálicos mediales y laterales son los más comunes, pero también los hay en otras localizaciones; en los tentáculos de algunos poliquetos, al borde del manto de algunas almejas y también en la punta del brazo de una estrella de mar y hasta en los genitales de unas mariposas (Miyako y col., 1993).

El antemencionado caso de la bioquímica común de la fotorecepción no hace pensar necesariamente en homología, porque se conocen proteínas receptoras acopladas a proteínas G que funcionan en muchos procesos fisiológicos absolutamente no relacionados, desde la transmisión sináptica, a receptores de hormonas, etc.

En términos de la antemencionada equivalencia genética entre los programas de desarrollo del ojo en las diferentes especies que van desde los vertebrados a los invertebrados, si se desea dejar de lado la posibilidad de la convergencia, se requiere de mucho más que comparaciones de secuencias nucleotídicas y funciones individuales (de Beer, 1958).

Cuando los genes reguladores y sus productos evolucionan incorporando nuevas funciones, las moléculas homólogas pueden aparecer en estructuras nohomologas. El hecho que dos estructuras sean similares en muchos aspectos, incluso en términos de genes reguladores homólogos, no indica necesariamente que las estructuras en sí sean homólogas. Convergencias de este tipo se encuentran a menudo; sólo considérese la función del gen *hedgehog* y sus homólogos en el desarrollo de las alas de las moscas y de los pájaros (Ingham P, 1994); este hecho involucra los mismos fundamentos y razonamientos que han sido empleados hasta ahora para *ey*, *so* y sus homólogos; y aún así nadie sugeriría que las alas del insecto del pájaro son estructuras homólogas (Dickson y Seger, 1996).

Así como otros genes reguladores poseedores de homeobox, la acción de *ey* depende mucho del contexto y el "efecto de la comunidad" es de gran importancia en la definición de su función (Gurdon y col., 1993). Este gen además se expresa en células que no contribuyen a estructura ocular alguna y la expresión ectópica de *ey*, *sey* u otro

homólogos de *pax-6*, según lo demostrado a partir del trabajo de Gehring y sus colaboradores, no convierte al embrión entero en un ojo (Grindley y col., 1995; Dickinson y col., 1996). Otra interpretación a partir de estos experimentos es la que indica que cualquiera de los homólogos de *pax-6* en realidad solo conservarían la capacidad de poder interactuar con los otros componentes de la cascada genética, gracias a la conservación de los dominios proteicos involucrados en esta interacción. Otra posición diría que en realidad *pax-6* es autorregulatorio, tal como lo son muchos factores de transcripción y que en realidad el *pax-6* exógeno no estaría haciendo más que inducir la producción del *ey* endógeno en aquellos discos imaginarios que normalmente no lo producirían, así la formación ectópica de estructuras oculares (Harris, 1997). Un experimento fundamental para descartar o confirmar esta posibilidad sería tratar de rescatar moscas *ey*⁻ con los genes de vertebrados o de moluscos, pero hasta el momento esto no se ha hecho.

Para obtener una respuesta más exacta es fundamental preguntarse cuándo se originaron los diferentes tipos de ojo. La mayoría de los phyla modernos puede trazarse hacia atrás hasta la explosión Cámbrica, hecho acontecido hace aproximadamente 550 millones de años. La fauna que apareció durante la explosión Cámbrica incluyó a una enorme cantidad de animales bilateralmente simétricos y móviles, con ojos bien desarrollados. La fauna precámbrica debe de haber estado compuesta por los antepasados de las especies móviles del Cámbrico, pero los fósiles precámbricos no muestran evidencia alguna de animales altamente móviles o con estructuras oculares discernibles. Esto podría sugerir que la locomoción rápida guiada visualmente fue una importante invención durante la explosión Cámbrica.

La súbita aparición de los ojos habría entonces sucedido junto con la aparición de los phyla modernos. Así como *Pax-6* y *ey* (Quiring y col., 1994; Halder y col., 1995) y probablemente también *Six* y *sine oculis* (Serikaku y O'Tousa, 1994; Cheyette y col., 1994; Oliver y col., 1995) y la familia de genes de *Chx-10* y *Dcvc* (Liu y col., 1994; Freund, 1996; Svendsen y McGhee, 1995; Levine y Schechter, 1993; Levine y col., 1994; y esta tesis) se encuentran ampliamente distribuidos en los phyla animales que aparecieron hace 550 millones de años, se puede plantear que estos genes deben de haber

existido significativamente antes a la aparición de los ojos tempranamente en el período Cámbrico (Noll, 1993; Sun y col., 1997).

Los genes controladores serían así más viejos que muchas de las estructuras que ellos son capaces de desarrollar en los animales actuales. Sólo es posible de especular acerca de la naturaleza del precursor de estos genes; pero a partir de los patrones de expresión de *eyeless*, *sine oculis* y *Dcvc* en las distintas especies, se puede pensar que su papel ancestral pudo ser el de determinantes del destino de las células precursoras neurales o sensoriales. Cuando un sistema nervioso simple se vuelve más elaborado, es probable que lo haga a expensas de órganos o estructuras nuevas; es así que antiguos genes pudieron cambiar su papel gradualmente o ejercer otras funciones, incluyendo en la cascada genética que desencadenan nuevos genes blanco que podrían o no estar funcionalmente relacionados a los genes blanco originales (Noll, 1993).

So, *Dcvc* y *ey* podrían de esta forma no ser genes controladores de la organogénesis, sino más bien genes organizadores de la cabeza, el lugar donde la mayoría de los animales desarrollaron sus ojos.

Esto significa que las estructuras oculares puede ser homologas en algunos casos y análogas en otros, pero siempre compartiendo a la misma bioquímica y los mismos genes reguladores. Esta posición puede interpretarse de la siguiente forma: teniendo en mente la amplia representación de *ey*, *so* y *Dcvc*, tal como se mencionó es posible que ellos ya existieran mucho antes de aparición de las estructuras oculares durante la explosión Cámbrica; los genes ancestros podrían haber estado involucrados en la regulación de la expresión de las moléculas fotoreceptoras únicamente. En un antepasado distante y común a todos los animales bilaterales, estos genes habrían regulado simplemente la expresión de las opsinas; posteriormente y a consecuencia de algunos cambios ambientales y a las diferentes presiones evolutivas, la acción de estos genes podría haber cambiado pasando a regular no sólo la expresión, sino también la localización de las moléculas fotoreceptoras en una zona en particular del cuerpo del animal.

Tiempo después, y ya en el período Cámbrico, la diversificación animal hizo que los diferentes phyla empezaran a desarrollar diferentes tipos de estilos de vida a

consecuencia de esto, a sufrir presiones evolutivas diferentes. Los genes controladores ya estaban allí, regulando a los genes relacionados con la visión en animales que no poseían lo que podríamos llamar ojos; siendo genes controladores u organizadores y habiendo empezado, los animales, a responder diferencialmente a los cambios medioambientales, *ey*, *so* y *Dcvc* podrían haber empezado a regular diferentes genes en cada caso, reclutando nuevas proteínas al campo morfogenético ocular e incorporando nuevas funciones; proteínas similares en algunos casos y proteínas completamente diferentes en otros (basta solo con tomar el ejemplo de las proteínas que componen en cristalino) (Piatigorsky y Wistow, 1991; Cvekl y Pitiagorsky, 1996; Richardson y col., 1995). Consecuentemente, las estructuras del ojo en vías de desarrollo se formarían de una manera en algunos phyla y de una manera diferente en otros; más rápido en algunos animales y más tarde en otros.

Bajo este panorama, los mismos genes controladores podrían dominar redes genéticas ligeramente diferentes para desarrollar funciones homólogas, la visión en este caso, contenidas en estructuras homólogas o análogas, los ojos. Con esto quiero decir que la visión se habría originado solo una vez en la historia, pero las estructuras oculares podrían haberse generado más de una vez durante la evolución; dando lugar de esta forma a la jerarquía genética y a la bioquímica de la fotorecepción altamente conservadas, contenidas en las estructuras oculares altamente diversificadas.

Perspectivas:

Los datos experimentales que aquí se presentan son apenas un detalle sobre algunos aspectos de este problema y no pretenden inclinar la balanza ni hacia uno ni hacia el otro lado de la controversia, pero se suman al resto de la información que últimamente se ha generado en torno a este tema. El conocimiento de todos los componentes genéticos que están involucrados en la organogénesis de cualquier estructura, así como el estudio molecular de la interrelación entre estos componentes será en lo que finalmente habrá que basarse para determinar por qué vemos y por qué lo hacemos de la forma que lo hacemos.

Alguien podría tachar de novedad o singularidad algunos de los conceptos que aquí expongo: considero innecesario insistir sobre este punto, pues todos juzgarán de escaso talento y muy poco familiarizado con las ciencias al que se atreva a rechazar una verdad demostrable, por el simple hecho de ser nueva, esto es, recientemente adquirida, o por ser contraria a prejuicios inverterados.

Berkeley, 1957 (1710).

Bibliografía:

- 1 **Ades, S.E. y Sauer, R.T.** (1994). DNA-binding activity by the engrailed homeodomain. *Biochemistry* **33**, 9187-9194.
- 2 **Ali, M.A.** (1984). *Photoreception and Vision in Invertebrates*. Plenum Press. NY.
- 3 **Baldwin, C., Hoth, C.F., Amos, J.A., da-Silva, E.O. y Milunsky, A.** (1992). An exonic mutation in the HuP2 paired domain gene causes Waardenburg's syndrome. *Nature* **355**, 637-638.
- 4 **Barabino, S.M.** (1997). Inactivation of the zebrafish homologue of Chx10 by antisense oligonucleotides causes eye malformations similar to the ocular retardation phenotype. *Mech. Dev.* **63**, 133-143.
- 5 **Bate, M y Martinez-Arias, A.** (1993). *The Development of Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor Lab Press, NY.
- 6 **Belecky-Adams, T., Tomarev, S., Li, H.S., Ploder, L., McInnes, R.R., Saudin, O. y Adler, R.** (1997). Pax-6, Prox 1 y Chx10 homeobox gene expression correlates with phenotypic fate of retinal precursor cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **38**, 1293-1303.
- 7 **Bendall, D.S.** (1983). *Evolution from Molecules to Men*. Cambridge University Press, Cambridge.
- 8 **Berkeley, G.** (1957). *Principios del Conocimiento Humano*. Aguilar, Buenos Aires.
- 9 **Billeter, M., Qian, Y-q., Otting, G., Müller, M., Gehring, W.J. y Wütrich, K.** (1990). Determination of the Three-dimensional Structure of the Antennapedia Homeodomain from Drosophila in Solution by ¹H NMR Spectroscopy. *J. Mol. Biol.* **214**, 183-197.
- 10 **Bonavolonta, P.** (1996). Cloning and characterisation of two chick homeobox genes, members of the six/sine oculis family, expressed during eye development. *Int. J. Dev. Biol.* **73S-74S**.
- 11 **Bopp, D., Burri, M., Baumgartner, S., Frigerio, G. y Noll, M.** (1986). Conservation of a large protein domain in the segmentation gene paired and in functionally related genes in Drosophila. *Cell* **47**, 1033-1049.
- 12 **Burmeister, M.** (1996). Ocular retardation mouse caused by Chx10 homeobox null allele: impaired retinal progenitor proliferation and bipolar cell differentiation. *Nature Genetics* **12**, 376-384.
- 13 **Carrasco, A.E., McGinnis, W., Gehring, W.J. y DeRobertis, E.M.** (1984). Cloning of a X. laevis gene expressed during early embryogenesis coding for a peptide region homologous to Drosophila homeotic genes. *Cell* **37**, 409.
- 14 **Chalepakis, G., Stoykova, A., Wijnholds, J., Tremblay, P. y Gruss, P.** (1993). Pax: Gene Regulatros in the Developng Nervous System. *J. Neurobiol.* **24**, 1367-1384.
- 15 **Cheyette, B.N., Green, P.J., Martin, K., Garren, H., Hartenstein, V. y Zipursky, S.L.** (1994). The Drosophila sine oculis locus encodes a homeodomain-containing protein required for the development of the entire visual system. *Neuron* **12**, 977-996.
- 16 **Chisholm, A.D. y Horovitz, H.R.** (1995). *Nature* **377**, 52-55.

- 17 Cvekl, A. y Pitiagorsky, J. (1996). *BioEssays* **18**, 621-631.
- 18 Cvekl, A., Sax, C.M., Bresnik, E.H. y Pistigorsky, J. (1994). A complex of positive and negative elements regulates the chicken alpha-A-crystallin gene: involvement of Pax-6, USF, CREB and/or CREM, and AP-1 proteins. *Mol. Cell Biol.* **14**, 7363-7376.
- 19 Cvekl, A., Sax, C.M., Li, X., McDermott, J.B. y Pistigorsky, J. (1995a). Pax-6 and lense-specific transcription of the chicken gamma-crystallin gene. *P.N.A.S.* **92**, 468-4685.
- 20 Czerny, T., Schaffner, G. y Busslinger, M. (1993). DNA sequence recognition by Pax proteins: bipartite structure of the paired domain and its binding site. *Genes & Dev.* **7**, 2048-2061.
- 21 Damante, G., Tell, G., Leonard, A. y col. (1994). *FEBS Lett.* **354**, 293-296.
- 22 de Beer, G. (1958). *Embryos and Ancestors*. Third Ed. Oxford at The Clarendon Press, Oxford.
- 23 Desplan, C., Theis, J. y O'Farrell, P.H. (1988). The sequence specificity of homeodomain-DNA interaction. *Cell* **54**, 1081-1090.
- 24 Desplan, C., Theis, J. y O'Farrell, P.H. (1985). The Drosophila developmental gene, engrailed, encodes a sequence-specific DNA binding activity. *Nature* **318**, 630-635.
- 25 Dickinson, W.J. y Seger, J. (1996). Eye evolution. *Science* **272**, 467-468.
- 26 Dickson, W.J. y Hafen, E. (1993). Genetics of Signal Transduction in Invertebrates. *Curr. Op. Genet. Dev.* **4**, 64-70.
- 27 Dodson, E.O. *Evolution: Process and Result*. University of Ottawa.
- 28 Driever, W. y Nüsslein-Volhard, C. (1988). A gradient of bicoid protein in Drosophila embryos. *Cell* **54**, 83-93.
- 29 Ekker, S.C., Young, K.E., von Kessler, K.E. y Beachy, P.A. (1991). Optimal DNA sequence recognition by the Ultrabithorax homeodomain protein of Drosophila. *EMBO J.* **10**, 1179-1186.
- 30 Epstein, D.J., Malo, D., Vekemans, M. y Gros, P. (1991). Molecular characterization of a deletion encompassing the splotch mutation on mouse chromosome 1. *Genomics* **10**, 89-93.
- 31 Epstein, J., Cai, J., Glaser, T., Jepeal, L. y Maas, R. (1994). Identification of a Pax paired domain recognition sequence and evidence for DNA-dependent conformational changes. *J. Biol. Chem.* **269**, 8355-61.
- 32 Freeman, M. (1997). Cell determination strategies in the Drosophila eye. *Development* **124**, 251-270.
- 33 Freund, C., Horsford, D.J. y McInnes, R.R. (1996). Transcription factor genes and the developing eye: a genetic perspective. *Hum. Mol. Genet.* **5** (Sp. Num.), 1471-1488.
- 34 Frigerio, G., Burri, M., Bopp, D., Baumgartner, S. y Noll, M. (1986). Structure of the segmentation gene paired and the Drosophila PRD gene set as part of a gene network. *Cell* **47**, 735-746.
- 35 Gehring, W.J. (1987). Homeo Boxes in the Study of Development. *Science* **236**, 1245-1252.
- 36 Gehring, W.J. (1996). Eye evolution. *Science* **272**, 468-469.
- 37 Gilbert, S.F. (1994). *Developmental Biology*. Fourth Ed. Sinauer Associates Inc. Ma.

- 38 **Glaser, T., Walton, D.S. y Maas, R.L.** (1992). Genomic structure, evolutionary conservation and aniridia mutations in the human pax-6 gene. *Nature Genetics* **2**, 232-239.
- 39 **Goulding, M. Sterrer, S., Fleming, J., Balling, R., Nadeau, J., Moore, K.J., Brown, S.D., Steel, K.P. y Gruss, P.** (1993). Analysis of the Pax-3 gene in the mouse mutant splotch. *Genomics* **17**, 355-363.
- 40 **Grindley, J.C., Davidson, D.R. y Hill, R.E.** (1995). The role of Pax-6 in eye and nasal development. *Development* **121**, 1433-1442.
- 41 **Gurdon, J.B., Lemaire, P. y Kato, K.** (1993). Community Effects and Related Phenomena in Development. *Cell* **75**, 831-834.
- 42 **Halder, G., Callaerts, P. y Gehring, W.J.** (1995b). New perspectives on eye evolution. *Curr. Op. Genet. Dev.* **5**, 602-609.
- 43 **Halder, G., Callaerts, P. y Gehring, W.J.** (1995a). Induction of ectopic Eyes by targeted expression of the eyeless gene in Drosophila. *Science* **267**, 1788-1792.
- 44 **Hanson, I. y van Heyningen, V.** (1995). Pax-6: More than mmets the eye. *Trends in Genetics* **11**, 268-272.
- 45 **Harris, W.A.** (1997). Pax-6: Where to be conserved is not conservative. *P.N.A.S.* **94**, 2098-2100.
- 46 **Hartenstein, V.** (1993). *Atlas of Drosophila Development*. First Ed. Cold Spring Harbor Lab. Press. NY.
- 47 **Hazburn, T.R., Stahura, F.L., y Mossing, M.C.** (1997). Site-Specific Recognition by and Isolated DNA-Binding Domain of the Sine Oculis Protein. *Biochemistry* **36**, 3680-3686.
- 48 **Heberlein, U. y Moses, K.** (1995). Mechanisms of Drosophila retinal morphogenesis: The virtues of being progressive. *Cell* **81**, 987-990.
- 49 **Heberlein, U., Hariharan, I.K. y Rubin, G.M.** (1993). Star is required for neuronal differentiation in the Drosophila retina and displays dosage sensitive interactions with Ras1. *Dev. Biol.* **160**, 51-63.
- 50 **Hibberd, S.** (1863). The Moral Faculties of Brutes. *The Natural Observer* **4**, 211-216.
- 51 **Hill, R. and Van Heyningen, V.** (1992). Mouse mutations and human disorders are Paired. *Trends in Genetics* **8**, 119-120.
- 52 **Hoey, T. y Levine, M.** (1988). Divergent homeobox proteins recognize similar DNA sequences in Drosophila. *Nature* **332**, 858-861.
- 53 **Holland, P.W.D. y Hogan, B.L.M.** (1986). Phylogenetic distribution of Antennapedia-like homeoboxes. *Nature* **321**, 251-253.
- 54 **Huxley, T.H.** (1908). *Lectures and Essays*. Cassell & Co., Ltd., London.
- 55 **Ingham, P.W.** (1994). Hedgehog function in development. *Curr. Biol.* **4**, 347.
- 56 **Irvine, D., Tuerk, C. y Gold, L.** (1991). SELEXION: Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment with integrated optimization by non-linear analysis. *J. Mol. Biol.* **222**, 739-761.
- 57 **Jordan, T., Hanson, I., Zaletayev, D., Hodgson, S., Prosser, J., Seawright, A., Hastie, N. y VanHeyningen, V.** (1992). The human PAX6 gene is mutated in two patients with aniridia. *Nature Genetics* **1**, 328-332.

- 58 **Jun, S.** (1995). *Ph.D. Thesis*. The Rockefeller University.
- 59 **Kawakami, K., Ohto, H., Ikeda, K. y Roeder, R.G.** (1996). Structure, function and expression of a murine homeobox protein AREC3, a homologue of Drosophila sine oculis gene product, and implication in development. *Nucleic Acids Research* **24**, 303-310.
- 60 **Kissinger, C.R., Liu, B., Martin-Bianco, B., Kornberg, T.B. y Pabo, C.O.** (1990). Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8A resolution: A framework for understanding homeodomain-DNA interactions. *Cell* **63**, 579-590.
- 61 **Klemm, J.D., Rould, M.A., Aurora, R., Herr, W. y Pabo, C.O.** (1994). Crystal structure of the Oct-1 POU domain bound to an octamer site-DNA recognition with tethered DNA-binding molecules. *Cell* **77**, 21-32.
- 62 **Land y Fernald.** (1992). *Ann. Rev. Neurobiol.* **15**, 1-29.
- 63 **Laughon, A. y Scott, M.P.** (1984). Sequence of a Drosophila segmentation gene: protein structure homology with DNA binding proteins. *Nature* **310**, 25-31.
- 64 **Lawrence, P.A.** (1992). *The Making of a Fly: The Genetics of Animal Design*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- 65 **Levine, E.M., Hitchcock, P.F., Glasgow, E. y Schechter, N.** (1994). Restricted expression of a paired-class homeobox gene in the normal and regenerating adlt goldfish retina. *J. Comp. Neurol.* **348**, 596-606.
- 66 **Levine, E.M., y Schechter, N.** (1993). Homeobox genes are expressed in the retina and brain of adult goldfish. *P.N.A.S.* **90**, 2729-2733.
- 67 **Liu, I.S., Chen, J.-de, Ploder, L., Vidgen, D., y col.** (1994). Developmental expression a a novel morine homeobnox gene (Chx-10): Evidence for roles in determination of the neuroretina and inner nuclear layer. *Neuron* **13**, 377-393.
- 68 **Macdonald, R. y Wilson, S.** (1996). Pax proteins and eye development. *Curr. Op. Neurobiol.* **6**, 49-56.
- 69 **Manak, J.R. y Scott, M.P.** (1994). A class act: conservation of homeodomain protein functions. *Development Suppl.*, 61-71.
- 70 **Matsuo, T., Osumi-Yamashita, N., Noji, S., Ohuchi, H., Koyama, E. y col.** (1993). A mutation in the Pax-6 gene in rat small eye is associated with impaired migration of midbrain crest cells. *Nature Genetics* **3**, 299-304.
- 71 **Mayr, E.** (1963). *Animal Species and Evolution*. The Belknap Press of Harvard University Press, Ma.
- 72 **McGinnis, W. y Kuziora, M.** (1994). The Molecular Architects of Boby Design. *Sci. Am. Feb.*, 36-42.
- 73 **McGinnis, W., Garber, R.L., Wirz, J., Kuroiwa, A. y Gehring, W.J.** (1984). A homologous protein-coding sequence in Drosophila homeotic genes and its conservation in other metazoans. *Cell* **37**, 403-408.
- 74 **Miyako y col.** (1993).
- 75 **Nilsson, D.E. y Pelger, S.** (1994). A pessimistic estimate of the time required for an eye to evolve. *Proc. R. Soc. London. B* **256**, 53-58.
- 76 **Noll, M.** (1993). Evolution and role of Pax genes. *Curr. Op. Genet. and Dev.* **3**, 595-605.

- 77 Nüsslein-Volhard, C. y Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila. *Nature* **287**, 795-801.
- 78 Oliver, G., Mailhos, A., Wehr, R., Copeland, N.G. y col. (1995). Six3, a murine homologue of the sine oculis gene, demarcates the most anterior border of the developing neural plate and is expressed during eye development. *Development* **12**, 4045-4055.
- 79 Pabo, C.O. y Sauer, R.T. (1992). Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Ann. Rev. Biochem.* **61**, 1053-1095.
- 80 Penton, A., Selleck, S.B. y Hoffmann, F.M. (1997). Regulation of Cell Cycle Synchronization by decapentaplegic During Drosophila Eye Development. *Science* **275**, 203-206.
- 81 Piatigorsky, J. y Wistow, G. (1991). The Recruitment of Crystallins: New Functions Precede Gene Duplication. *Science* **252**, 1078-1079.
- 82 Pignoni, F. y Zipursky, S.L. (1997). Induction of Drosophila eye development by Decapentaplegic. *Development* **124**, 271-278.
- 83 Ptashne, M. (1988). How eukaryotic transcriptional cativators work. *Nature* **335**, 683-689.
- 84 Quiring, R., Walldorf, U., Kloter, U. y Gehring, W.J. (1994). Homology of the eyeless Gene of Drosophila to the Small eye Gene in Mice and Aniridia in Humans. *Science* **265**, 785-789.
- 85 Raff, R.A. (1996). *The Shape of Life: Genes, Development, and the Evolution of Animal Form*. The University of Chicago Press.
- 86 Richardson, J., Cvekl, A. y Wistow, G. (1995). Pax-6 is essential for lens-specific expression of crystallin. *P.N.A.S.* **92**, 4676-4680.
- 87 Roush, W. (1995). Fly Development work bears Prize-Wining Fruit. *Science* **270**, 380-381.
- 88 Salvini-Plawen, L.V. y Mayr, E. (1977). On the evolution of photoreceptors and eyes. *Evol. Biol.* **10**, 207-263.
- 89 Scott, M.P. y Weiner, A.J. (1984). Structural relationships among genes that control development: Sequence homolgy between the Antennapedia, Ultrabithorax and fushi tarazu loci of Drosophila. *P.N.A.S.* **81**, 4115-4119.
- 90 Scott, M.P., Tamkun, J.W. y Hartzell, G.W., III. (1989). The structure and function of the homeodomain. *BBA* **989**, 25-48.
- 91 Serikaku, M.A. y O'Tousa, J.E. (1994). sine oculis is a homeobox gene required for Drosophila visual system development. *Genetics* **138**, 1137-1150.
- 92 Shashikant, C.S., Utset, M.F., Violette, S.M., Wise, T.L., Einat, P., Einat, M., Pendleton, J.W., Schughart, K. y Ruddle, F.H. (1991). Homeobox Genes in Mouse Development. *Crit. Rev. Eukaryotic Gene Expression* **1**, 207-245.
- 93 Sheng, G., Lecuit, T., Wilson, D. y Desplan, C. (1997). Direct Regulation of Drosophila rhodopsin-1 Gene by eyeless/Pax-6. *Genes & Dev.*
- 94 Slack, J.M.W. (1991). *From Egg to Embryo*. Second Ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- 95 St. Johnston, D. y Nüsslein-Volhard, C. (1992). The origin of Pattern and Polarity in the Drosophila Embryo. *Cell* **68**, 201-219.

- 96 **Stapleton, P., Weith, A., Urbanek, P., Kozmik, Z. y Busslinger, M.** (1993). Chromosomal localization of seven PAX genes and cloning of a novel famili member, PAX-9. *Nature Genetics* **3**, 292-298.
- 97 **Strachan, T. y Read, A.P.** (1994). Pax genes. *Curr. Op. Genet. Dev.* **4**, 427-438.
- 98 **Sun, H., Rodin, A., Zhou, Y. y col.** (1997). Evolution of paired domains: Isolation and sequencing of jellyfish and hydra genes related to Pax-5 and Pax-6. *P.N.A.S.* **94**, 5156-5161.
- 99 **Svendsen, P., y McGhee, J.D.**, (1995). The *C. elegans* neuronally expressed homeobox gene ceh-10 is closely related to genes expressed in the vertebrate eye. *Development* **121**, 1253-1262.
- 100 **Tassabehji, M., Raed, A.P., Newton, V.E., Harris, R., Balling, R., Gruss, P. y Strachan, T.** (1992). Waardenburg's syndrome patients have mutations in the human homologue of the Pax-3 paired box gene. *Nature* **355**, 635-636.
- 101 **Thomas, B.J. y Zipursky, S.L.** (1994). Early pattern formation in the developing Drosophila eye. *Trends in Cell Biology* **4**, 389-394.
- 102 **Tio, M., Ma, C. y Moses, K.** (1995). Extracellular regulators and pattern formation in the developing Drosophila retina. *Biochem. Soc. Symp.* **62**, 61-75.
- 103 **Tomarev, S.I. y Piatigorsky, J.** (1996). Lens Crystallins of invertebrates: diversity and recruitment from detoxification enzymes and novel proteins. *Eur. J. Biochem.* **235**, 449-465.
- 104 **Tomarev, S.I., Callaerts, P., Kos, L., Zinovieva, R., Halder, G., Gehring, W. y Piatigorsky, J.**, (1997). Squid Pax-6 and eye development. *P.N.A.S.* **94**, 2421-2426.
- 105 **Tomlinson, A.** (1985). The cellular dynamics of pattern formation in the eye of Drosophila. *J. Embryol. Exp. Morph.* **89**, 313-331.
- 106 **Tomlinson, A.** (1988). Cellular interactions in the developing Drosophila eye. *Development* **104**, 183-193.
- 107 **Tomlinson, A. y Ready, D.F.** (1987). Neuronal differentiation in the Drosophila ommatidium. *Dev. Biol.* **120**, 366-376.
- 108 **Ton, C.C.T., Hirvonen, H., Miwa, H., Weil, M.M., Monaghan, P. y col.** (1991). Positional cloning and characterization of a paired box- and homeobox-containg gene from the Aniridia region. *Cell* **67**, 1059-1074.
- 109 **Treisman, J., Harris, E. y Desplan, C.** (1991). The Paired Box encodes a second DNA-binding domain in the Paired homeo domain protein. *Genes & Dev.* **5**, 594-604.
- 110 **Treisman, J., Harris, E., Wilson, D. y Desplan, C.** (1992). The homeodomain: A new face for the helix-turn-helix. *BioEssays* **14**, 145-150.
- 111 **Tremblay, P. y Gruss, P.** (1994). Pax: Genes for Mice and Men. *Pharmac. Ther.* **61**, 205-226.
- 112 **Tuerk, C. y Gold, L.** (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* **249**, 505-510.
- 113 **Walther, C. y Gruss, P.** (1991). Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* **113**, 1435-1449..
- 114 **Wilson, D.** (1995). *Ph.D. Thesis.* The Rockefeller University.

- 115 **Wilson, D., Sheng, G., Lecuit, T., Dostatni, N. y Desplan, C.** (1993). Cooperative dimerization of paired class homeo domains on DNA. *Genes & Dev.* **7**, 2120-2134.
- 116 **Wingender, E.** (1990). Transcription Regulating Proteins and their Recognition Sequences. *Crit. Rev. Eukaryotic Gene Expression* **1**, 11-48.
- 117 **Xu, W., Rould, M., Jun, S., Desplan, C. y Pabo, C.O.** (1995). Crystal structure of a paired domain-DNA complex at 2.5A resolution reveals structural basis for Pax developmental mutations. *Cell* **80**, 639-650.
- 118 **Zelhof, A.C., Ghbeish, N., Tsai, C., Evans, R.M. y McKeown, M.** (1997). A role for Ultraspiracle, the Drosophila RXR, in morphogenetic furrow movement and photoreceptor cluster fromation. *Development* **124**, 2499-2506.
- 119 **Zhang, Y. y Emmons, S.W.** (1995). Specification of sense-organ identity by a *Caenorhabditis elegans* Pax-6 homologue. *Nature* **377**, 55-59.
- 120 **Zucker, C.S.**(1994). On the evolution of eyes: would you like it simple or compound? *Science* **265**, 742-743.
- 121 **Zuckerkandl, E.** (1994). Molecular pathways to parallel evolution: Gene nexuses and their morphological correlates. *J. Mol. Evol.* **39**, 661-678.